

NGHIÊN CỨU TÁI SINH ĐA CHỒI *IN VITRO* Ở CÂY ĐẬU NHỎ NHE [*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi]

Nguyễn Thị Ngọc Lan^{1*}, Vũ Thu Trang^{1,2}

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên,

^{1,2}Sở giáo dục và đào tạo Quảng Ninh

TÓM TẮT

Cây đậu đỗ là nhóm cây trồng chủ lực ở Việt Nam. Trong nhóm này, đậu Nho nhe cũng được sử dụng với nhiều công dụng khác nhau như: dùng làm thực phẩm, cải tạo đất nhờ có khả năng cố định đạm, làm phân xanh và được sử dụng để che phủ đất, đặc biệt là ở khu vực đất dốc như sườn đồi, núi. Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam, không có nhiều thông tin nghiên cứu về loại cây này. Hơn nữa, với đặc tính là có khả năng chống chịu tốt với sâu bệnh hại và các tác động bất lợi từ ngoại cảnh, đậu Nho nhe được xem là nguồn gen quý trong công tác cải thiện và nâng cao tính chống chịu của cây họ Đậu. Vì vậy, việc xác định được quy trình tái sinh đa chồi *in vitro* cây đậu Nho nhe có vai trò quan trọng và là cơ sở để ứng dụng kỹ thuật chuyển gen ở cây họ Đậu. Trong nghiên cứu này, cây đậu Nho nhe được tái sinh thành công từ chồi ngọn *in vitro*. Hạt sau khi khử trùng 20 phút bằng dung dịch javen 60% được chuyển vào môi trường nảy mầm, sau 6 ngày thu chồi để tái sinh. Môi trường tốt nhất để tạo đa chồi từ chồi ngọn đậu Nho nhe là MS bổ sung BAP 1,5 mg/l; sucrose 30 g/l; agar 9 g/l; nước dừa 10%. Môi trường thích hợp để tạo rễ cây đậu Nho nhe *in vitro* là MS có bổ sung 0,3 mg/l IBA. Cây đậu Nho nhe *in vitro* được đưa thành công ra vườn ươm trên nền giá thể chứa đất thịt và trấu hun với tỷ lệ 2:1.

Từ khóa: chuyển gen; đậu nho nhe; đa chồi; hệ thống tái sinh *in vitro*; *Vigna umbellata*.

Ngày nhận bài: 13/4/2020; Ngày hoàn thiện: 08/6/2020; Ngày đăng: 11/6/2020

RESEARCH ON *IN VITRO* MULTIPLE SHOOT REGENERATION OF RICE BEAN [*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi]

Nguyen Thi Ngoc Lan^{1*}, Vu Thu Trang^{1,2}

¹TNU - University of Education,

^{1,2}Quang Ninh Department of Education and Training

ABSTRACT

Rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) belongs to the genus *Vigna* which is one of the major crops in Vietnam. This plant is also known for many different roles such as: food, soil improvement, green manure and cover soil, especially in sloping areas. However, data on this plant is very limited in Vietnam nowadays. Moreover, rice bean has been reported to possess resistance to both abiotic and biotic stresses, thus it can be considered as a valuable gene source in improving tolerance of *Vigna* plants. Therefore, the identification of *in vitro* multiple shoot regeneration process of rice bean plays an important role due to their primary application of gene transfer of this crop. In this study, rice bean was successfully regenerated from *in vitro* tip shoots using seeds as the original material. After disinfection for 20 minutes with 60% javen, seeds were transferred to germination media to produce seedlings. The highest number of shoots were produced on MS + BAP 1.5 mg/l + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + coconut water 10%. *In vitro* shoots produced quality roots on MS medium supplemented with 0.3 mg/l IBA. Rice bean plants *in vitro* were successfully survival in the greenhouse on a substrate containing soil and husk with a ratio of 2:1.

Keywords: gene transfer; *in vitro* regeneration system; multiple shoot; rice bean; *Vigna umbellata*.

Received: 13/4/2020; Revised: 08/6/2020; Published: 11/6/2020

* Corresponding author. Email: ntnlan.dhsptn@tnu.edu.vn

1. Mở đầu

Đậu Nho nhe, còn được gọi là đậu gạo, đậu nân, có tên khoa học là *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi thuộc họ đậu (Fabaceae). Đậu Nho nhe phân bố khá rộng ở vùng cận nhiệt đới ẩm đến khí hậu ôn đới như ở các nước nhiệt đới châu Á, châu Phi và châu Mỹ [1]. Ở Việt Nam, đậu Nho nhe được trồng chủ yếu ở các tỉnh miền núi phía Bắc như Hà Giang, Lai Châu và Yên Bái. Cũng như các loại đậu đỗ khác, hạt của cây đậu Nho nhe có giá trị dinh dưỡng cao và được sử dụng làm nguồn cung cấp protein quan trọng cho con người và vật nuôi [2], [3]. Các bộ phận của cây Đậu nho nhe đều có thể được sử dụng làm thực phẩm như cây non, lá, quả non, hạt khô. Những bộ phận còn lại của cây sau thu hoạch như thân cây, lá, hạt... có thể để tươi hoặc phơi khô sử dụng làm thức ăn cho gia súc [4]. Đậu Nho nhe là cây một năm, thân thảo có thể mọc thẳng đứng, bán thẳng hoặc xoắn có dây leo, có hệ rễ phát triển mạnh mang nhiều nốt sần chứa vi khuẩn cố định đạm. Vì vậy, loại cây này thường được trồng luân canh với lúa và ngô để tăng vụ và cải tạo đất bạc màu chống xói mòn. Cây đậu Nho nhe sinh trưởng rất nhanh, sau 3 tháng có thể phủ kín đất, đặc biệt thân và lá có thể làm phân bón rất tốt [5].

Mặc dù, đậu Nho nhe thuộc nhóm cây trồng chủ lực và có nhiều giá trị về mặt dinh dưỡng cũng như trong cải tạo đất, nhưng hiện nay có rất ít các nghiên cứu khoa học về loài này ở Việt Nam. Bên cạnh đó, đậu Nho nhe có khả năng chống chịu tốt với các tác động bất lợi sinh học và phi sinh học, đặc biệt là có tính kháng côn trùng hại hạt trong quá trình bảo quản [4], [6], [7]. Vì vậy, đậu Nho nhe có thể được coi như là nguồn gen quý cho việc chuyển gen trong họ Đậu nhằm tạo ra các dòng cây chuyển gen có chống chịu tốt hơn với các stress từ ngoại cảnh và sâu bệnh hại. Để thực hiện được điều này, việc nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây đậu Nho nhe là rất cần thiết, bởi vì tỷ lệ thành công của việc chuyển

gen vào cây trồng phụ thuộc rất nhiều vào hệ thống nuôi cấy và tái sinh *in vitro* sau chuyển gen. Tái sinh cây *in vitro* với hiệu suất cao được xem là mấu chốt quyết định đến sự thành công trong quy trình tạo cây chuyển gen [8]. Jayanti Sen và đồng tác giả (đtg) (1998) đã công bố kết quả nghiên cứu tái sinh cây ở đậu xanh từ phôi soma và từ nách lá mầm phục vụ chuyển gen [9]. Sonia và đtg (2007) đã thu được kết quả chuyển gen mã hóa protein ức chế enzyme α -amylase vào cây đậu xanh thông qua lây nhiễm bằng *Agrobacterium* được thực hiện nhờ tái sinh đa chồi từ nách lá mầm [10]. Kết quả nghiên cứu đánh giá hiệu quả chuyển gen ở cây *Vigna mungo* khi sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* từ nách lá mầm cũng đã khẳng định hiệu quả của phương pháp này [11]. Nghiên cứu tái sinh đa chồi cây đậu Nho nhe cũng đã được Bhadra và đtg (1991) thực hiện thành công. Các chồi được tạo ra từ nách lá mầm của hạt đậu Nho nhe nảy mầm trên môi trường MS cơ bản bổ sung vitamin B5, sucrose 30%, NAA (0,1-0,5 mg/l), BA (0,5 mg/l), kinetin (0,5 mg/l) và zeatin (0,5-1 mg/l) [12]. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu tối ưu tái sinh đa chồi ở đậu Nho nhe được công bố ở Việt Nam. Vì vậy, trong bài báo này, nhóm tác giả trình bày kết quả nghiên cứu hệ thống tái sinh đa chồi *in vitro* ở cây đậu Nho nhe để phục vụ cho việc chuyển gen ở cây đậu đỗ.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu thực vật: Hạt đậu Nho nhe thu tại huyện Lục Yên, tỉnh Yên Bái đã được trồng tại vườn thực nghiệm và định danh loài dựa trên đặc điểm hình thái và chỉ thị phân tử. Hạt được khử trùng và cho nảy mầm trên môi trường GM để tạo thành cây con và thu chồi ngọn phục vụ nghiên cứu tái sinh *in vitro*.

Phương pháp khử trùng hạt, tạo cây con nuôi cấy *in vitro*: Hạt đậu Nho nhe được lách nhẹ trong cồn 70 độ trong thời gian 1 phút, sau đó được khử trùng với các nồng độ javen 50%, 60% và 70% trong thời gian 15 phút, 20 phút, 25 phút. Hạt sau khi khử trùng được thấm khô bằng giấy thấm khử trùng và cấy

vào môi trường nảy mầm gồm có MS (Murashine và Skoog, 1962) [13] bổ sung agar 9 g/l, sucrose 30 g/l.

Tái sinh đa chồi từ chồi ngọn: Hạt đậu Nho nhe sau khi gieo nảy mầm 6 ngày, cắt lấy phần chồi ngọn và cấy vào môi trường tái sinh chồi gồm: MS, sucrose 30 g/l; agar 9 g/l; nước dừa 10% và BAP có nồng độ khác nhau: (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) để nghiên cứu khả năng tái sinh đa chồi *in vitro*.

Tạo cây hoàn chỉnh: Khi chồi đạt chiều cao từ 4 - 5 cm, chuyển sang môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Môi trường ra rễ gồm MS; sucrose 30 g/l; agar 9 g/l và IBA (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l). Đánh giá khả năng hình thành và phát triển rễ của cây tái sinh sau 8 tuần.

Các giai đoạn nuôi cấy từ hạt sau khử trùng đến khi tạo cây hoàn chỉnh được tiến hành ở phòng nuôi với nhiệt độ dao động trong khoảng $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ ngày.

Đưa cây ra môi trường tự nhiên: Các bình nuôi cấy chứa cây tái sinh hoàn chỉnh được chuyển ra khỏi phòng nuôi cấy để trong phòng có ánh sáng và nhiệt độ bình thường trong 2 - 3 ngày, sau đó chuyển cây sang các loại giá thể khác nhau. Sau khi cây con sống, ra rễ và lá mới, có thể đưa ra ngoài vườn ươm và theo dõi tỷ lệ cây sống.

Phương pháp xử lý kết quả: Sử dụng phần mềm SPSS để phân tích các trị số thống kê như trung bình mẫu, sai số và so sánh sự khác

nhau giữa các trị số trung bình ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả khử trùng hạt đậu Nho nhe

Khử trùng mẫu là giai đoạn đầu tiên trong quy trình nhân giống *in vitro*, giai đoạn này cần phải đảm bảo mẫu cấy bị nhiễm ít nhất và tỷ lệ mẫu sống cao nhất, cây mầm sinh trưởng tốt nhất làm nguồn nguyên liệu cho quá trình tái sinh cây *in vitro*. Hạt đậu Nho nhe được khử trùng trong dung dịch javen nồng độ 50%, 60%, 70% trong thời gian 15, 20, 25 phút, sau đó được cấy vào môi trường cho hạt nảy mầm. Kết quả theo dõi tỷ lệ mẫu không bị nhiễm và tỷ lệ hạt nảy mầm sau 7 ngày nuôi cấy của 100 hạt sau khi khử trùng được trình bày ở bảng 1. Khi sử dụng dung dịch javen pha loãng 50% cho thấy, cùng với việc tăng thời gian khử trùng lên thì số mẫu không nhiễm tăng lên, từ 86% (CT1) đến 93% (CT3), và tỷ lệ hạt nảy mầm của ba công thức CT1, CT2, CT3 cũng tăng lần lượt là 86, 90, 91% tương ứng với thời gian khử trùng là 15, 20, 25 phút. Khi tăng nồng độ javen lên 60% và 70%, tỷ lệ hạt không bị nhiễm ở các khoảng thời gian khử trùng không có sự khác biệt giữa các công thức ở hai nồng độ javen này, đều đạt 94% khi khử trùng trong 15 phút (CT4, CT7) và 100% khi khử trùng trong 20 và 25 phút (CT5, CT6, CT8, CT9). Tuy nhiên, việc tăng thời gian khử trùng có thể làm giảm tỷ lệ mẫu bị nhiễm nhưng lại có ảnh hưởng không tốt tới khả năng nảy mầm của hạt.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ javen và thời gian khử trùng đến sự nảy mầm của hạt

Công thức (CT)	Javen (%)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ hạt không nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)
CT1	50	15	86	86
CT2		20	90	90
CT3		25	93	91
CT4	60	15	94	92
CT5		20	100	98
CT6		25	100	84
CT7	70	15	94	66
CT8		20	100	66
CT9		25	100	60

Khi sử dụng dung dịch javen pha loãng 70% để khử trùng hạt đậu Nho nhe cho thấy, 100% hạt đậu Nho nhe không bị nhiễm sau thời gian khử trùng 20 và 25 phút, nhưng số mẫu bị mất khả năng nảy mầm tăng cao thể hiện ở tỷ lệ hạt nảy mầm thấp nhất trong các công thức nghiên cứu, chỉ đạt 60% hạt nảy mầm ở CT9 (Javen 70%, 25 phút) và 66% ở CT7 và CT8. Như vậy, ở nồng độ javen 70%, khi tăng thời gian khử trùng lên thì tỷ lệ hạt không nhiễm tăng tối đa đạt 100%, nhưng tỷ lệ nảy mầm giảm thấp. Điều này chứng tỏ đây chưa phải nồng độ thích hợp để khử trùng hạt.

Đối với nồng độ javen 60%, tỷ lệ mẫu không nhiễm sau 15, 20, 25 phút khử trùng cũng tương tự như khi sử dụng dung dịch javen nồng độ 70%, tương ứng là 94%, 100% và 100%. Tuy nhiên, tỷ lệ hạt nảy mầm của các công thức sử dụng javen 60% cao hơn nhiều so với các công thức ở nồng độ javen 70%, cụ thể, đạt 92% ở CT4 (sau 15 phút) và đạt giá trị cao nhất sau 20 phút ở CT5 (98%), sau đó giảm xuống còn 84% ở CT6 (sau 25 phút).

Như vậy, kết quả nghiên cứu trên cho thấy, dung dịch javen nồng độ 60% với thời gian khử trùng trong 20 phút là thích hợp nhất cho khử trùng hạt đậu Nho nhe, tỷ lệ mẫu sạch đạt 100%, tỷ lệ nảy mầm cao lên tới 98%. Trong

thực tế, hạt đậu là đối tượng khó khử trùng, nếu khử trùng bằng javen ở nồng độ quá cao và thời gian quá dài thì tỷ lệ hạt bị tổn thương cao, hạt nảy mầm kém và không đồng đều. Ngược lại, nếu nồng độ javen thấp thì không đủ để làm sạch cũng như diệt các vi sinh vật, nấm mốc nên tỷ lệ hạt bị nhiễm sau khi cấy cao.

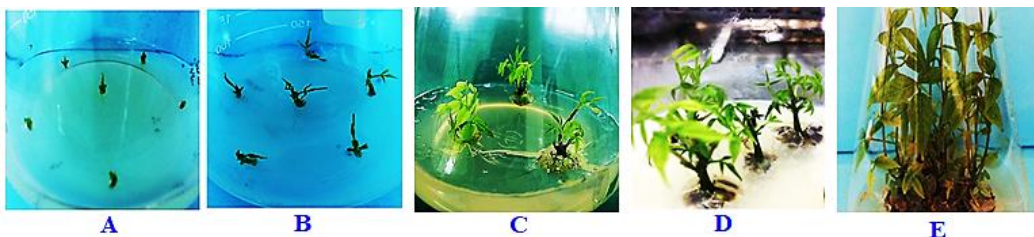
3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến tái sinh đa chồi từ chồi ngọn

BAP là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin. Trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật, các chất thuộc nhóm cytokinin thường được sử dụng để thúc đẩy sự phân hóa chồi, kích thích chồi phát triển. Tiến hành thử nghiệm tái sinh đa chồi từ lá mầm, mô sẹo và chồi ngọn, tuy nhiên chưa tìm được công thức phù hợp cho cảm ứng tạo chồi từ mắt lá mầm và mô sẹo, mà chỉ thành công đối với vật liệu tái sinh là chồi ngọn *in vitro*. Trong nghiên cứu này, các đoạn chồi ngọn của các cây đậu Nho nhe nảy mầm từ hạt đã khử trùng được cấy trên môi trường MS có bổ sung BAP với các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l). Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến tái sinh đa chồi của cây đậu Nho nhe sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 2 và hình 1.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến tái sinh đa chồi *in vitro* của cây đậu Nho nhe

Công thức	Nồng độ BAP (mg/l)	Số mẫu/CT (mẫu)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
ĐC	0,0	30	1,00 ^a ± 0,00	2,51 ± 0,17	
CT1	0,5	30	2,87 ^b ± 0,26	2,80 ± 0,31	-
CT2	1,0	30	3,07 ^b ± 0,42	2,04 ± 0,14	-
CT3	1,5	30	4,07 ^c ± 0,39	3,03 ± 0,14	+
CT4	2,0	30	1,63 ^a ± 0,16	1,81 ± 0,12	-

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong từng cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha=0,05$ bởi phương pháp Test Duncan. Chất lượng chồi: (-): chồi yếu, có màu vàng hoặc trắng; (+): chồi khỏe, mập, có màu xanh.



Hình 1. Hình ảnh đậu Nho nhe nuôi cấy trên môi trường cảm ứng chồi
A: sau 1 ngày; B: sau 2 tuần; C: sau 4 tuần; D: sau 6 tuần; E: sau 8 tuần

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hầu hết các đoạn chồi ngọn của đậu Nho nhe đều có khả năng tái sinh chồi trên môi trường nghiên cứu. Khả năng tạo đa chồi có sự khác biệt trên các môi trường khi thay đổi nồng độ BAP. Trên môi trường đối chứng không có chất điều hòa sinh trưởng, các mẫu cấy không có dấu hiệu cảm ứng tạo chồi. Điều đó cho thấy, các đoạn chồi ngọn của đậu Nho nhe không có đủ các chất điều hòa sinh trưởng nội sinh cần thiết mà phải cần được cung cấp từ bên ngoài môi trường để cảm ứng tạo chồi. Trên môi trường nuôi cấy có bổ sung BAP với nồng độ tăng dần từ 0,5 mg/l đến 2,0 mg/l, quan sát thấy số chồi/mẫu tăng, tăng cao nhất là môi trường nuôi cấy có bổ sung BAP 1,5 mg/l, hiệu quả tạo đa chồi đạt 4,07 chồi/mẫu. Các công thức thí nghiệm còn lại cho số chồi/mẫu đạt từ 1,63 đến 3,07 sau 8 tuần nuôi cấy.

Dựa trên kết quả theo dõi chỉ tiêu về chiều cao chồi cho thấy, khi tăng nồng độ BAP (0,5 mg/l đến 2,0 mg/l) thì chiều cao chồi tăng dần, tăng cao nhất là môi trường MS có bổ sung BAP 1,5 mg/l. Sau 8 tuần, chồi chính tăng từ 2,29 – 3,03 cm so với kích thước mẫu ban đầu. Bên cạnh đó, ở công thức có bổ sung BAP 1,5 mg/l, chồi mập, có màu xanh và sinh trưởng tốt hơn so với chồi ở các công thức thí nghiệm khác. Trong quá trình nghiên cứu hệ thống tái sinh cây *in vitro* từ đốt lá mầm của hai giống đậu tương ĐT12 và ĐT84, Nguyễn

Thị Thúy Hương và đtg (2009) cũng chỉ ra rằng khi tạo cảm ứng đa chồi trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/l BAP là thích hợp nhất [14]. Kết quả bài báo này cho thấy, cây đậu Nho nhe có thể tái sinh chồi *in vitro* cao trên môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP 1,5 mg/l, sucrose 30 mg/l, agar 9,0 g/l với chất lượng chồi tốt nhất.

3.3. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro*

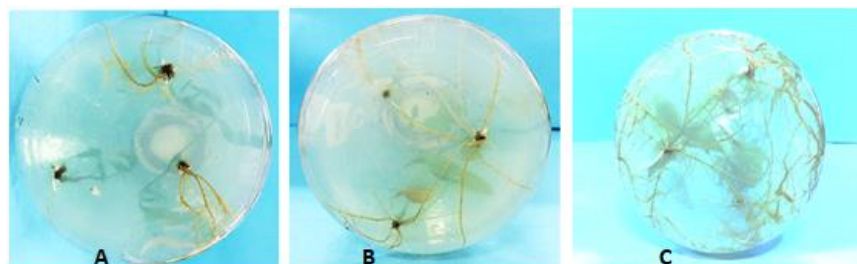
Giai đoạn ra rễ là công đoạn cuối cùng trong quy trình tái sinh để tạo cây tái sinh *in vitro* hoàn chỉnh. Ở giai đoạn này, chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin được sử dụng để kích thích sự ra rễ của chồi. Nhóm tác giả sử dụng IBA để xác định ảnh hưởng của nó đến sự hình thành rễ của chồi cây đậu Nho nhe. Các chồi sinh trưởng tốt, có chiều cao từ 4 - 5 cm, nhiều lá, màu xanh đậm được chuyển sang môi trường ra rễ được bổ sung nồng độ IBA khác nhau 0,1 mg/l; 0,2 mg/l; 0,3 mg/l; 0,4 mg/l; 0,5 mg/l.

Sau 1 tuần nuôi cấy, rễ đầu tiên bắt đầu xuất hiện trên môi trường IBA 0,3 mg/l. Sau 2 tuần, rễ xuất hiện ở tất cả môi trường IBA nghiên cứu nhưng chất lượng rễ ở các môi trường không giống nhau. Từ sau 4 tuần đến 8 tuần nuôi cấy, chiều dài của rễ tăng đáng kể và có thêm nhiều rễ phụ ở các công thức nghiên cứu (Hình 2).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng tạo rễ của chồi tái sinh

Công thức	Nồng độ IBA (mg/l)	Số mẫu/CT	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
MS0	0	30	2,57 ^a ± 0,26	3,09 ^a ± 0,18	Xấu
CT1	0,1	30	3,63 ^c ± 0,18	3,38 ^a ± 0,10	Xấu
CT2	0,2	30	2,73 ^a ± 0,28	3,21 ^a ± 0,22	Tốt
CT3	0,3	30	4,70 ^d ± 0,27	4,46 ^b ± 0,08	Tốt
CT4	0,4	30	3,33 ^b ± 0,25	3,27 ^a ± 0,20	Xấu
CT5	0,5	30	2,27 ^a ± 0,28	2,88 ^a ± 0,22	Xấu

Ghi chú: CT: công thức thí nghiệm; Các chữ cái khác nhau trong từng cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha=0,05$ bởi phương pháp Test Duncan. Chất lượng rễ: Rễ tốt: số lượng rễ nhiều, dài, mập, có màu trắng, khỏe; Rễ xấu: số lượng rễ ít, ngắn, còi cọc, có màu vàng nâu.



Hình 2. Hình ảnh nuôi cấy trên môi trường ra rễ (MS + IBA 0,3 mg/l + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l; pH = 5,8); A: sau 2 tuần; B: sau 4 tuần; C: sau 8 tuần

Kết quả theo dõi quá trình phát sinh rễ sau 8 tuần ở bảng 3 cho thấy, chỉ tiêu về số rễ/chồi thay đổi khác nhau tùy theo nồng độ IBA. Ở công thức đối chứng (MS0) số rễ trung bình trên chồi là 2,57 gần tương đương với số rễ trung bình ở công thức có bổ sung 0,2 và 0,5 mg/l IBA. Ở nồng độ 0,3 mg/l IBA thì số rễ trung bình đạt 4,70 rễ/chồi cao nhất (CT3) so với các công thức còn lại. Đặc điểm này cũng tương tự ở chỉ tiêu theo dõi là chiều dài rễ. Ở công thức CT3, chiều dài rễ cũng đạt cao nhất (4,46 cm) và chất lượng rễ tốt nhất, vượt qua ngưỡng nồng độ tối ưu này rễ sinh trưởng kém đi, ở công thức CT5 chiều dài rễ kém nhất so với các công thức khác.

Như vậy, môi trường bổ sung IBA với nồng độ 0,3 mg/l là thích hợp nhất cho sự ra rễ của đậu Nho nhe *in vitro*, tỷ lệ tạo rễ là 98% với số lượng rễ nhiều, mập khỏe, có màu trắng đục. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Nguyễn Thị Lài và đtg (2018) trong nhân giống *in vitro* cây Sâm cau. Tác giả cũng khẳng định việc bổ sung BAP với nồng độ 0,5 mg/l vào môi trường nuôi cấy tạo tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất và chất lượng rễ tốt nhất [15].

Tương tự, nghiên cứu của Nguyễn Thanh Hải và đtg (2019) cũng cho thấy môi trường ra rễ thích hợp cho chồi thảo quả là môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BA, hiệu quả ra rễ đạt 100% sau 8 tuần nuôi cấy [16].

3.4. Chuyển cây *in vitro* ra môi trường tự nhiên

Việc nghiên cứu điều kiện chuyển cây tái sinh *in vitro* ra ngoài môi trường cũng là một khâu rất quan trọng. Khi chuyển cây *in vitro* ra trồng ở vườn ươm, cây phải thích nghi với điều kiện

tự nhiên, không ổn định như trong phòng nuôi cấy. Các cây được lựa chọn để đưa ra môi trường ngoài tự nhiên là những cây khỏe mạnh, thân mập, lá có màu xanh đậm, bộ rễ khỏe có màu trắng đục (Hình 3).

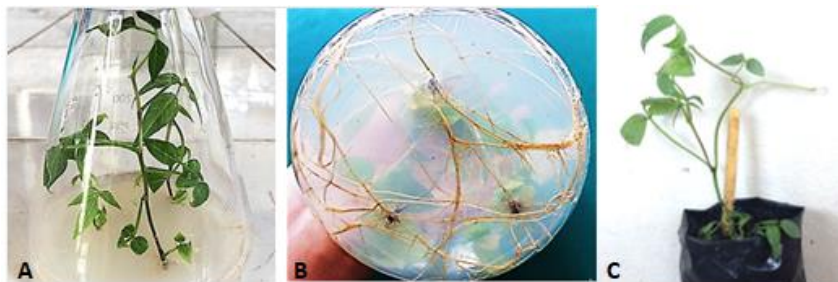
Nghiên cứu này đã sử dụng 4 loại giá thể khác nhau để xác định giá thể phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển cây đậu Nho nhe sau nuôi cấy *in vitro*. Các giá thể được sử dụng trong nghiên cứu của nhóm tác giả chia làm bốn công thức, đó là công thức CT1 chỉ bao gồm đất thịt; CT2 có tỷ lệ đất thịt : trấu hun là 2:1; CT3 có tỷ lệ đất thịt : cát là 2:1; CT4 có tỷ lệ cát : trấu hun là 1:1, kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể tới tỷ lệ sống của cây đậu Nho nhe tái sinh *in vitro*

Công thức	Giá thể	Tỷ lệ sống (%)
CT1	Đất thịt (100%)	80,00
CT2	Đất thịt : trấu hun (2:1)	98,00
CT3	Đất thịt : cát (2:1)	36,70
CT4	Cát : trấu hun (1:1)	33,33

Bảng 4 cho thấy cây đậu Nho nhe *in vitro* thích hợp với giá thể ở công thức CT1 (100% đất thịt) và công thức CT2 (2 đất thịt: 1 trấu hun). Thể hiện ở tỷ lệ cây sống cao, đạt 80% ở giá thể đất thịt 100% và 98% ở giá thể đất thịt : trấu hun tỷ lệ 2:1. Ở loại giá thể có cát trộn với đất thịt hoặc trấu hun tỷ lệ sống của cây giảm mạnh còn 33,33% (CT4) và 36,70% (CT3). Điều này khác với kết quả nghiên cứu hệ thống tái sinh *in vitro* ở cây Đậu xanh của Nguyễn Tuấn Điệp và đtg (2017) đã xác định cát và trấu hun (tỷ lệ 1:1) là giá thể phù hợp với tỷ lệ cây sống cao, đạt 100% [17]. Như

vậy, giá thể thích hợp để trồng cây đậu Nho nhe sau tái sinh *in vitro* là đất thịt : trấu hun với tỷ lệ 2:1. Kết quả này tương tự với công bố trong nghiên cứu nhân nhanh cây Nưa bằng kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật, trong các giá thể đã được sử dụng, thì giá thể đất và trấu hun là phù hợp nhất để trồng cây Nưa sau tái sinh cây hoàn chỉnh, đạt hiệu quả cây sống sót trong bầu là 95,3% [18].



Hình 3. Cây tái sinh *in vitro* trước khi chuyển ra bầu đất (A, B) và được trồng trong bầu đất chứa giá thể đất thịt, trấu hun tỷ lệ 2:1 sau 2 tuần (C)

4. Kết luận

Hạt đậu Nho nhe được khử trùng bằng cồn 70° trong 1 phút, nước javen 60% trong 20 phút cho tỷ lệ hạt nảy mầm 98%, tỷ lệ mẫu sạch 100%, và độ đồng đều của mầm cao. Môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP 1,5 mg/l, sucrose 30 g/l, agar 9 g/l, nước dừa 10% thích hợp cho tạo đa chồi từ chồi ngọn đậu

Nho nhe, số chồi/mẫu đạt 4,07, chồi mập, phát triển cân đối. Môi trường MS cơ bản có bổ sung IBA 0,3 mg/l, sucrose 30 g/l, agar 9 g/l thích hợp cho ra rễ cây đậu Nho nhe *in vitro*. Giá thể phù hợp để chuyển cây đậu Nho nhe *in vitro* ra ngoài tự nhiên là đất thịt và trấu hun với tỷ lệ 2:1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. Ohwi, and H. Ohashi, “*Vigna umbellata* (Thunb.)”, 2010 [Online]. Available: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/ild-3585>. [Accessed May 2020].
- [2]. R. Katoch, “Nutritional potential of rice bean (*Vigna umbellata*): An underutilized legume,” *Journal of food science*, vol. 78, no. 1, pp. 8-17, 2013.
- [3]. P. Saikia, C. R. Sarkar, and I. Borua, “Chemical composition, antinutritional factors and effect of cooking on nutritional quality of rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi),” *Food Chemistry*, vol. 67, no. 4, pp. 347-352, 1999.
- [4]. R. K. Ashaa, A. V. V. Koundinya, A. Das, and S. B. Chattopadhyay, “A review on an underutilised multipurpose legume: rice bean,” *Acta Horticulture*, vol. 1241, pp. 57-64, 2019.
- [5]. R. K. Arora, K. P. S. Chandel, B. S. Joshi, and K. C. Pant, “Rice bean: tribal pulse of Eastern India,” *Economic Botany*, vol. 34, pp. 260-263, 1980.
- [6]. B. V. Pavithravani, R. Gowda, K. Bhanuprakash, S. Ramesh, M. A. Rao, S. Subramanya, and C. Gireesh, “Biochemical Components: an index of bruchid resistance in rice bean [*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi],” *Legume Research*, vol. 36, no. 6, pp. 582-588, 2013.
- [7]. N. Tomooka, K. Kashiwaba, D. A. Vaughan, M. Ishimoto, and Y. Egawa, “The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchid beetles in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*,” *Euphytica*, vol. 115, pp. 27-41, 2000.
- [8]. J. Sambrook, and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001.
- [9]. S. Jayanti, and G. M. Sprá, “In vitro introduction of multiple shoots and plant regeneration in *Vigna*,” *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 34, no. 4, pp. 276-280, 1998.
- [10]. Sonia, R. Saini, R. P. Singh, and K. P. Jaiwal, “*Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor-1 gene into mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek using bar as selectable marker,”

- Plant Cell Reporters*, vol. 26, no. 2, pp. 187-198, 2007.
- [11]. M. Muruganantham, S. Amutha, N. Selvaraj, G. Vengadesan, and A. Ganapathi, "Efficient *Agrobacterium* mediated transformation of *Vigna mungo* using immature cotyledonary-node explants and phosphinothricin as the selection agent," *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 43, pp. 550-557, 2007.
- [12]. S. K. Bhadra, N. Hammatt, and M. R. Davey, "Tissue and protoplast culture of rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi)," *Tropical Agriculture*, vol. 68, no.4, pp. 345-348, 1991.
- [13]. T. Murashige, and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture," *Physiology Planta*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [14]. H. T. T. Nguyen, D. T. N. Tran, H. T. Nguyen, M. H. Chu, S. V. Le, and H. H. Chu, "Development of in vitro regeneration system in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) for gene transfer," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 52, no. 4, pp. 82-88, 2009.
- [15]. L. T. Nguyen, S. H. Pham, P. T. T. Bui, D. M. Pham, T. T. Do, B. T. Nguyen, and T. I. Nguyen, "Research on in vitro propagation of *Curculigo orchoides* Gaertn. From growing apex culture," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 60, no. 12, pp. 50-54, 2018.
- [16]. H. T. Nguyen, D. T. Nguyen, T. T. Nguyen, H. T. N. Nguyen, H. T. L. Nguyen, S. T. Dinh, T. T. T. Dang, L. T. T. Nguyen, and H. T. T. Pham, "In vitro propagation of cardamom (*Amomum aromaticum* Roxb.)," *Vietnam Journal of Agricultural Science*, vol. 17, no. 7, pp. 577-587, 2019.
- [17]. D. T. Nguyen, T. T. Hoang, and D. T. M. Nguyen, "The research of the regeneration systems on Mung Bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) for gene transfer," *Vietnam Science and Technology Journal of Agricultural and rular development*, vol. 11/2017, pp. 79-86, 2017.
- [18]. D. X. Le, and D. V. Nguyen, "Rapid multiplication of *Amorphophallus krausei* by tissue culture and plant cell techniques," *Journal of Tropical Science and Technology*, vol. 6, no. 3, pp. 37-45. 2014.