

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TÁI SINH *in vitro* CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU XANH (*Vigna radiata* L.)

Vũ Thị Thúy Hằng^{1,2}, Trần Thị Diễm Quỳnh³, Bùi Thị Quỳnh Trang³,
Vũ Thị Thương^{1,2}, Đoàn Thu Thủy^{1,2*}, Bùi Quang Tú³, Nguyễn Thanh Tuấn^{1,2}

¹Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
²Phòng Thí nghiệm Di truyền - Chọn giống cây trồng,
Trung tâm Nghiên cứu xuất sắc và Đổi mới sáng tạo, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
³Sinh viên Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: doanthuy@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 24.11.2025

Ngày chấp nhận đăng: 03.02.2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng tái sinh *in vitro* của các giống đậu xanh ở các điều kiện nuôi cấy và loại mẫu cây khác nhau. Nghiên cứu sử dụng 10 mẫu giống, các loại mẫu cây, nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng và kanamycin. Khả năng cảm ứng mô sẹo tăng theo nồng độ BAP và được thúc đẩy mạnh khi kết hợp NAA. Công thức 3-4 BAP + 1,0 mg/l NAA cho tỷ lệ tạo callus cao nhất (73,2-75,3%), đặc biệt ở mẫu chồi và trụ hạ diệp (~ 50%), trong khi mẫu lá có tỷ lệ thấp nhất (28,7%) và dễ nhiễm hơn (26,5%). Ở giai đoạn tái sinh chồi từ lá mầm, môi trường MS + 0,5-2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA cho hiệu quả cao nhất với tỷ lệ mẫu ra chồi đạt 80,0-82,2% và 0,8-1,7 chồi/mẫu. Giống HMB0024 biểu hiện khả năng tái sinh tốt (1,7 chồi/mẫu). Khả năng tạo rễ trên môi trường MS đạt 50,0-61,7% tùy giống; giống HMB0036 cho số rễ và chiều dài rễ cao nhất (10,1 rễ/mẫu; 9,0cm). Như vậy, môi trường tối ưu tạo callus từ chồi và thân là MS + 3-4 mg/l BAP + 1,0 mg/l NAA; môi trường tái sinh chồi từ lá mầm hiệu quả nhất là MS + 0,5-2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA. Nồng độ kanamycin 75-100 mg/l được xác định phù hợp cho sàng lọc trong chuyển gen hoặc chỉnh sửa gen ở đậu xanh.

Từ khóa: 6-Benzylaminopurine, chồi, Indole-3-Acetic Acid, kanamycin, lá mầm, môi trường MS.

In vitro Regeneration of Different Mungbean (*Vigna radiata* L.) Varieties

ABSTRACT

The study evaluated the *in vitro* regeneration of different mungbean varieties under different culture conditions and explant types. The study used 10 varieties and different explant types, concentrations of plant growth regulators, and kanamycin. The results showed that callus induction increased with higher BAP concentrations and was strongly enhanced when combined with NAA. Media containing 3-4 mg/l BAP +1.0 mg/l NAA produced the highest callus induction rates (73.2-75.3%), especially in shoot and hypocotyl explants (~ 50%), whereas leaf explants exhibited the lowest rate (28.7%) and were more susceptible to contamination (26.5%). In shoot regeneration from cotyledon, MS + 0.5-2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IAA yielded the best results, with shoot induction rates of 80.0-82.2% and 0.8-1.7 shoots/explant. HMB0024 showed the best regeneration capacity (1.7 shoots/explant). Root formation on MS was 50.0-61.7% depending on the variety; HMB0036 produced the highest number of roots and root length (10.1 roots/explant; 9.0cm). Thus, the optimal medium for callus induction from shoots and hypocotyls was MS + 3-4 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA, while shoot regeneration from cotyledonary leaves was most effective on MS + 0.5-2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IAA. Kanamycin concentrations of 75-100 mg/l were identified as suitable for screening cells, tissues or plants in genetic manipulation. The findings provide foundation for genetic transformation or genome editing in mungbean.

Keywords: 6-Benzylaminopurine, shoot, Indole-3-Acetic Acid, kanamycin, MS medium, cotyledon.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu xanh (*Vigna radiata* L.) là một trong những cây họ đậu có giá trị kinh tế và dinh

dưỡng cao, được trồng phổ biến ở nhiều nước châu Á với diện tích 6 triệu hecta, đặc biệt là Ấn Độ, Trung Quốc, Thái Lan và Việt Nam (Volpato & cs., 2025). Hạt đậu xanh chứa

20-28% protein, giàu lysine và methionine, là nguồn thực phẩm thiết yếu trong khẩu phần dinh dưỡng của người dân khu vực nhiệt đới (Tripathi & cs., 2022; Volpato & cs., 2025). Ngoài ra, cây đậu xanh có khả năng cố định đạm, góp phần cải tạo đất nên được sử dụng rộng rãi trong hệ thống canh tác luân canh và xen canh (Nair & cs., 2013).

Các phương pháp chọn giống truyền thống như lai hữu tính, gây đột biến hoặc chọn lọc dòng thuần thường mất thời gian dài (8-10 năm), trong khi nền di truyền hẹp do quá trình sử dụng lặp lại một số ít mẫu từ nguồn gen đậu xanh trong các chương trình chọn giống (Kumar, 2004). Áp dụng công cụ công nghệ sinh học, như cứu phôi, biến dị soma, chuyển gen hay chỉnh sửa gen là cách tiếp cận để mở rộng vốn gen và cải tiến cây trồng nói chung, cũng như cải tiến đậu xanh nói riêng, đặc biệt là đối với các tính trạng liên quan đến chống chịu sâu bệnh và điều kiện bất thuận (Yadav & cs., 2012; Bhowmik & cs., 2021). Tuy nhiên, để có thể ứng dụng công nghệ gen như chỉnh sửa gen, hệ thống tái sinh *in vitro* ở đậu xanh cần được thiết lập.

Các loài thuộc chi *Vigna* thể hiện tính đặc thù kiểu gen cao và có khả năng tái sinh kém hơn so với nhiều cây họ đậu khác (Atif & cs., 2013; Pratap & cs., 2018). Nghiên cứu về tái sinh *in vitro* ở đậu xanh được khởi đầu khá sớm, từ những năm 1979-1980 (Jaiwal & Gulati, 1995). Thành phần môi trường nuôi cấy thay đổi tùy theo loài, bộ phận, các giai đoạn phát triển, phân hóa khác nhau của mẫu cấy và mục đích nuôi cấy như duy trì mô ở trạng thái mô sẹo, tạo rễ, tạo mầm hoặc tái sinh cây hoàn chỉnh. Trong số các cytokinin, BAP được xác định để nhân chồi *in vitro* ở đậu xanh thông qua phát sinh mầm chồi và hình thành liên tục các chồi bất định (Yadav & cs., 2010; Patra & cs., 2018; Rathore & cs., 2023).

Ở Việt Nam, một số ít nghiên cứu về nuôi cấy mô đậu xanh được thực hiện và xác định yêu cầu các môi trường khác nhau đối với các giống khác nhau. Nguyễn Vũ Thanh Thanh & Chu Hoàng Mậu (2012) xác định MS + BAP 3,0 mg/l phù hợp để tạo chồi từ mẫu phôi của 8 giống đậu xanh và MS + NAA 0,3 mg/l thích hợp để tạo rễ.

Hoàng Thị Thao & cs. (2019) khảo sát sự phát sinh chồi dùng MS + BAP 2,5-4,0 mg/l ở giống ĐX22 và lá mầm, với tỷ lệ phát sinh chồi 75,6-86,7%. Các nghiên cứu trong nước mới dừng ở mức khảo nghiệm riêng lẻ một hoặc hai yếu tố, sử dụng một số ít loại mẫu và mẫu giống và ít có nghiên cứu tổng thể so sánh ảnh hưởng của các loại auxin khác nhau (như NAA, IAA), cũng như chưa đánh giá sự khác biệt giữa nhiều giống đậu xanh.

Như vậy, liệu có sự khác biệt về nguồn gen, loại mẫu cấy và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến sự tái sinh ở đậu xanh hay không? Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của BAP, NAA, IAA và kháng sinh kanamycin đến khả năng phát sinh hình thái (callus, chồi, rễ) ở các giống đậu xanh, từ đó làm cơ sở cho quy trình tái sinh cây đậu xanh *in vitro* ổn định và sử dụng cho các ứng dụng chuyển gen và chỉnh sửa gen ở đậu xanh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu gồm 10 giống đậu xanh (Bảng 1). Các hạt được lựa chọn có kích thước đồng đều, không bị nứt vỡ hoặc sâu bệnh.

2.2. Phương pháp thí nghiệm

Hạt được khử trùng như sau (1) Nhỏ 2-3 giọt xà phòng trong 0,5l nước, rửa hạt trong 3 phút; sau đó rửa lại hạt với nước 3 lần; (2) Trong tủ an toàn sinh học, hạt được rửa lại 3 lần với nước khử trùng; (3) Rửa hạt với cồn 70° trong 30 giây, rửa lại 3 lần với nước khử trùng; (4) Rửa hạt bằng dung dịch Javen 0,5% trong 10 phút, rửa lại 3 lần với nước khử trùng; (5) Rửa hạt bằng dung dịch Tween 0,5% trong 10 phút, rửa lại 3 lần với nước khử trùng; (6) Rửa hạt bằng dung dịch Presept 0,5% trong 10 phút, rửa lại 3 lần với nước khử trùng trước khi cho hạt vào môi trường nảy mầm.

Môi trường nảy mầm 1/2 MS + vitamin + 7 g/l agar + 30 g/l sucrose được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1atm trong 20 phút. Trong mỗi thí nghiệm, môi trường gồm MS + vitamin + 7 g/l agar + 30 g/l sucrose và được bổ sung BAP,

NAA, IAA với nồng độ tương ứng, pH = 5,8 và được hấp khử trùng. Căn cứ các kết quả nghiên cứu tái sinh ở đậu xanh như Yadav & cs. (2010) (BAP từ 0-17,75 mg/l, NAA từ 0,1-1 mg/l, IAA từ 0-0,1 mg/l), hay Hoàng Thị Thao & cs. (2019) (BAP 2,5-4,0 mg/l), nồng độ BAP, NAA và IAA trong thí nghiệm biến động tương ứng với mức 0-5 mg/l, 0-1 mg/l và 0,1 mg/l.

Mẫu sau khi đưa vào lọ nuôi cấy được đưa vào phòng nuôi cấy mô trong điều kiện ánh sáng 2.000-2.500lux, 12/12 giờ sáng/tối, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, được kiểm tra theo dõi thường xuyên và cấy chuyển sang môi trường ban đầu sau mỗi 7-10 ngày để loại bỏ phần hóa nâu và mẫu nhiễm (nếu có).

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của BAP, NAA và loại mẫu cấy đến sự phát sinh hình thái của đậu xanh

Thí nghiệm sử dụng 03 giống HMB0024, HMB0025 và HMB0077 (Bảng 1). Mẫu cấy gồm thân (trụ hạ diệp), chồi và lá non thu từ hạt nảy mầm sau 7 ngày (Hình 1.a-d). Môi trường khảo

sát BAP (0-5,0 mg/l) và NAA (0, 0,5 & 1,0 mg/l) (Bảng 2).

Các mẫu (lá, chồi, thân) có kích thước 0,5-1,0cm. Mỗi bình chứa 30ml môi trường, 5 mẫu/lọ, ~ 30 mẫu/loại mẫu cấy/giống.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của BAP, IAA và giống đến sự phát sinh chồi ở đậu xanh

Thí nghiệm sử dụng lá mầm thu từ hạt sau khi nảy mầm 3 ngày (Hình 1.e) của 09 giống HMB0013-A, HMB0024, HMB0025, HMB0033, HMB0034, HMB0036, HMB0037, HMB0046 và HMB0068. Môi trường khảo sát có BAP (0,5-5 mg/l) và IAA (0 & 0,1 mg/l) (Bảng 3). Thí nghiệm có 3 lần lặp, 10 mẫu/lần lặp.

Thí nghiệm 3: Khả năng tạo rễ in vitro của các giống đậu xanh

Thí nghiệm sử dụng chồi tái sinh (kích thước 3-5cm) của 04 giống HMB0013-A, HMB0024, HMB0025 và HMB0036 thu từ thí nghiệm 2 (Hình 1.f). Môi trường tạo rễ là MS.

Bảng 1. Các mẫu giống đậu xanh nghiên cứu

Kí hiệu	Tên giống	Nơi cung cấp
HMB0013-A	TV06425A-G	Trung tâm rau màu Thế giới
HMB0024	ĐX 208	Trung tâm tài nguyên thực vật
HMB0025	Tầm Thanh Hóa	Trung tâm tài nguyên thực vật
HMB0033	ĐXVN5	Trung tâm tài nguyên thực vật
HMB0034	ĐXVN6	Trung tâm tài nguyên thực vật
HMB0036	Berken	Trung tâm rau màu Thế giới
HMB0037	Kiloga	Trung tâm rau màu Thế giới
HMB0046	ĐX92-2	Trung tâm tài nguyên thực vật
HMB0068	Mongo Labo 2	Trung tâm rau màu Thế giới
HMB0077	TX 05	Học viện Nông nghiệp Việt Nam



(a) Cây con sau 7 ngày nảy mầm



(b) Mẫu cấy trụ hạ diệp



(c) Mẫu cấy chồi ngon



(d) Mẫu cấy lá non



(e) Lá mầm sau 3 ngày nảy mầm



(f) Chồi 3-5cm để tạo rễ

Hình 1. Loại mẫu cấy sử dụng đánh giá khả năng tái sinh in vitro ở đậu xanh

Bảng 2. Nồng độ BAP (0-5 mg/l) và NAA (0-1 mg/l) khảo sát ảnh hưởng môi trường nuôi cấy và loại mẫu cấy đến khả năng phát sinh hình thái ở đậu xanh

Công thức	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6	CT7	CT8	CT9
BAP (mg/l)	0	1	2	3	4	5	0	1	2
NAA (mg/l)	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5
Công thức	CT10	CT11	CT12	CT13	CT14	CT15	CT16	CT17	CT18
BAP (mg/l)	3	4	5	0	1	2	3	4	5
NAA (mg/l)	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1

Bảng 3. Nồng độ BAP (0,5-5 mg/l) và IAA (0 & 0,1 mg/l) khảo sát môi trường nuôi cấy và giống đến khả năng phát sinh hình thái ở đậu xanh

CT	Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ IAA (mg/l)
CT1	0,5	0
CT2	2	0
CT3	5	0
CT4	0,5	0,1
CT5	1,0	0,1
CT6	2	0,1
CT7	5	0,1

Thí nghiệm 4: Đánh giá ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên khả năng tái sinh ở đậu xanh

Thí nghiệm sử dụng lá mầm thu từ hạt nảy mầm sau 3 ngày của HMB0024 để đánh giá ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin với 6 nồng độ (0, 25, 35, 50, 75, 100 mg/l). Môi trường là MS + 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, 10 mẫu/lần lặp.

2.3. Chỉ tiêu theo dõi

Các chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ nhiễm (%), tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%), tỷ lệ phát sinh chồi (%), số chồi trung bình/mẫu, tỷ lệ ra rễ (%), số rễ trung bình/cây và chiều dài rễ (cm).

Tỷ lệ nhiễm (%) = (Số mẫu nhiễm/Tổng số mẫu cấy) × 100

Tỷ lệ nảy mầm (%) = (Số mẫu nảy mầm/Tổng số mẫu theo dõi) × 100

Tỷ lệ tạo callus (%) = (Số mẫu tạo callus/Tổng số mẫu theo dõi) × 100

Tỷ lệ tạo chồi (%) = (Số mẫu tạo chồi/Tổng số mẫu theo dõi) × 100

Tỷ lệ ra rễ (%) = (Số mẫu ra rễ/Tổng số mẫu theo dõi) × 100.

Kích thước chồi, số lượng chồi, màu sắc callus, rễ, kích thước rễ được quan sát và đánh giá.

2.4. Phân tích thống kê

Các dữ liệu được đánh giá 7 ngày/lần, tính giá trị trung bình ± sai số chuẩn (SE). Số liệu được xử lý bằng Minitab 20 để phân tích phương sai (ANOVA) cho một hoặc hai nhân tố (giống, môi trường) tương ứng với thí nghiệm và sử dụng phép kiểm định LSD (Least Significant Difference) để so sánh các giá trị trung bình ở mức ý nghĩa P < 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của BAP, NAA và loại mẫu cấy đến cảm ứng mô sẹo ở đậu xanh

Callus xuất hiện sau 10-12 ngày nuôi cấy và sau 4 tuần được đánh giá (Bảng 4). Tỷ lệ nhiễm từ 7% (CT6) - ~ 40% (CT10). CT9, CT10, CT11, CT14 có tỷ lệ nhiễm > 30%, đặc biệt CT10

với tỷ lệ nhiễm 41,5%. Ngược lại, CT16 và CT7 cho tỷ lệ nhiễm thấp (7,1% và 13,3%). Tỷ lệ tạo callus biến động từ 0% (CT1) - 75,3% (CT17). CT8, CT9, CT14, CT16, CT17 cho tỷ lệ tạo callus cao, 57,9%-75,3%. CT16 có tỷ lệ tạo callus cao (73,2%) và tỷ lệ nhiễm thấp (7,1%), trong khi CT10 có tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ tạo callus đều cao, lần lượt 41,5% và 47%.

BAP ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo callus do kích thích sự phân chia tế bào. Tỷ lệ tạo callus ở CT1 (0 mg/l BAP) là 0%, khi BAP tăng lên 2-5 mg/l (CT2-CT6) thì tỷ lệ tạo callus tăng, biến động 22,3%-41%. Bổ sung NAA có tác dụng tăng tỷ lệ hình thành callus và kích thích sự phát triển của rễ. Ở CT7-CT12 (0,5 mg/l NAA), nồng độ NAA thấp không ảnh hưởng tạo callus. Khi NAA ở mức 1 mg/l, tỷ lệ tạo callus cao, đặc biệt CT16 và CT17 đạt 73,2% và 75,3%. Kết hợp BAP ở mức 2 mg/l và NAA thấp (0,5 mg/l) cũng mang lại hiệu quả tạo callus cao (CT9-65,6%).

Như vậy, kết hợp NAA và BAP ở nồng độ cao kích thích sự hình thành callus.

Khả năng phát sinh hình thái của loại mẫu cấy khác nhau, với tỷ lệ tạo callus của chồi và thân khoảng 50%; trong khi lá có tỷ lệ tạo callus thấp nhất (28,7%) và nhiễm cao (26,5%). Giữa các giống, mặc dù HMB0077 có tỷ lệ nhiễm cao (31,2%) nhưng tỷ lệ tạo callus rất cao (60,9%). Ngược lại HMB0024 và HMB0025 có tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ tạo callus tương đối thấp (lần lượt 19,5%; 32,5% và 12,4%; 35,3%) (Bảng 5).

Lá là bộ phận khó tạo callus trừ CT2, CT4, CT5. Chồi và thân cho tỷ lệ tạo callus cao và tỷ lệ nhiễm thấp hơn, cho thấy đây là loại mẫu phù hợp để nuôi cấy và tạo callus. HMB0077 mặc dù có tiềm năng trong tạo callus nhưng tỷ lệ nhiễm khá cao. HMB0024 và HMB0025 có tỷ lệ nhiễm thấp nhưng tỷ lệ tạo callus thấp hơn (32,5-35,3%) nên cần nghiên cứu thêm về loại mẫu và môi trường nuôi cấy để tăng tỷ lệ tạo callus.

Bảng 4. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng phát sinh mô sẹo của đậu xanh sau 4 tuần nuôi cấy

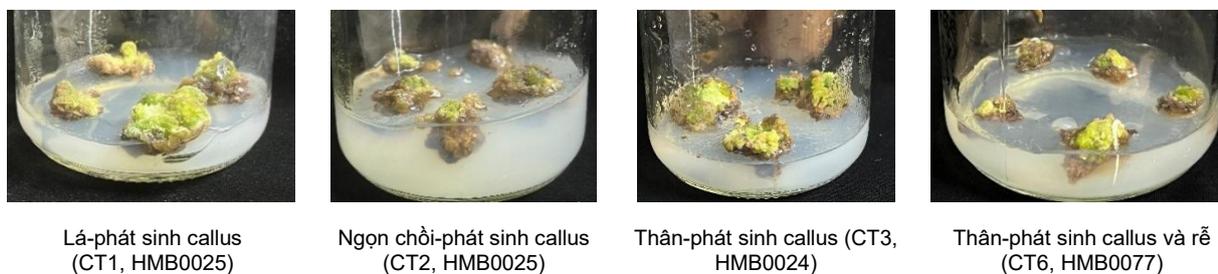
Công thức	Tổng số mẫu	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm trung bình (%) ± SE	Số mẫu không bị nhiễm	Số mẫu tạo callus	Tỷ lệ tạo callus trung bình (%) ± SE
CT1	246	30	11,7 ^{ab} ± 3,7	216	0	0 ^f
CT2	246	36	15,4 ^{ab} ± 5,3	210	65	31,9 ^{c-e} ± 8,8
CT3	252	60	23,9 ^{ab} ± 8,2	192	47	23,6 ^{d-f} ± 7,3
CT4	252	57	22,5 ^{ab} ± 7,0	195	44	22,3 ^{d-f} ± 6,0
CT5	240	36	14,8 ^{ab} ± 5,2	204	75	36,4 ^{b-d} ± 9,0
CT6	210	40	21,7 ^{ab} ± 9,1	170	60	41,0 ^{b-d} ± 9,4
CT7	180	24	13,3 ^{ab} ± 5,4	156	3	2,8 ^{ef} ± 2,8
CT8	156	24	12,2 ^{ab} ± 5,7	132	76	57,9 ^{a-c} ± 14,4
CT9	168	42	28,5 ^{ab} ± 8,7	126	77	65,6 ^{ab} ± 11,7
CT10	156	36	41,5 ^a ± 15,1	120	76	47,0 ^{a-d} ± 13,8
CT11	144	34	35,9 ^{ab} ± 13,7	110	70	61,2 ^{a-c} ± 14,0
CT12	144	30	17,8 ^{ab} ± 7,6	114	47	57,7 ^{a-c} ± 12,3
CT13	156	42	27,4 ^{ab} ± 11,0	114	9	4,2 ^{ef} ± 1,2
CT14	156	48	33,0 ^{ab} ± 10,6	108	64	58,8 ^{a-c} ± 13,6
CT15	162	42	20,0 ^{ab} ± 5,4	120	72	64,8 ^{ab} ± 10,1
CT16	132	11	7,1 ^b ± 6,1	121	77	73,2 ^a ± 7,6
CT17	138	24	13,9 ^{ab} ± 5,6	114	77	75,3 ^a ± 12,5
CT18	156	34	18,0 ^{ab} ± 7,4	122	57	48,5 ^{a-d} ± 12,4
Tổng	3294	650	21,0	2644	996	42,9

Ghi chú: SE: Sai số chuẩn. Các giá trị trong cùng cột có chữ cái khác nhau khác biệt nhau ở mức có ý nghĩa 0,05. Dấu “-” giữa các chữ cái thể hiện chữ theo tuần tự bảng chữ cái, ví dụ: a-c = abc, c-e = cde...; Nồng độ BAP (0-5 mg/l) và NAA (0-1 mg/l) - xem thí nghiệm 1.

Bảng 5. Ảnh hưởng của giống và loại mẫu cây đến khả năng phát sinh mô sẹo ở đậu xanh sau 4 tuần nuôi cấy

Giống	Loại mẫu	Tổng số mẫu	Tổng số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm trung bình (%) ± SE	Tổng số mẫu tạo callus	Tỷ lệ tạo callus trung bình (%) ± SE
HMB0024	Chồi	210	30	12,0 ^{bc} ± 6,0	59	36,3 ^{cd} ± 8,5
	Thân	234	21	13,2 ^{abc} ± 7,7	74	41,5 ^c ± 8,0
	Lá non	228	60	33,3 ^a ± 9,7	22	19,7 ^d ± 7,5
HMB0025	Chồi	510	60	11,1 ^c ± 3,7	185	42,4 ^c ± 5,3
	Thân	528	66	12,5 ^{abc} ± 3,7	199	43,6 ^c ± 7,1
	Lá	528	72	13,6 ^{abc} ± 3,3	92	19,9 ^d ± 3,9
HMB0077	Chồi	348	112	29,4 ^{abc} ± 5,4	145	71,9 ^a ± 9,4
	Thân	366	111	31,5 ^{abc} ± 4,0	139	64,5 ^{ab} ± 11,1
	Lá	342	118	32,5 ^{ab} ± 4,4	81	46,4 ^{bc} ± 10,0
Tổng		3294	650	19,7	996	37,7
Trung bình theo giống	HMB0024	672	111	19,5 ^b ± 4,7	155	32,5 ^b ± 4,7
	HMB0025	1566	198	12,4 ^b ± 2,0	476	35,3 ^b ± 3,5
	HMB0077	1056	341	31,2 ^a ± 2,6	365	60,9 ^a ± 5,9
Trung bình theo loại mẫu	Chồi	1068	202	17,5 ^a ± 3,1	389	50,2 ^a ± 5,0
	Thân	1128	198	19,1 ^a ± 3,3	412	49,9 ^a ± 5,2
	Lá	1098	250	26,5 ^a ± 3,9	195	28,7 ^b ± 4,6

Ghi chú: SE: Sai số chuẩn; Các giá trị trong cùng cột có chữ cái khác nhau khác biệt nhau có ý nghĩa ($P < 0,05$).



Hình 2. Phát sinh callus ở đậu xanh từ các mẫu khác nhau trên môi trường BAP và NAA

Callus hình thành sau 10-12 ngày, ban đầu có màu vàng nhạt, mềm, sau đó chuyển xanh sáng, tăng sinh nhanh và cứng dần (Hình 2). Ở nồng độ BAP thấp (< 1 mg/l), callus hình thành chậm, trong khi ở nồng độ NAA cao (> 1,5 mg/l), callus bị hóa nâu và chậm phát triển.

Kết quả nghiên cứu tương tự với AL-Saady & cs. (2019) khi tỷ lệ callus cao thu được trên môi trường MS + BAP 2 mg/l + NAA 0,5-1 mg/l (49,7-62,3%). Sử dụng các mẫu trụ hạ diệp, chồi ngọn và lá non thường chỉ phát sinh callus và sẽ

phát sinh rễ khi môi trường có NAA (Jaiwal & Gulatin, 1995; Sakthi & cs., 2022).

3.2. Ảnh hưởng của BAP, IAA và giống đến phát sinh chồi *in vitro* ở đậu xanh

Sử dụng lá mầm cho thấy có sự khác nhau giữa các công thức và các giống. Môi trường MS + 0,5-2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA (CT4-CT6) cho tỷ lệ phát sinh chồi cao nhất, từ 80-100%, trừ giống HMB0034 (40-60%) và số chồi trung bình biến động 0-2 chồi/mẫu (Bảng 6).

**Bảng 6. Ảnh hưởng của BAP, IAA và giống
đến khả năng phát sinh chồi ở 09 mẫu giống đậu xanh sau 4 tuần nuôi cấy**

Giống	Công thức	Tổng số mẫu cấy	Tổng số mẫu phát sinh chồi	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi trung bình (%)	Tổng số chồi phát sinh	Trung bình số chồi/mẫu
HMB0013-A	CT1	30	12	40	12	1,0
	CT2	30	9	30	18	2,0
	CT3	30	27	90	30	1,1
	CT4	30	27	90	42	1,6
	CT5	30	25	83	45	1,8
	CT6	30	30	100	48	1,6
	CT7	30	24	80	36	1,5
HMB0024	CT1	30	6	20	18	3,0
	CT2	30	9	30	12	1,3
	CT3	30	27	90	48	1,8
	CT4	30	6	20	9	1,5
	CT5	30	25	83	47	1,9
	CT6	30	30	100	60	2,0
	CT7	30	15	50	12	0,8
HMB0025	CT1	30	15	50	18	1,2
	CT2	30	24	80	24	1,0
	CT3	30	21	70	21	1,0
	CT4	30	30	100	36	1,2
	CT5	30	26	87	47	1,8
	CT6	30	21	70	24	1,1
	CT7	30	30	100	33	1,1
HMB0033	CT1	30	27	90	36	1,3
	CT2	30	15	50	18	1,2
	CT3	30	0	0	0	0
	CT4	30	30	100	39	1,3
	CT5	30	30	100	45	1,5
	CT6	30	30	100	39	1,3
	CT7	30	0	0	0	0
HMB0034	CT1	30	0	0	0	0
	CT2	30	0	0	0	0
	CT3	30	21	70	30	1,4
	CT4	30	18	60	27	1,5
	CT5	30	16	53	18	1,1
	CT6	30	12	40	18	1,5
	CT7	30	15	50	17	1,1
HMB0036	CT1	30	24	80	33	1,4
	CT2	30	30	100	27	0,9
	CT3	30	30	100	36	1,2
	CT4	30	27	90	45	1,7
	CT5	30	24	80	35	1,5
	CT6	30	27	90	33	1,2
	CT7	30	21	70	27	1,3

Đánh giá khả năng tái sinh *in vitro* của một số giống đậu xanh (*Vigna radiata* L.)

Giống	Công thức	Tổng số mẫu cấy	Tổng số mẫu phát sinh chồi	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi trung bình (%)	Tổng số chồi phát sinh	Trung bình số chồi/mẫu
HMB0037	CT1	30	24	80	21	0,9
	CT2	30	30	100	27	0,9
	CT3	30	18	60	21	1,2
	CT4	30	24	80	9	0,4
	CT5	30	24	80	20	0,8
	CT6	30	24	80	24	1,0
	CT7	30	21	70	21	1,0
HMB0046	CT1	30	15	50	24	1,6
	CT2	30	30	100	48	1,6
	CT3	30	30	100	27	0,9
	CT4	30	30	100	0	0
	CT5	30	24	80	20	0,8
	CT6	30	24	80	21	0,9
	CT7	30	30	100	27	0,9
HMB0068	CT1	30	3	10	6	2,0
	CT2	30	6	20	6	1,0
	CT3	30	24	80	18	0,8
	CT4	30	30	100	48	1,6
	CT5	30	27	90	31	1,1
	CT6	30	18	60	24	1,3
	CT7	30	15	50	12	0,8
Trung bình theo giống	HMB0013-A	210	154	73,3 ^{abc}	231	1,5
	HMB0024	210	118	56,2 ^{bc}	206	1,7
	HMB0025	210	167	79,5 ^{ab}	203	1,2
	HMB0033	210	132	62,9 ^{abc}	177	1,3
	HMB0034	210	82	39,1 ^c	110	1,3
	HMB0036	210	183	87,1 ^a	236	1,3
	HMB0037	210	165	78,6 ^{ab}	143	0,9
	HMB0046	210	183	87,1 ^a	167	0,9
HMB0068	210	123	58,6 ^{abc}	145	1,2	
						ns
Trung bình theo công thức	CT1	270	126	46,7 ^b	168	0,9
	CT2	270	153	56,7 ^{ab}	180	0,8
	CT3	270	198	73,3 ^{ab}	231	1,0
	CT4	270	222	82,2 ^a	255	1,1
	CT5	270	221	81,9 ^a	308	1,4
	CT6	270	216	80,0 ^a	291	1,3
	CT7	270	171	63,3 ^{ab}	185	1,1
						ns
Tổng		1890	1307	69,2	1618	1,2

Ghi chú: Các giá trị trong cùng cột có chữ cái khác nhau khác biệt nhau có ý nghĩa ($P < 0,05$), ns = not significant; Nồng độ BAP (0,5-5 mg/l) và IAA (0 & 0,1 mg/l) - xem thí nghiệm 2.

Giữa các giống, tổng số mẫu phát sinh chồi biến động 82-183, tỷ lệ mẫu phát sinh chồi từ 39,1-87,1%, tổng số chồi phát sinh 110-236 và trung bình 0,9-1,7 chồi/mẫu. HMB0036 có tỷ lệ phát sinh chồi và trung bình số chồi/mẫu cao (lần lượt là 87,1% và 1,3). HMB0013-A, HMB0024, HMB0025 cho tỷ lệ phát sinh chồi biến động 56,2%-79,5% và trung bình 1,2-1,7 chồi/mẫu. HMB0034 có số chồi/mẫu cao (1,3 chồi/mẫu) nhưng tỷ lệ phát sinh chồi thấp (39,1%). Giữa các công thức, tỷ lệ phát sinh chồi biến động từ 46,7%-82,2%, trung bình 0,8-1,4 chồi/mẫu. CT4, CT5 và CT6 cho kết quả tốt với tỷ lệ phát sinh chồi > 80%, trung bình 1,1-1,4 chồi/mẫu.

Như vậy, CT4, CT5 và CT6 cho tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (80-82,2%) và trung bình số chồi/mẫu cao nhất sau 4 tuần. HMB0013-A, HMB0024, HMB0025, HMB0036 cho tỷ lệ ra chồi >50% và trung bình >1 chồi/mẫu. Tripathi & cs. (2022) cũng xác định sử dụng lá mầm trên môi trường BAP 0,5-1,0 mg/l cho tuần suất xuất hiện chồi ổn định. Nồng độ BAP 0,5 mg/l cũng phát sinh chồi sớm hơn, trong khi BAP 2,0 mg/l cho nhiều chồi, nhưng chồi thường ngắn, ảnh hưởng đến quá trình tạo rễ. Yadav & cs. (2010) cũng cho thấy BAP ở nồng độ thấp cho phản ứng tái sinh tốt nhất.

3.3. Ảnh hưởng của giống đến khả năng tạo rễ *in vitro* ở đậu xanh

Chồi cao 3-5cm của 4 giống tốt nhất từ thí nghiệm 2 (HMB0013-A, HMB0024, HMB0025 và HMB0036) được chuyển sang môi trường tạo rễ MS (Bảng 7).

Sau ~ 7 ngày, một số mẫu bắt đầu ra rễ. Tỷ lệ trung bình mẫu ra rễ đạt 50-61,7%, trung

bình 54%. HMB0036 có khả năng tạo rễ mạnh và chất lượng rễ tốt, trung bình 10.1 rễ/mẫu và chiều dài rễ 9,0cm. HMB0013-A có tỷ lệ mẫu ra rễ cao (61,7%), trung bình 5,9 rễ/mẫu, chiều dài 6,2cm. HMB0024 và HMB0025 cho tỷ lệ mẫu ra rễ ở mức 50%. HMB0024 cho số lượng rễ ít hơn HMB0025 (3,6 so với 9,7 rễ/mẫu). Điều này có thể do trong môi trường tạo chồi trước đó, HMB0024 là giống bị nhiễm nhiều khiến chồi yếu hơn nên khả năng tạo rễ chưa được tốt.

Môi trường B5 không có auxin cũng có khả năng tạo rễ 65% (Yadav & cs., 2010; Himabindu & cs., 2014). Các nghiên cứu khác kết hợp IBA, IAA hoặc NAA để tạo rễ ở đậu xanh (Jaiwal & cs., 2001; Khatun & cs., 2008; Patra & cs., 2018; Tripathi & cs., 2022). Sự hình thành rễ ở các môi trường biến động theo giống, như MS + 0,2 mg/l NAA cho giống BINA mung 5 và BINA mung 7 (Khatun & cs., 2008), 1/2 MS + 0,5 mg/l IBA cho giống BARI mug-5 và BINA mug-5 (Hoque & cs., 2007). MS + 1 mg/l IBA cũng là môi trường tạo rễ trong các nghiên cứu chuyển gen đậu xanh (Jaiwal & cs., 2001; Sakthi & cs., 2022). Các nghiên cứu cho thấy kiểu gen khác nhau phản ứng khác nhau về khả năng tái sinh, không chỉ ở đậu xanh (Khatun & cs., 2008; Nguyễn Vũ Thanh Thanh & Chu Hoàng Mậu, 2012) mà còn ở cây trồng khác. Các kiểu gen khác nhau về mức biểu hiện và đáp ứng của các mạng gen phát triển liên quan đến hình thành mô phân sinh/chồi/phôi soma. Gen và yếu tố phiên mã chuyên biệt của thực vật, như *WUCHEL*, *BABY BOOM*, *GRF-GIF*, giữ vai trò then chốt trong quá trình phát sinh cơ quan và hình thành phôi khi nuôi cấy (Bakulin & cs., 2025).

Bảng 7. Khả năng tạo rễ của các giống đậu xanh trên môi trường MS sau 14 ngày nuôi cấy

Giống	Số mẫu chồi	Số mẫu ra rễ	Tỷ lệ mẫu ra rễ (%)	Số lượng rễ	Trung bình số rễ/mẫu	Trung bình chiều dài rễ (cm)
HMB0013-A	60	37	61,7	218	5,9	6,2
HMB0024	50	25	50,0	89	3,6	5,1
HMB0025	40	20	50,0	193	9,7	7,3
HMB0036	65	34	52,3	344	10,1	9,0
Tổng	215	116	54,0	844	7,3	7,02

Bảng 8. Ảnh hưởng của kanamycin đến khả năng tái sinh chồi đậu xanh sau 4 tuần

Nồng độ kanamycin (mg/l)	Tổng số chồi	Trung bình số chồi/mẫu	Kích thước chồi (cm)
0	18,3 ^a	1,8 ^a	1,11 ^a
25	16,0 ^a	1,6 ^a	1,05 ^{ab}
35	8,3 ^{ab}	0,8 ^{ab}	0,99 ^{ab}
50	8,0 ^{ab}	0,8 ^{ab}	0,94 ^{ab}
75	0,7 ^b	0,1 ^b	0,3 ^{bc}
100	0 ^b	0 ^b	0 ^c

Ghi chú: Các giá trị trong cùng cột có chữ cái khác nhau khác biệt nhau có ý nghĩa ($P < 0,05$).

3.4. Ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên khả năng tái sinh ở đậu xanh

Nồng độ kanamycin ảnh hưởng rõ rệt lên khả năng tái sinh chồi đậu xanh sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 8). Với đối chứng (0 mg/l), số lượng chồi tái sinh đạt cao nhất, 18,3 chồi, 1,8 chồi/mẫu và kích thước dài nhất (1,11cm). Khi tăng nồng độ kanamycin lên 25 mg/l, số lượng và kích thước chồi giảm nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Từ nồng độ 35-50 mg/l, số lượng và kích thước chồi giảm rõ rệt, còn khoảng 8,0-8,3 chồi và kích thước chồi < 1cm. Kanamycin đã ức chế đến sự phân chia và kéo dài tế bào. Khi nồng độ cao hơn (75 và 100 mg/l), khả năng tái sinh bị ức chế mạnh và rõ rệt. Với nồng độ 75 mg/l, chồi hầu như không hình thành (tổng 0,7 chồi và 0,1 chồi/mẫu), kích thước rất nhỏ. Ở 100 mg/l, mẫu hoàn toàn không tái sinh. Tương tự, Yadav & cs. (2012) cũng cho thấy nồng độ kanamycin cao ảnh hưởng đến sự tái sinh chồi, màu sắc chồi và chồi không hình thành khi nồng độ ≥ 100 mg/l. Tuy nhiên, các giống khác nhau có thể có phản ứng và mức chịu đựng khác nhau với kanamycin. Trong thí nghiệm này, nồng độ kanamycin 75-100 mg/l có thể sử dụng để chọn lọc đậu xanh trong nghiên cứu công nghệ gen.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác lập các môi trường phù hợp cho từng giai đoạn tái sinh đậu xanh. Mẫu chồi và trụ hạ diệp cho cảm ứng mô sẹo tối ưu trên môi trường MS + BAP 3-4 mg/l + NAA 1 mg/l. Lá mầm phát sinh chồi ổn định trên môi

trường MS + BAP 0,5-2,0 mg/l + IAA 0,1 mg/l. HMB0013-A, HMB0024, HMB0025 và HMB0036 có khả năng tái sinh tốt nên là nguồn vật liệu sử dụng trong các nghiên cứu liên quan chuyển gen, chỉnh sửa gen ở đậu xanh. Các giống cho khả năng tạo rễ trên MS với tỷ lệ từ 50-61,7%. Nồng độ kháng sinh kanamycin 75-100 mg/l có thể được sử dụng để sàng lọc mô, tế bào, cây đậu xanh khi chuyển gen. Các kết quả này cung cấp nền tảng quy trình cho các ứng dụng công nghệ gen trên nguồn vật liệu đậu xanh trong nước.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Quỹ Nafosted đã tài trợ cho nghiên cứu. Kết quả của nghiên cứu là một phần trong nội dung đề tài “Nghiên cứu tạo đột biến gen nhằm thúc đẩy thời gian nở hoa sớm và tập trung ở đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) bằng CRISPR-Cas9”- mã số 106.02-2023.19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- AL-Saady H.A.A, ElKaaby E.A.J. & AL-Kaisy W.A.M. (2019). *In vitro* response different explants of mungbean seedlings (*Vigna radiata* L.) for plant growth hormones. J. Pharm. Sci. & Res. 11(4): 1227-1230.
- Atif R.M., Patat-Ochatt E.M., Svabova L., Ondrej V., Klenoticova H., Jacas L., Griga M. & Ochatt S.J. (2013). Gene transfer in legumes. Progress in Botany. 74: 37-100.
- Bakulin S.D., Monakhos S.G. & Bruskin S.A. (2025). Morphogenetic factors as a tool for enhancing plant regeneration capacity during *in vitro* transformation. International Journal of Molecular Sciences. 26(17): 8583.

- Bhowmik P., Konkin D., Polowick P., Hodgins C.L., Subedi M., Xiang D., Yu B., Patterson N., Rajagopalan N., Babic V., Ro K., Bandara M., Smyth S.J., Cui Y. & Kagale S. (2021). *Crispr/Cas9* gene editing in legume crops: Opportunities and challenges. *Legume Science*. 3: e96.
- Himabindu Y., Reddy M.C. & Chandrasekhar T. (2014). *In vitro* regeneration of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] cultivar Vamban-2 using cotyledonary nodes. *CIBTech Journal of Biotechnology*. 3: 11-15.
- Hoàng Thị Thao, Nguyễn Tuấn Điệp, Chu Đức Hà, Hoàng Thị Mai, Lê Văn Sơn & Chu Hoàng Mậu (2019). Thiết lập và đánh giá hiệu quả của quy trình chuyển gen *VrD1* trên giống đậu xanh ĐX22. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 9(106): 43-48.
- Hoque M.I., Zahan M.M. & Sarker R.H. (2007). *In vitro* plant regeneration in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Tissue Cult. & Biotech*. 17(2): 209-216.
- Jaiwal P.K. & Gulati A. (1995). Current status and future strategies of *in vitro* culture techniques for genetic improvement of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica*. 86: 167-181.
- Jaiwal P.K., Kumari R., Ignacimuthu S., Potrykus I. & Sautter C. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) - A recalcitrant grain legume. *Plant Science*. 161(2): 239-247.
- Khatun M.K., Haque M.S., Islam S. & Nasiruddin K.M. (2008). *In vitro* regeneration of mungbean (*Vigna radiata* L.) from different explants. *Progress. Agric*. 19(2): 13-19.
- Kumar S., Gupta S., Chandra S. & Singh B.B. (2004). How wide is the genetic base of pulse crops. In: Ali M., Singh B.B., Kumar S., Vishwa D., (Eds). *Pulses in New Perspective*, IIPR, Kanpur: 211-221.
- Nair R.M., Yang R.Y., Easdown W.J., Thavarajah D., Thavarajah P., Hughes Jd. & Keatinge J.D. (2013). Biofortification of mungbean (*Vigna radiata*) as a whole food to enhance human health. *J Sci Food Agric*. 93(8): 1805-1813.
- Nguyễn Vũ Thanh Thanh & Chu Hoàng Mậu (2012). Khả năng chịu mất nước và tái sinh của mô sẹo ở cây đậu xanh - *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Tạp chí Sinh học*. 34(1): 107-113.
- Patra A.P., Samal K.C., Rout G.R., Sahu S. & Jagadev P.N. (2018). *In vitro* regeneration of recalcitrant green gram (*Vigna radiata* L. Wilczek) from immature cotyledons for genetic improvement. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(1): 3072-3080.
- Pratap A., Prajapati U., Singh C.M., Gupta S., Rathore M., Malviya N., Tomar R., Gupta A.K., Tripathi S. & Singh N.P. (2018). Potential, constraints and applications of *in vitro* methods in improving grain legumes. *Plant Breeding*. 137: 235-249.
- Rathore N., Tripathi A., Kushwah N.S. & Singh N.P (2022). Multiple shoot regeneration from detached embryonic axis in greengram (*Vigna radiata*) cv.SML 668. *Legume Research*. 46: 324-330.
- Sakthi A.R., Pavithra H., Gnanam R., Raveendran M. & Sudha M. (2022). Differential response of *in vitro* derived explants of mungbean under varied hormonal regimes. *The Pharma Innovation Journal*. 11(7): 43-46.
- Tripathi A., Kushwah N.S., Debnath S.C., Shukla S. & Rathore M. (2022). Investigating the *in vitro* regeneration potential of mungbean cultivar Samrat. *Journal of Food Legumes*. 35(3): 198-206.
- Volpato S., Gomez N.d., Giménez F.M. & Ciampitti I.A. (2025). A global dataset on mungbean for managing seed yield and quality. *Sci Data*. 12: 658.
- Yadav S.K., Katikala S., Yellisetty V. Kannepalle A., Narayana J.L., Maddi V., Mandapaka M., Shanker A.K., Bandi V. & Bharadwaja K.P. (2012). Optimization of *Agrobacterium* mediated genetic transformation of cotyledonary node explants of *Vigna radiata*. *Springerplus*. 1(1): 59.
- Yadav S.K., Sreenu P., Maheswari M., Vanaja M., Venkateswarlu B. (2010). Efficient shoot regeneration from double cotyledonary node explants of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Indian Journal of Biotechnology*. 9: 403-407.