

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH NHÂN *IN VITRO* CÂY HÀNH CÚ (*Allium cepa* var. *aggregatum*)

Nguyễn Trọng Khanh¹, Đoàn Xuân Cảnh¹, Phạm Thiên Thành^{1,*},
Lê Thị Thanh¹, Lê Thị Thu Trang¹, Đỗ Thị Thanh Thanh¹,
Tống Thị Huyền¹, Phạm Thị Hiệp¹, Nguyễn Đình Thiệu¹

TÓM TẮT

Áp dụng phương pháp nhân *in vitro* tạo cây hành giống phục vụ sản xuất là giải pháp tăng chất lượng cây giống. Ba giống hành Hải Dương gồm: Hành Trắng, hành Tím và hành Xanh được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân *in vitro* tạo cây giống hoàn chỉnh. Thử nghiệm các chất khử trùng cho thấy, NaOCl 3% khử mẫu trong 20 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 93,33% và tỷ lệ mẫu chết thấp 8,33%. Môi trường nhân chồi MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar + 1,5 mg/l kinetine + 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ nảy chồi và hệ số nhân chồi cao nhất, lần lượt là 87,6 - 93,3% và 9,5 - 10,5 chồi/mẫu. Môi trường tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất cho các giống hành là MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l IBA. Công thức này cho tỷ lệ ra rễ dao động 95,58 - 97,5%, số lá từ 3,4 - 3,53 lá/mẫu, chiều cao cây từ 18,3 - 18,5 cm, số rễ từ 5,33 - 5,63 rễ/mẫu. Cây con hoàn chỉnh trồng trên giá thể gồm 25% xơ dừa + 25% tro + 50% đất phù sa có tỷ lệ sống 100%, số lá dao động 3,37 - 3,5 lá và chiều cao cây 13,5 - 13,7 cm sau hai tuần ươm cây. Quy trình nhân *in vitro* cây hành có hệ số nhân cao và cây con có sức sống tốt là tiền đề cho nghiên cứu khả năng ứng dụng vào thực tiễn sản xuất.

Từ khóa: Hành (*Allium cepa* var. *aggregatum*), nhân giống vô tính, *in vitro*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hành củ shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum*) là loại rau gia vị được sử dụng phổ biến trong bữa ăn hàng ngày ở Việt Nam. Ở tỉnh Hải Dương, hành củ được canh tác hàng năm với diện tích 6.000 ha và mang lại lợi nhuận cho người nông dân từ 170 - 270 triệu đồng/ha. Theo số liệu điều tra của Sở Nông nghiệp và PTNT tỉnh Hải Dương năm 2020, nông dân tại huyện Kinh Môn, tỉnh Hải Dương canh tác chủ yếu 3 giống hành củ là hành Trắng, hành Tím và hành Xanh. Các giống hành này là cây ôn đới, sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện khí hậu mát lạnh nhưng rất kém chịu nhiệt. Vì vậy, ở vùng đồng bằng sông Hồng nói chung và tỉnh Hải Dương nói riêng, các giống hành này được trồng chủ yếu trong vụ đông (trồng tháng 10, 11 và thu hoạch vào tháng 1, 2 năm sau).

Củ hành giống được bảo quản, cất giữ trong khoảng thời gian 8 tháng, từ tháng 3 đến tháng 10. Trong điều kiện khí hậu nóng ẩm, mưa nhiều ở đồng bằng sông Hồng, tỷ lệ thối hỏng củ rất cao, gây thiệt hại lớn về kinh tế cho người sản xuất. Theo truyền thống, người dân thường để giống bằng củ, phương pháp này gặp một số khó khăn như tỷ lệ mọc mầm củ giống kém, tỷ lệ thoái hóa giống cao, nguy cơ mang mầm bệnh cao, đặc biệt là các bệnh do virus như: Onion yellow dwarf virus (OYDV), Leek yellow stripe virus (LYSV) và Shallote yellow stunt virus (SYSV) [1]. Nguồn giống nhiễm virus làm giảm đáng kể năng suất cũng như chất lượng củ, do vậy bên cạnh những biện pháp truyền thống như chọn lựa củ giống và cây con khỏe thì việc xây dựng quy trình sản xuất củ giống hành sạch bệnh bắt nguồn từ nuôi cấy meristem là yêu cầu cấp bách đặt ra trong thực tiễn sản xuất. Để khắc phục những khó khăn, đã sử dụng phương pháp có tính khả thi cao là tạo ra các vật liệu nhân giống sạch bệnh virus qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Meristems) kết hợp với xử

¹ Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm

* Email: thanhpttm@gmail.com

lý nhiệt độ [2]. Phương pháp này đã giúp loại trừ các bệnh virus, viroid và các tác nhân gây bệnh tương tự virus ra khỏi vật liệu nhân giống và tạo ra giống sạch bệnh [3], cung cấp cho nhu cầu giống của người dân.

Trong nghiên cứu này, đã đưa ra phương pháp nuôi cấy *in vitro* nhân hành giống nhằm chủ động được nguồn giống hành phục vụ sản xuất, không dùng thuốc bảo vệ thực vật để bảo quản giống, tiết kiệm được chi phí và tạo được nguồn hành giống sạch bệnh, giúp tăng năng suất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Ba giống hành thu thập tại tỉnh Hải Dương gồm hành Trắng, hành Tím và hành Xanh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được tiến hành trên môi trường cơ bản MS [4]; 5 g/l agar; 30 g/l sucrose; pH 5,8 và các chất kích thích sinh trưởng. Điều kiện nuôi cấy: 25 - 28°C, độ ẩm: 70 - 80%, thời gian chiếu sáng: 16 giờ sáng/8 giờ tối, cường độ ánh sáng: 2.000 - 2.500 Lux. Thí nghiệm trong phòng được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên RCB [5], lặp lại 3 lần, mỗi lần nhắc 10 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu.

Khử trùng mẫu:

Củ hành giống khỏe mạnh được bóc lớp vỏ ngoài, rửa với xà phòng loãng sau đó rửa sạch dưới vòi nước. Mẫu sau đó được đưa vào lọ thí nghiệm chứa các chất khử trùng với nồng độ, thời gian khác nhau (HgCl_2 0,1% và 0,2% trong 5 phút, 10 phút; NaOCl 2%, 3% trong 15 và 20 phút; $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 10%, 15% trong 5 và 10 phút). Sau khi khử trùng, mẫu được đưa vào buồng cấy loại bỏ lớp vỏ, phần nhân chứa đỉnh sinh trưởng (mẫu nuôi cấy) kích thước 3-5 mm được bổ thành 4 phần và cấy vào môi trường cơ bản MS [4]; 5 g/l agar; 30 g/l sucrose; pH 5,8. Sau 7 ngày đánh giá kết quả thí nghiệm của các công thức.

Nuôi cấy tạo chồi:

Nguồn vật liệu được khử trùng và cấy lên môi trường MS; 5 g/l agar; 30 g/l sucrose; pH 5,8 có bổ sung kinetine (1; 1,5; 2; 2,5 mg/l); công thức nồng độ kinatine tốt nhất được kết hợp với Naphthalene acetic acid (NAA: 0,25; 0,5; 1; 1,25

mg/l). Khả năng tạo chồi được đánh giá sau bốn tuần nuôi cấy. Hệ số nhân chồi trung bình được tính trên đơn vị số chồi/mẫu cấy.

Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh:

Từ môi trường tạo chồi, mẫu được chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh gồm MS cơ bản; 5 g/l agar; 30 g/l sucrose; pH 5,8 và các chất điều tiết sinh trưởng: NAA (1; 1,5; 2; 2,5 mg/l), Indole-3-butyric acid (IBA: 0,25; 0,5; 1; 1,5 mg/l). Sau 4 tuần nuôi cấy, đánh giá khả năng sinh trưởng: Chiều cao cây, số lá/mẫu, tỷ lệ ra rễ và số rễ/mẫu.

Nghiên cứu giá thể cho cây hoàn chỉnh:

Cây con hoàn chỉnh được trồng trong 4 loại giá thể: 100% xơ dừa; 50% xơ dừa + 50% đất phù sa; 50% trấu tươi + 50% đất phù sa; 25% xơ dừa + 25% tro + 50% đất phù sa. Mỗi công thức thực hiện với 100 cây/giống, lặp lại 3 lần. Cây con được đặt trong nhà lưới, sau trồng 2 tuần theo dõi, đếm số cây sống, số lá/cây và chiều cao cây.

Xử lý số liệu:

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2013 và IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu vô trùng

Khi không khử trùng với HgCl_2 , NaOCl, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ thì 100% mẫu đưa vào đều bị nhiễm nấm, vi khuẩn (Hình 1A). Phản ứng của mẫu cấy với 3 hóa chất khử trùng sau 3 tuần nuôi cấy khá giống nhau. Khi xử lý mẫu với HgCl_2 (0,1%; 0,2%), NaOCl (2%; 3%), $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (10%; 15%) trong thời gian càng dài thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao, tuy nhiên tỷ lệ mẫu chết cũng tăng lên. Xử lý với HgCl_2 nồng độ 0,2% trong thời gian 10 phút cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (98,33%), nhưng tỷ lệ mẫu chết tương đối cao (15%). Sử dụng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 15% trong 10 phút cho tỷ lệ mẫu sạch 90%, nhưng tỷ lệ mẫu chết cao nhất (19,17%). Sử dụng NaOCl 3% khử trùng trong thời gian 20 phút cho hiệu quả tốt nhất. Tỷ lệ mẫu sạch đạt 93,33%, tỷ lệ mẫu nhiễm 6,67% và tỷ lệ mẫu chết 8,33% (Bảng 1, hình 1B). Như vậy, NaOCl nồng độ 3% được lựa chọn để khử trùng mẫu trong 20 phút cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng và thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch

Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian xử lý (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
HgCl ₂	0,1	5	92,50	7,50	12,50
	0,1	10	94,17	5,83	14,17
	0,2	5	95,83	4,17	13,33
	0,2	10	98,33	1,67	15,00
Ca(OCl) ₂	10	5	84,17	15,83	16,67
	10	10	87,50	12,50	18,33
	15	5	88,33	11,67	17,50
	15	10	90,00	10,00	19,17
NaOCl	2	15	86,67	13,33	14,17
	2	20	90,83	9,17	15,83
	3	15	91,67	8,33	8,33
	3	20	93,33	6,67	8,33
Không khử trùng			0,00	100,00	100,00

Ghi chú: Môi trường nền MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar, pH = 5,8.



A



B

Hình 1. Mẫu cấy 2 tuần tuổi trên môi trường MS + 30 g đường/lít + agar 5 g/lít, pH = 5,8

A) Mẫu không được khử trùng; B) Mẫu được khử trùng NaOCl nồng độ 3% trong 20 phút

3.2. Xác định môi trường nuôi cấy tạo chồi

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, chất điều tiết sinh trưởng được bổ sung vào môi trường nhằm kích thích sự phát sinh hình thái của mẫu cấy [4]. Hai nhóm chất kích thích sinh trưởng được sử dụng trong thí nghiệm này là auxin và cytokinin. Chất kích thích sinh trưởng của hai nhóm này được sử dụng riêng rẽ và kết hợp nhằm điều khiển sự phát sinh hình thái các giống hành Hải Dương trong nhân *in vitro*.

Trong môi trường MS, các giống hành có tỷ lệ nảy chồi từ 66,6 - 73,3%, với hệ số nhân chồi từ 1,07 - 1,33 chồi. Khi bổ sung kinetone, tỷ lệ mẫu nảy chồi (73,3 - 93,3%) và hệ số nhân chồi (2,07 - 3,33) cả ba giống hành đều tăng. Khi tăng nồng độ kinetone thì các chỉ tiêu tỷ lệ nảy chồi và hệ số nhân chồi tăng và đạt cao nhất ở nồng độ 1,5 mg/l. Ở nồng độ kinetone 1,5 mg/l, tỷ lệ mẫu nảy chồi và hệ số nhân cao nhất là hành Tím (93,33% và 3,33). Hành Xanh cho tỷ lệ mẫu nảy chồi và hệ số nhân thấp nhất (80,00% và 2,53). Chất điều tiết sinh trưởng kinetone được Nguyễn Thị Thanh Phương và Nguyễn Thị Lý Anh (2012) [6] sử dụng trong nghiên cứu tạo chồi cây tỏi, theo đó tỷ lệ tạo chồi (44,8 - 62,8%) và hệ số nhân chồi (0,78 - 1,27) cây

tỏi thấp hơn so với cây hành trong thí nghiệm này. Đồng thời nồng độ kinetone 1,5 mg/l cho hiệu quả cao nhất. Như vậy nồng độ 1,5 mg/l kinetone được chọn sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Trong nghiên cứu này, nồng độ kinetone tối ưu (1,5 mg/l) được kết hợp với NAA nồng độ 0,25 - 1,25 mg/l. Khi tăng nồng độ NAA từ 0,25 - 0,5 mg/l thì tỷ lệ nảy chồi cũng như hệ số nhân chồi tăng và đạt cao nhất ở 0,5 mg/l NAA (Bảng 3). Ở công thức 1,5 mg/l kinetone kết hợp 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ nảy chồi dao động từ 87,6 - 93,3% và hệ số nhân chồi dao động từ 9,5 - 10,5 chồi.

Trong cùng một công thức môi trường, tỷ lệ nảy chồi và hệ số nhân chồi của 3 giống hành chênh lệch không lớn. Tuy nhiên, môi trường MS có kết hợp kinetone và NAA cho hệ số nhân chồi cao hơn khi bổ sung riêng rẽ kinetone (Bảng 2 và 3). Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng sự kết hợp giữa các chất auxin và cytokinin có thể làm tăng khả năng tái sinh và tăng sự sinh trưởng của chồi [7, 8]. Sự kết hợp auxin (NAA) và cytokinin (kinetone) trong thí nghiệm này cho hệ số nhân chồi hành (10,5 chồi/mẫu) cao hơn hệ số nhân chồi tỏi (4,08 chồi/mẫu) [5].

Bảng 2. Ảnh hưởng của kinetone đến khả năng tái sinh chồi sau 4 tuần nuôi cấy

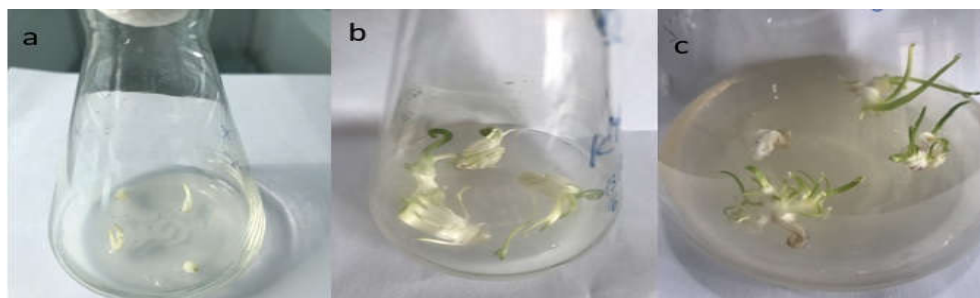
Nồng độ kinetone (mg/l)	Hành Trắng		Hành Tím		Hành Xanh	
	Tỷ lệ nảy chồi (%)	Hệ số nhân chồi	Tỷ lệ nảy chồi (%)	Hệ số nhân chồi	Tỷ lệ nảy chồi (%)	Hệ số nhân chồi
0	66,67	1,27	73,33	1,33	66,67	1,07
1,0	80,00	2,87	86,67	2,73	73,33	2,27
1,5	86,67	3,27	93,33	3,33	80,00	2,53
2,0	86,67	2,80	80,00	2,67	80,00	2,13
2,5	80,00	2,73	80,00	2,60	73,33	2,07
CV(%)		4		4,1		4,7
LSD _{0,05}		0,19		0,19		0,21

Ghi chú: Môi trường nền MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar, pH = 5,8.

Bảng 3. Ảnh hưởng của kinetine và NAA đến khả năng tái sinh chồi sau 4 tuần nuôi cấy

Nồng độ (mg/l)		Hành Trắng		Hành Tím		Hành Xanh	
Kinetine	NAA	Tỷ lệ nảy chồi (%)	Hệ số nhân chồi	Tỷ lệ nảy chồi (%)	Hệ số nhân chồi	Tỷ lệ nảy chồi (%)	Hệ số nhân chồi
0	0	73,33	1,20	73,33	1,07	80,00	1,27
1,5	0,25	86,67	8,87	93,33	9,07	80,00	8,93
1,5	0,5	93,33	10,53	93,33	9,53	87,67	9,67
1,5	1	86,67	9,40	86,67	9,13	80,00	9,00
1,5	1,25	86,67	9,27	80,00	8,93	73,33	8,67
CV(%)			1,2		1,5		1,5
LSD _{0,05}			0,18		0,21		0,21

Ghi chú: Môi trường nền MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar, pH = 5,8.



Hình 2. Nuôi cấy tạo chồi hành *in vitro* trên môi trường MS + 1,5 mg/l kinetine + 0,5 mg/l NAA + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar, pH = 5,8

a) Mẫu bắt đầu hình thành chồi sau 1 tuần nuôi cấy; b) Cụm chồi xuất hiện sau 2 tuần nuôi cấy; c) Cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy

3.3. Nghiên cứu môi trường tạo cây hoàn chỉnh

Khi bổ sung 1,0 - 2,5 mg/l NAA vào môi trường cơ bản MS thì các chỉ tiêu sinh trưởng của cây hành *in vitro* cao hơn ở môi trường đối chứng MS đơn thuần (Bảng 4). Các chỉ tiêu số lá/mẫu (2,23 - 3,03), chiều cao cây (12,6 - 15,43 cm), tỷ lệ

ra rễ (15,83 - 35,83%) và số rễ/mẫu (1,77 - 2,6) đạt cao nhất ở công thức 2 mg/l NAA. Đánh giá 3 giống hành nghiên cứu cho thấy, không có sự khác biệt nhiều về các chỉ tiêu theo dõi. Tuy nhiên, giống hành Xanh có khả năng sinh trưởng tốt hơn hai giống hành còn lại.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh sau 4 tuần nuôi cấy

Chỉ tiêu		Nồng độ NAA (mg/l)						CV(%)	LSD _{0.05}
		0	1,0	1,5	2,0	2,5			
Hành Trắng	Số lá/mẫu	2,33	2,50	2,77	2,93	2,47	2,2		0,11
	Chiều cao (cm)	12,73	14,17	14,90	15,27	14,43	0,6		0,17
	Tỷ lệ ra rễ (%)	15,83	29,17	33,33	35,83	30,83			
	Số rễ/mẫu	1,77	2,20	2,43	2,53	2,23	3,2		0,14

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Hành Tím	Số lá/mẫu	2,23	2,37	2,60	2,90	2,50	3,9	0,18
	Chiều cao (cm)	12,60	13,93	14,53	15,07	14,03	0,4	0,11
	Tỷ lệ ra rễ (%)	16,67	28,33	31,67	32,5	30		
	Số rễ/mẫu	1,87	2,00	2,23	2,57	2,07	3,2	0,13
Hành Xanh	Số lá/mẫu	2,30	2,53	2,73	3,03	2,33	3,5	0,17
	Chiều cao (cm)	12,97	14,23	14,73	15,43	14,57	0,6	0,16
	Tỷ lệ ra rễ (%)	17,5	30	32,5	34,16	31,67		
	Số rễ/mẫu	1,87	2,27	2,40	2,60	2,13	3,2	0,14

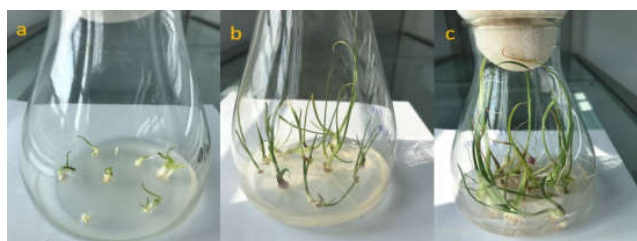
Sự kết hợp 2 mg/l NAA với 0,25 - 1,5 mg/l IBA cho tỷ lệ chồi tạo rễ tăng cao, đạt từ 89,17% trở lên (Bảng 5). Trong đó cao nhất là công thức 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l IBA cho tỷ lệ ra rễ 97,5%. Công thức này cũng cho số rễ cao nhất, đạt 5,63 rễ/mẫu với mẫu hành Xanh. Hơn nữa, chất

lượng rễ ở các công thức bổ sung NAA và IBA cũng tốt hơn nhiều so với công thức đối chứng MS. Công thức MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l IBA, pH 5,8 tạo cây hành hoàn chỉnh trong điều kiện *in vitro* tối ưu hơn các công thức còn lại.

Bảng 5. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh sau 4 tuần nuôi cấy

Chỉ tiêu		Nồng độ (mg/l)					CV(%)	LSD _{0,05}
NAA		0	2	2	2	2		
IBA		0	0,25	0,5	1,0	1,5		
Hành Trắng	Số lá/mẫu	2,27	2,97	3,10	3,53	2,90	4,1	0,23
	Chiều cao (cm)	12,80	17,00	17,43	18,30	17,23	0,6	0,19
	Tỷ lệ ra rễ (%)	17,50	90,00	92,50	96,67	91,67		
	Số rễ/mẫu	1,83	4,33	4,70	5,33	4,53	2,7	0,21
Hành Tím	Số lá/mẫu	2,20	2,87	2,93	3,40	2,83	3,5	0,19
	Chiều cao (cm)	12,50	17,23	17,63	18,37	17,33	0,5	0,17
	Tỷ lệ ra rễ (%)	17,50	89,17	92,50	95,58	93,33		
	Số rễ/mẫu	1,83	4,43	4,83	5,47	4,63	2,1	0,17
Hành Xanh	Số lá/mẫu	2,23	2,90	3,00	3,50	2,97	3,5	0,19
	Chiều cao (cm)	13,00	17,33	17,83	18,50	17,53	0,6	0,19
	Tỷ lệ ra rễ (%)	16,67	90,83	93,33	97,50	94,17		
	Số rễ/mẫu	1,90	4,67	5,00	5,63	4,77	0,8	0,69

Ghi chú: Môi trường nền MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar, pH 5,8.



Hình 3. Sự hình thành rễ tạo cây hành *in vitro* hoàn chỉnh

a) Tách chồi từ cụm chồi; b) Chồi hình thành rễ sau 2 tuần nuôi cấy; c) Cây hoàn chỉnh sau 4 tuần nuôi cấy

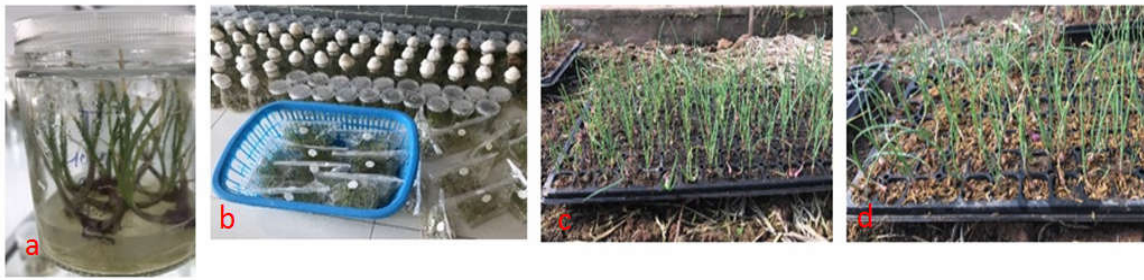
3.4. Nghiên cứu giá thể thích hợp cho cây hành *in vitro* trong vườn ươm

Cây *in vitro* khi chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang trạng thái tự dưỡng phải chịu nhiều yếu tố tác động của ngoại cảnh như ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm... sẽ ảnh hưởng không nhỏ đến sự sinh trưởng và phát triển của cây. Do đó, bước đệm trước khi chuyển cây ra ngoài sản xuất là vô cùng

quan trọng và cần thiết. Trên cơ sở đó, cây con hoàn chỉnh đạt tiêu chuẩn (bộ rễ khỏe, 1 - 2 lá, cao 11 - 12 cm) thu được từ công thức MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l IBA, của 3 giống hành Trắng, hành Tím và hành Xanh được sử dụng cho nghiên cứu 4 công thức giá thể (Bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến cây *in vitro* trong vườn ươm sau 2 tuần phát triển

Giống	Công thức giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)	Số lá/cây	Chiều cao (cm)
Hành Trắng	100% xơ dừa	98,89	2,77	13,37
	50% xơ dừa + 50% đất phù sa	97,78	2,53	13,30
	50% trấu tươi + 50% đất phù sa	95,55	2,83	13,27
	25% xơ dừa + 25% tro + 50% đất phù sa	100	3,5	13,70
CV(%)			2,8	4,0
LSD _{0,05}			0,75	0,84
Hành Tím	100% xơ dừa	97,78	2,60	13,07
	50% xơ dừa + 50% đất phù sa	96,67	2,50	13,37
	50% trấu tươi + 50% đất phù sa	95,55	2,63	13,00
	25% xơ dừa + 25% tro + 50% đất phù sa	100	3,37	13,57
CV(%)			2,2	4,1
LSD _{0,05}			0,58	0,75
Hành Xanh	100% xơ dừa	98,89	2,73	13,20
	50% xơ dừa + 50% đất phù sa	96,67	2,67	13,30
	50% trấu tươi + 50% đất phù sa	93,33	2,70	13,03
	25% xơ dừa + 25% tro + 50% đất phù sa	100	3,40	13,50
CV(%)			2,0	3,8
LSD _{0,05}			0,52	0,80



Hình 4. Cây hoàn chỉnh được trồng ra giá thể

a) Cây đủ tiêu chuẩn ra giá thể; b) Cây con được luyện ở môi trường nhiệt độ phòng trước khi trồng vào giá thể; c) Cây được trồng ở giá thể 25% xơ dừa + 25% tro + 50% đất phù sa; d) Cây được trồng trong giá thể 50% trấu tươi + 50% đất phù sa

Tỷ lệ sống của cây con tại vườn ươm ở cả 4 công thức đạt trên 93% (Bảng 6, hình 4). Cây *in vitro* sinh trưởng và phát triển tốt ở các công thức thí nghiệm. Ở công thức giá thể 50% trấu tươi + 50% đất phù sa, cây con có tỷ lệ sống, số lá và chiều cao cây thấp nhất (tỷ lệ sống 93,33 - 95,56%; số lá 2,63 - 2,83; chiều cao cây 13,27 - 13,03 cm). Công thức giá thể 25% xơ dừa + 25% tro + 50% đất phù sa cho tỷ lệ cây sống (100%), số lá 3,37 - 3,5, chiều cao cây 13,5 - 13,7 cm, cũng như sự sinh trưởng, phát triển và mã cây con tốt nhất.

4. KẾT LUẬN

Khử trùng mẫu bằng NaOCl 3% trong 20 phút cho tỷ lệ mẫu sạch cao (93,33%) và tỷ lệ mẫu chết thấp (8,33%).

Môi trường nhân chồi hành MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar + 1,5 mg/l kinetine + 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ nảy chồi và hệ số nhân chồi cao nhất lần lượt là 87,6 - 93,3% và 9,5 - 10,5 chồi/mẫu.

Môi trường tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất cho các giống hành là MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l IBA. Công thức này cho tỷ lệ ra rễ dao động 95,58 - 97,5%, số lá từ 3,4 - 3,53 lá/mẫu, chiều cao cây từ 18,3 - 18,5 cm, số rễ từ 5,33 - 5,63 rễ/mẫu.

Giá thể thích hợp cho cây hành *in vitro* là 25% xơ dừa + 25% tro + 50% đất phù sa. Trên môi trường giá thể này cây con có tỷ lệ sống 100%, số lá dao động 3,37 - 3,5 lá và chiều cao cây 13,5 - 13,7 cm sau hai tuần ươm cây.

Quy trình nuôi cấy *in vitro* cây hành củ cho hệ số nhân chồi và tỷ lệ cây sống cao. Tuy nhiên, cần

tiếp tục nghiên cứu thử nghiệm đánh giá khả năng sinh trưởng cho năng suất của cây hành *in vitro* để đánh giá hiệu quả kinh tế và tính khả thi so với phương pháp nhân giống truyền thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Van der Vlugt R. A., P. Steffens, C. Cuperus, E. Barg, D. E. Lesemann, L. Bos, H. J. Vetten (1999). Further evidence that shallot yellow stripe virus (SYSV) is a distinct potyvirus and reidentification of Welsh onion yellow stripe virus as a SYSV strain. *Phytopathology* 89: 148 - 155.
2. Conci, V. and S. Nome (1991). Virus Free Garlic (*Allium sativum* L.) Plants Obtained by Thermo-therapy and Meristem Tip Culture. *Journal of phytopathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1991.tb00111.x>
3. Vasil, I. K. and T. A. Thorpe (1994). Plant Cell and Tissue Culture, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands, 594 pp.
4. Murashige, T. and F. Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
5. Gomez, K. A. and A. A. Gomez (1984). Statistical procedures for agricultural research (2 ed.). John Wiley and sons, NewYork, 680 p.
6. Nguyễn Thị Thanh Phương và Nguyễn Thị Lý Anh (2012). Nghiên cứu làm sạch virus cho cây tỏi ta (*Allium sativum* L.) bằng nuôi cấy meristem. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 10 (2), tr. 244 - 255.

7. Boyer, N. Z. and W. R. Graves (2009). NAA is More Effective Than IBA for Rooting Stem Cuttings of Two *Nyssa* spp. *J. Environ. Hort.* 27(3): 183 - 187.
8. Mahmad, N., R. M. Taha, R. Othman, A. Saleh, N. A. Hasbullah, and H. Elias (2014). Effects of NAA and BAP, Double-Layered Media, and Light Distance on *In vitro* Regeneration of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Lotus), an Aquatic Edible Plant. *The Scientific World Journal*, Volume 2014, Article ID 745148, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/745148>

***IN VITRO* MULTIPLICATION OF SHALLOT (*Allium cepa* var. *aggregatum*)**

Nguyen Trong Khanh¹, Doan Xuan Canh¹, Pham Thien Thanh¹,
Le Thi Thanh¹, Le Thi Thu Trang¹, Do Thi Thanh Thanh¹,
Tong Thi Huyen¹, Pham Thi Hiep¹, Nguyen Dinh Thieu¹

¹ Field Crops Research Institute

Summary

Using the *in vitro* multiplication method to create shallot seedlings for production is a solution to increase seedling quality. In this study, three shallot varieties of Hai Duong including hanh Trang, hanh Tim and hanh Xanh were used as research materials to complete the *in vitro* multiplication process. Sterility testing showed that samples soaked in 3% NaOCl in 20 minutes for decontaminating gave a clean sample rate of 93.33% and a dead sample rate of 8.33%. The shoot multiplication medium MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar + 1.5 mg/l kinetine + 0.5 mg/l NAA gave the highest budding rate and shoot multiplication coefficient, respectively, at 87.6 - 93.3% and 9.5 - 10.5 shoots/sample. The best complete growing medium for shallot varieties was MS + 30 g/l sucrose + 5 g/l agar + 2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l IBA. This formula gave a rooting rate ranging from 95.58% to 97.5%, the number of leaves from 3.4 to 3.53 leaves/sample, the height of the plant from 18.3 to 18.5 cm and the number of roots from 5.33 - 5.63 roots/sample. Complete seedlings grown on a substrate consisting of 25% coir + 25% ash + 50% alluvial soil have a 100% survival rate. The number of leaves ranges from 3.37 to 3.5 leaves and the plant height is 13.5 - 13.7 cm after two weeks of incubation. The process for *in vitro* multiplication of shallot plants with high multiplication coefficient and healthy seedlings is a premise for research on applicability to production practice.

Keywords: Shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum*), multiplication, *in vitro* culture.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 27/3/2023

Ngày thông qua phản biện: 13/4/2023

Ngày duyệt đăng: 22/8/2023