

CHỌN LỌC MÔ SẼO ĐẬU NÀNH MTĐ 760-4 CHỐNG CHỊU MẶN BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY *in vitro*

Lê Hồng Giang, Huỳnh Thị Minh Thi và Nguyễn Bảo Toàn

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

Title:

Selection *in vitro* for salt tolerant callus of MTD 760-4 soybean

Từ khóa:

Đậu nành MTĐ 760-4, chống chịu mặn, *in vitro*, NaCl, mô sẹo, proline

Keywords:

Callus, *in vitro*, NaCl, proline, salt tolerance, soybean MTD 760-4

ABSTRACT

In vitro culture technique of callus cells on the medium containing selected agent of NaCl can help to create salt tolerant crop varieties. Callus of the MTD 760-4 soybean variety were cultured on the MS medium supplemented with NaCl at doses of 0, 2.5, 5, 7.5 and 10 g/L. The survival callus on the salt media were subcultured into the same medium in the four 5-week periods. The results showed that MTD 760-4 callus explants tolerable to salt dose of NaCl 5 g/L were selected with the survival rate of above 90% and the ability of salt tolerance was rather stable after four times of selection. The proline contents accumulated highly in callus explants at salt dose of 5 g/L.

TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* tế bào mô sẹo trên môi trường có chứa tác nhân chọn lọc là muối NaCl có thể giúp tạo nên các giống cây trồng chống chịu mặn. Mô sẹo giống đậu nành MTĐ 760-4 được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung muối NaCl với các nồng độ 0; 2,5; 5; 7,5 và 10 g/L. Mô sẹo sống sót trên môi trường mặn được cấy chuyển trên cùng môi trường trong 4 chu kỳ với mỗi chu kỳ là 5 tuần. Kết quả đã chọn lọc được các mẫu mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 có thể chống chịu mặn đến nồng độ muối NaCl 5 g/L với tỷ lệ sống trên 90% và khả năng chịu mặn khá ổn định sau 4 lần chọn lọc. Hàm lượng proline tích lũy cao trong mô sẹo ở nồng độ muối 5 g/L.

Trích dẫn: Lê Hồng Giang, Huỳnh Thị Minh Thi và Nguyễn Bảo Toàn, 2016. Chọn lọc mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 chống chịu mặn bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 47-54.

1 GIỚI THIỆU

Đậu nành (*Glycine max* (L.) Merrill) là cây thực phẩm và cũng là cây công nghiệp có giá trị kinh tế rất cao không chỉ được trồng làm thức ăn cho người và gia súc mà còn là một trong những cây màu luân canh cải tạo đất rất tốt. Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là một trong những vùng trồng đậu nành lớn của cả nước. Tuy nhiên, trong những năm gần đây tình trạng nhiễm mặn ở ĐBSCL ngày càng nghiêm trọng làm ảnh hưởng đến tình hình sản xuất của nhiều loại cây trồng nói chung và đậu nành nói riêng. Ngộ độc mặn làm ảnh

hưởng đến các đặc tính nông học của cây đậu nành từ đó ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng hạt, vì vậy cần có biện pháp để chọn tạo các dòng đậu nành có khả năng thích nghi với môi trường đất bị nhiễm mặn, giúp mở rộng diện tích cây trồng này ở ĐBSCL. Trong đó, kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* tế bào, mô hay cơ quan thực vật trên môi trường có chứa tác nhân chọn lọc là muối NaCl có thể giúp chọn lọc được các dòng cây trồng chống chịu mặn. Nhiều giống cây trồng quan trọng đã được nghiên cứu để tạo dòng chống chịu mặn thông qua kỹ thuật này như lúa (Saleem et al., 2005; Zinnah et al., 2013), lúa mì (El-Sayed et al., 2007), mía

(Gandonou *et al.*, 2006; Patade *et al.*, 2005)... Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm chọn lọc các dòng chống chịu mặn của giống đậu nành MTĐ 760-4, phục vụ cho công tác tạo giống mới thích nghi với điều kiện xâm nhập mặn ở ĐBSCL.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

2.1.1 Vật liệu

Hạt đậu nành giống MTĐ 760-4 là giống có nguồn gốc từ dòng lai MTĐ 176 x A70 Đại học Cần Thơ, do Bộ môn Di truyền giống nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp.

2.1.2 Hóa chất

Hóa chất nuôi cấy mô: Khoáng đa, vi lượng, đường sucrose, agar, vitamin gồm thiamine, pyridoxine, nicotinic acid, chất điều hòa sinh trưởng 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), muối NaCl (xuất xứ Trung Quốc, độ tinh khiết ≥ 99,5%).

Hóa chất phân tích proline: Acid sulfosalicylic 3%, acid acetic, acid phosphoric 6M, ninhydrine (Merck), toluene.

2.1.3 Thiết bị

Thiết bị nuôi cấy mô: Tủ cấy vô trùng, tủ lạnh, cân điện tử, nồi thanh trùng, microwave, máy đo pH, tủ sấy giấy, micropipette, hộp nhiệt khử trùng dụng cụ cấy, các dụng cụ thủy tinh trong phòng thí nghiệm, keo thủy tinh...

Thiết bị phân tích proline: Máy ly tâm, máy trộn mẫu (vortex), máy đo quang phổ.

2.1.4 Điều kiện thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Nuôi cấy mô, Bộ môn Sinh lý Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ trong điều kiện nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng 1.500 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Chuẩn bị vật liệu thí nghiệm

Hạt đậu nành MTĐ 760-4 được ngâm trong dung dịch sodium hypochloride (NaOCl) 10% trong 10 phút, sau đó rửa lại 3 - 4 lần bằng nước vô trùng. Tiếp theo, hạt được ngâm trong dung dịch thủy ngân clorua (HgCl_2) 0,1% trong 10 phút, cuối cùng rửa lại 4 - 5 lần bằng nước vô trùng. Hạt sau khi khử trùng được tách đôi, loại bỏ phần vỏ và trục phôi. Hai mảnh tử diệp được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2,4-D nồng độ 5 mg/L để kích thích tạo mô sẹo. Mô sẹo hình thành sau 4 tuần nuôi cấy được sử dụng làm vật liệu thí nghiệm.

2.2.2 Chuẩn bị môi trường thí nghiệm

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản đa, vi lượng theo Murashige và Skoog (1962), có bổ sung đường sucrose 30 g/L, agar 8 g/L, thiamine 1 mg/L, pyridoxine 1 mg/L, nicotinic acid 1 mg/L, 2,4-D 5 mg/L (ký hiệu là MS). Dung dịch môi trường sau khi pha chế xong được điều chỉnh ở pH = 5,8 sau đó nấu tan agar và rót vào keo thủy tinh có đường kính 6 cm, cao 12 cm với thể tích 40 ml/keo. Môi trường được khử trùng bằng nồi hấp khử trùng ở 121°C , áp suất 1 atm trong 20 phút.

2.2.3 Bố trí thí nghiệm

– Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của muối NaCl đến sự sinh trưởng của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 1

Mô sẹo 4 tuần tuổi được cảm ứng từ tử diệp trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 5 mg/L trong mô tả bên trên được sử dụng làm vật liệu thí nghiệm. Mẫu mô sẹo được tách thành cụm có kích thước $0,5 \times 0,5$ cm và cấy vào môi trường MS có bổ sung các nồng độ muối NaCl khác nhau.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm 5 nghiệm thức là muối NaCl 0; 2,5; 5; 7,5 và 10 mg/L. Mỗi nghiệm thức lặp lại 10 lần, mỗi lần lặp lại là 1 keo, mỗi keo cấy 5 mẫu mô sẹo.

– Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của muối NaCl đến sự sinh trưởng của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 2

– Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của muối NaCl đến sự sinh trưởng của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 3

– Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của muối NaCl đến sự sinh trưởng của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 4

Thí nghiệm 2, 3 và 4 được tiến hành tương tự thí nghiệm 1, với vật liệu là mô sẹo còn sống của thí nghiệm trước đó (mô sẹo có màu vàng sáng, có sự gia tăng kích thước, được 5 tuần tuổi). Mô sẹo này được nuôi cấy trên môi trường có cùng nồng độ muối NaCl để tiếp tục đánh giá khả năng sống của mô sẹo.

2.2.4 Chỉ tiêu theo dõi

– Tỷ lệ sống (%) của mô sẹo: Tổng số mô sẹo còn sống/tổng số mẫu cấy.

– Đường kính mô sẹo gia tăng (cm): Được tính bằng giá trị sau – giá trị đầu

– Hàm lượng proline trong mô sẹo ($\mu\text{mol/g}$ trọng lượng tươi) được phân tích sau lần chọn lọc thứ 4 với 4 lần lặp lại trong một nghiệm thức. Quy

trình phân tích proline được thực hiện theo Bates *et al.* (1973).

Thời gian lấy chỉ tiêu là 1 tuần/lần trong thời gian 5 tuần.

2.2.5 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và thống kê bằng chương trình SPSS version 20, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

Các số liệu là tỷ lệ phần trăm biến động từ 0 - 100% được chuyển đổi sang dạng $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ (Gomez và Gomez, 1984).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của muối NaCl đến sự sinh trưởng của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 1

Kết quả Bảng 1 cho thấy, ở thời điểm 1 tuần sau khi cấy (SKC), tỷ lệ sống của mô sẹo giảm còn 92% ở nồng độ muối 10 g/L, khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Từ 2 đến 5 tuần SKC, tỷ lệ sống của mô sẹo tiếp tục giảm mạnh. Ở nghiệm thức muối NaCl 2,5 g/L, mô sẹo vẫn sống 100%

như đối chứng, trong khi tăng nồng độ muối lên đến 5 g/L thì tỷ lệ sống giảm có ý nghĩa. Tỷ lệ sống của mô sẹo giảm dần khi nồng độ muối tăng dần. Ở 5 tuần SKC, tỷ lệ mô sẹo sống ở 5 g/L giảm còn 62%, và giảm mạnh đến 26% ở nồng độ muối 10 g/L. Mặc dù mô sẹo sống sót được ở nồng độ 10 g/L nhưng tỷ lệ rất thấp (26%) và sức sống của mô sẹo kém (màu hơi nâu) nên mẫu mô sẹo ở nồng độ này không thể tiếp tục dùng để chọn lọc ở lần 2. Ở nồng độ muối 5 và 7,5 g/L thì tỷ lệ sống của mô sẹo cao hơn (tương ứng là 62 và 44%) và cấu trúc cũng như màu sắc mô sẹo bình thường (Hình 1).

Bảng 2 cho thấy, từ tuần 1 đến tuần 5, đường kính của mô sẹo ở các nghiệm thức đều có sự gia tăng. Ở nghiệm thức đối chứng, đường kính mô sẹo gia tăng nhiều nhất, từ 0,13 ở 1 tuần SKC đến 0,75 cm ở 5 tuần SKC. Mô sẹo gia tăng đường kính ít khi tăng nồng độ muối từ 2,5 đến 10 g/L. Cụ thể ở 5 tuần SKC, đường kính của mô sẹo có khuynh hướng ít gia tăng khi tăng dần nồng độ muối. Đường kính gia tăng thấp nhất là ở nồng độ muối 10 g/L, chỉ đạt 0,11 cm (so với đối chứng là 0,75 cm), kể đến là nồng độ muối 7,5 và 5 g/L.

Bảng 1: Ảnh hưởng của muối NaCl trên tỷ lệ sống (%) của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 từ 1 đến 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 1

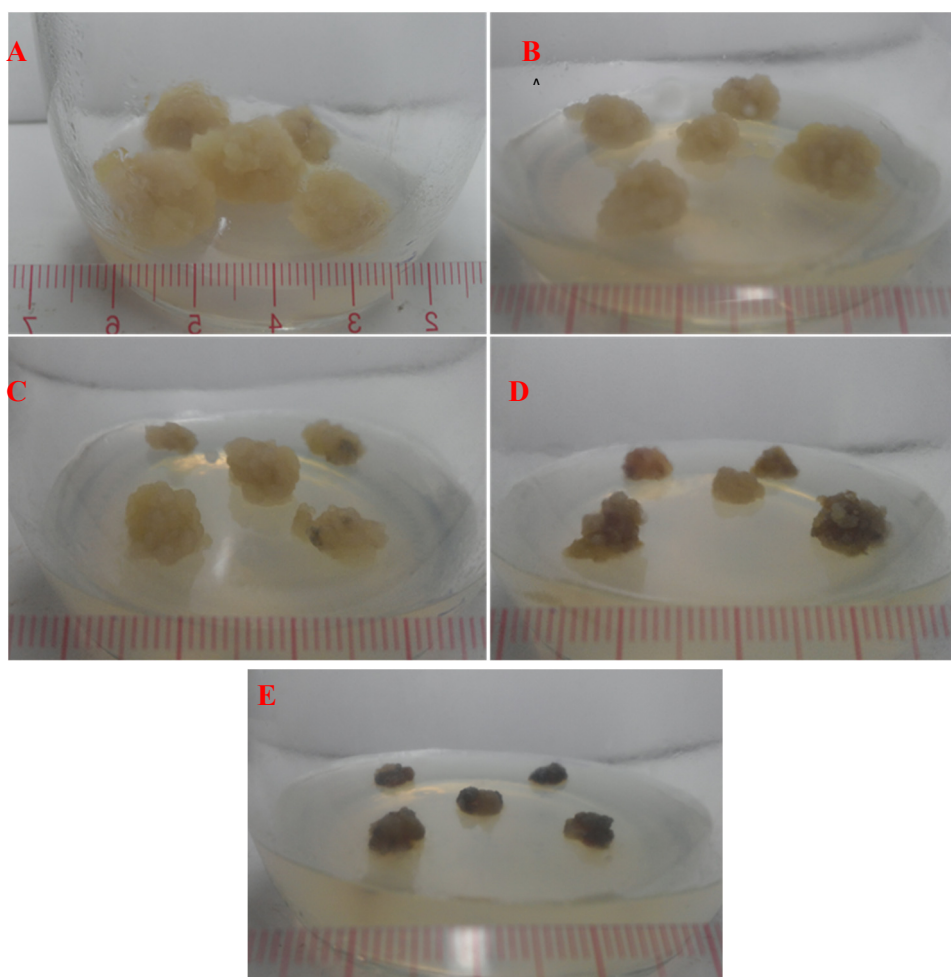
Nồng độ NaCl (g/L)	Thời gian theo dõi				
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
2,5	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
5	100 ^a	90 ^{ab}	80 ^b	68 ^b	62 ^b
7,5	96 ^{ab}	86 ^b	76 ^b	66 ^b	44 ^c
10	92 ^b	70 ^c	38 ^c	26 ^c	26 ^d
F	*	**	**	**	**
CV (%)	11,4	18,5	22,9	23,5	46,1

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan; (): khác biệt ở mức 5%; (**): khác biệt ở mức 1%*

Bảng 2: Ảnh hưởng của muối NaCl lên sự gia tăng đường kính (cm) của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 từ 1 đến 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 1

Nồng độ NaCl (g/L)	Thời gian theo dõi				
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	0,13 ^a	0,27 ^a	0,45 ^a	0,56 ^a	0,75 ^a
2,5	0,12 ^a	0,23 ^b	0,38 ^b	0,46 ^b	0,56 ^b
5	0,07 ^b	0,12 ^c	0,18 ^c	0,2 ^c	0,29 ^c
7,5	0,05 ^b	0,11 ^{cd}	0,19 ^c	0,22 ^c	0,27 ^c
10	0,05 ^b	0,08 ^d	0,11 ^d	0,11 ^d	0,11 ^d
F	**	**	**	**	**
CV (%)	3,5	2,8	2,1	2,5	7,9

*Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan; (**): khác biệt ở mức 1%*



Hình 1: Sự sinh trưởng của mô sẹ đậu nành MTĐ trên môi trường MS bổ sung muối NaCl sau 5 tuần nuôi cấy trong lần chọn lọc 1 - (A) 0 g/L; (B) 2,5 g/L; (C) 5 g/L; (D) 7,5 g/L và (E) 10 g/L

Nhìn chung sau 5 tuần nuôi cấy, muối NaCl có ảnh hưởng đến sự phát triển của mô sẹ MTĐ 760-4, cụ thể sự gia tăng đường kính mô sẹ giảm khi môi trường có nồng độ muối tăng. Theo Kowles (2010), khi môi trường bên ngoài tế bào có nồng độ chất tan cao hơn nồng độ chất tan trong tế bào sẽ làm cho nước trong tế bào di chuyển ra ngoài, dẫn đến tế bào bị co lại.

Như vậy, lần xử lý thứ nhất đã chọn lọc được các mẫu mô sẹ MTĐ 760-4 có khả năng chịu mặn đến nồng độ muối NaCl 7,5 g/L. Mô sẹ ở nồng độ muối 10 g/L có tỷ lệ sống và sự gia tăng đường kính quá thấp, sức sống kém (màu hơi nâu) nên không thể tiếp tục chọn lọc ở lần 2.

3.2 Ảnh hưởng của muối NaCl đến sự sinh trưởng của mô sẹ đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 2

Trong lần chọn lọc 2, mẫu mô sẹ ở các nồng độ muối NaCl từ 0 - 7,5 g/L tiếp tục được nuôi cấy trên cùng môi trường mặn. Kết quả Bảng 3 cho thấy, tỷ lệ sống của mô sẹ ở nồng độ muối NaCl

2,5 g/L là 100% như nghiệm thức đối chứng. Nồng độ muối cao 5 và 7,5 g/L vẫn tiếp tục có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹ. Tỷ lệ sống của các mẫu mô sẹ này có khuynh hướng giảm dần theo thời gian đến 5 tuần SKC và thấp dần khi tăng nồng độ muối. Cụ thể, mô sẹ có tỷ lệ sống thấp nhất ở nghiệm thức muối 7,5 g/L ở tuần 1 là 67,5% và giảm chỉ còn 17,5% ở 5 tuần SKC. Nghiệm thức muối 5 g/L có tỷ lệ sống cũng cao khá cao là 76% ở 5 tuần SKC.

Mô sẹ có sự sinh trưởng (gia tăng đường kính) theo thời gian đến 5 tuần SKC ở cả nghiệm thức đối chứng và xử lý muối. Tuy nhiên, sự gia tăng đường kính của mô sẹ trong lần chọn lọc 2 này cũng tuân theo quy luật là do bị ảnh hưởng bởi mặn nên sự sinh trưởng của mô sẹ bị kìm hãm. Mô sẹ mặc dù sống sót trên môi trường mặn đến nồng độ 7,5 g/L (17,5%), tuy nhiên đường kính mô sẹ gia tăng rất ít ở nồng độ muối cao 5 và 7,5 g/L (tương ứng chỉ đạt 0,44 cm và 0,11 cm) so với đối chứng (0,72 cm) (Bảng 4).

Bảng 3: Ảnh hưởng của muối NaCl lên tỷ lệ sống (%) của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 từ 1 đến 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 2

Nồng độ NaCl (g/L)	Thời gian theo dõi				
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
2,5	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
5	90 ^b	84 ^b	78 ^b	76 ^b	76 ^b
7,5	67,5 ^c	52,5 ^c	32,5 ^c	25 ^c	17,5 ^c
F	**	**	**	**	**
CV (%)	15,3	16,3	19,2	20,8	20,8

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan; (**): khác biệt ở mức 1%

Bảng 4: Ảnh hưởng của muối NaCl lên sự gia tăng đường kính (cm) của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 từ 1 đến 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 2

Nồng độ NaCl (g/L)	Thời gian theo dõi (tuần)				
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	0,16 ^a	0,24 ^a	0,37 ^a	0,52 ^a	0,72 ^a
2,5	0,16 ^a	0,23 ^a	0,40 ^a	0,57 ^a	0,76 ^a
5	0,13 ^a	0,16 ^b	0,21 ^b	0,32 ^b	0,44 ^b
7,5	0,08 ^b	0,09 ^c	0,09 ^c	0,11 ^c	0,11 ^c
F	**	**	**	**	**
CV (%)	23,3	29,9	25,8	29,9	23,9

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan; (**): khác biệt ở mức 1%

Kết quả xử lý lần 2 cho thấy đã chọn lọc được các dòng mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 có khả năng chịu mặn đến nồng độ 5 g/L, với tỷ lệ sống đạt 76%. Mô sẹo ở nghiệm thức NaCl 7,5 g/L có tỷ lệ sống quá thấp (17,5%) và phát triển chậm nên không thể tiếp tục chọn lọc ở lần chọn lọc tiếp theo.

3.3 Ảnh hưởng của muối NaCl đến sự sinh trưởng của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 3

Trong lần chọn lọc 3, mẫu mô sẹo ở các nồng độ muối NaCl từ 0-5 g/L tiếp tục được nuôi cấy trên cùng môi trường mặn. Kết quả Bảng 5 cho thấy, khi xử lý muối đến lần 3 thì tỷ lệ sống của mô

sẹo bắt đầu ổn định. Cụ thể đến 4 tuần SKC, tỷ lệ sống của mô sẹo ở nghiệm thức muối 5g/L là 96%, không khác biệt so với đối chứng. Đến 5 tuần SKC thì tỷ lệ này có sự giảm nhẹ còn 94%.

Mô sẹo sống sót cao ở nghiệm thức muối 5 g/L nhưng sự gia tăng đường kính không nhiều khi nuôi cấy đến 5 tuần. Sự chậm sinh trưởng do ảnh hưởng bởi mặn vẫn còn. Ở nồng độ muối 2,5 g/L, mô sẹo gần như sinh trưởng bình thường như đối chứng nhưng sinh khối của mô sẹo cũng có phần giảm do ảnh hưởng bởi mặn. Ở 5 tuần SKC, kết quả chỉ đạt 0,7 cm, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (0,78 cm). Sự gia tăng đường kính của mô sẹo ở nồng độ 5 g/L bị ảnh hưởng nhiều hơn, chỉ đạt 0,57 cm ở 5 tuần SKC (Bảng 6).

Bảng 5: Ảnh hưởng của muối NaCl lên tỷ lệ sống (%) của mô sẹo đậu nành MTĐ 760- từ 1 đến 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 3

Nồng độ NaCl (g/L)	Thời gian theo dõi				
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	100	100	100	100	100 ^a
2,5	100	100	100	100	100 ^a
5	100	96	96	96	94 ^b
F		ns	ns	ns	*
CV (%)		9,1	9,1	9,1	10,6

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan; (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (*): khác biệt ở mức 1%

Bảng 6: Ảnh hưởng của muối NaCl lên sự gia tăng đường kính (cm) của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 từ 1 đến 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc thứ 3

Nồng độ NaCl (g/L)	Thời gian theo dõi (tuần)				
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	0,12 ^a	0,25 ^a	0,40 ^a	0,57 ^a	0,78 ^a
2,5	0,08 ^{ab}	0,21 ^b	0,35 ^b	0,53 ^a	0,70 ^b
5	0,06 ^b	0,14 ^c	0,27 ^b	0,43 ^b	0,57 ^c
F	**	**	**	**	**
CV (%)	49,7	22,4	16,1	12,4	11,4

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan ở; (**): khác biệt ở mức 1%

Nhìn chung, trong lần chọn lọc thứ 3, khả năng chịu mặn của mô sẹo đã ổn định hơn và kết quả đã chọn được các mẫu mô sẹo chịu mặn đến nồng độ muối NaCl 5 g/L với tỷ lệ sống khá cao, đạt 94 % sau 5 tuần nuôi cấy.

3.4 Ảnh hưởng của muối NaCl đến sự sinh trưởng của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 4

Bảng 7 cho thấy tỷ lệ sống của mô sẹo ở nồng độ muối 5 g/L trong lần xử lý 4 này mặc dù giảm còn 94% nhưng không khác biệt so với đối chứng. Điều này chứng tỏ khả năng chịu mặn của

mô sẹo ở nồng độ này đã ổn định, mô sẹo đã có sự thích nghi với điều kiện stress mặn của môi trường (Hình 2).

Kết quả Bảng 7 và 8 cho thấy khả năng sống của mô sẹo chịu mặn muối NaCl 2,5 và 5 g/L đã ổn định, tuy nhiên sự sinh trưởng vẫn còn chậm hơn so với đối chứng. Từ tuần 1 đến tuần 5 SKC, đường kính gia tăng của mô sẹo ở nghiệm thức muối 2,5 g/L tăng từ 0,06 đến 0,66 cm, ở nghiệm thức muối 5 g/L tăng từ 0,06 đến 0,52 cm, ít hơn so với đối chứng tăng từ 0,13 đến 0,88 cm.

Bảng 7: Ảnh hưởng của muối NaCl lên tỷ lệ sống (%) của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 từ 1 đến 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 4

Nồng độ NaCl (g/L)	Thời gian theo dõi				
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	100	100	100	100	100
2,5	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	94
F					ns
CV (%)					10,9

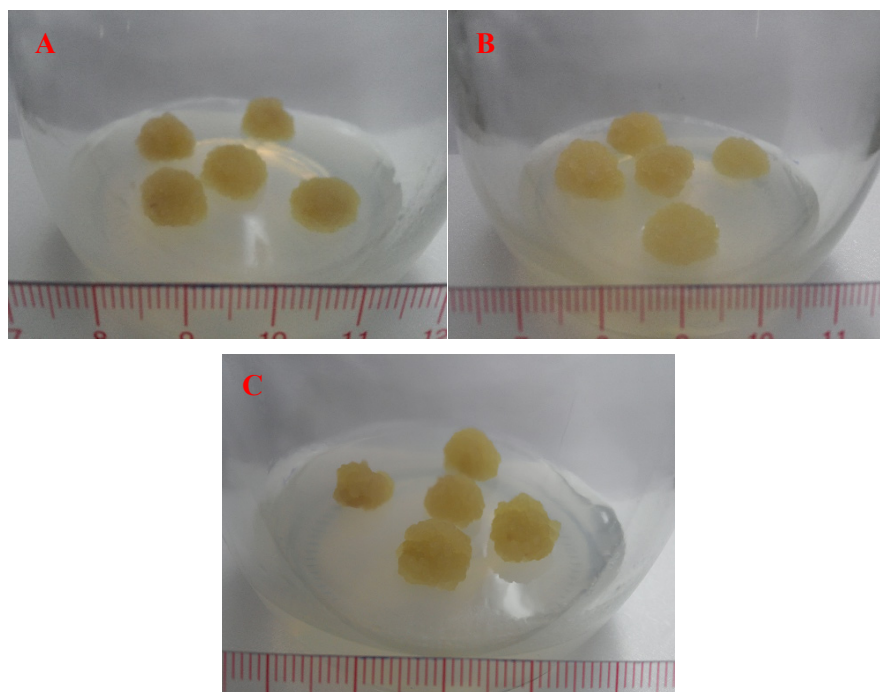
(ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Bảng 8: Ảnh hưởng của muối NaCl lên sự gia tăng đường kính (cm) của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 từ 1 đến 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 4

Nồng độ NaCl (g/L)	Thời gian theo dõi (tuần)				
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	0,13 ^a	0,27 ^a	0,45 ^a	0,66 ^a	0,88 ^a
2,5	0,06 ^b	0,17 ^b	0,31 ^b	0,45 ^b	0,66 ^b
5	0,06 ^b	0,16 ^b	0,30 ^b	0,43 ^b	0,52 ^c
F	**	**	**	**	**
CV (%)	39,5	15,8	22,1	21,5	19,4

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê

khi dùng phép kiểm định Duncan ở; (**): khác biệt ở mức 1%.



Hình 2: Sự sinh trưởng của mô sẹo đậu nành MTD trên môi trường MS bổ sung muối NaCl sau 5 tuần nuôi cấy trong lần chọn lọc 4 - (A) 0 g/L; (B) 2,5 g/L; (C) 5 g/L

Kết quả phân tích proline ở Bảng 9 cho thấy có sự ảnh hưởng của nồng độ muối lên sự tích lũy proline trong mẫu mô sẹo đậu nành MTD 760-4. Hàm lượng proline cao nhất ở nồng độ muối 5 là 2,78 $\mu\text{mol/g}$ trọng lượng tươi, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (1,48 $\mu\text{mol/g}$ trọng lượng tươi), tương đương gấp khoảng 1,9 lần so với đối chứng. Mô sẹo ở nồng độ muối 2,5 g/L có hàm lượng proline không khác biệt so với đối chứng, cho thấy mô sẹo đậu nành MTD có khả năng chịu đựng mức nồng độ muối này một cách bình thường.

Bảng 9: Hàm lượng proline của mô sẹo đậu nành MTD 760-4 sau 4 lần chọn lọc với muối NaCl ($\mu\text{mol/g}$ trọng lượng tươi)

Nồng độ NaCl (g/L)	Hàm lượng proline ($\mu\text{mol/g}$ trọng lượng tươi)
0	1,48 ^b
2,5	1,51 ^b
5	2,78 ^a
F	*
CV (%)	26,3

Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (*) khác biệt ở mức 5%

Theo Ghoulam *et al.* (2001), để khắc phục stress mặn, cây tạo ra các cơ chế bảo vệ giúp nó thích nghi. Các cơ chế này bao gồm sự điều chỉnh thẩm thấu, đi cùng với sự tích lũy các chất tan như proline. Chính vì vậy, việc đo hàm lượng proline

thường được các nhà nghiên cứu ghi nhận như là một chỉ tiêu để đánh giá khả năng chống chịu mặn của mô sẹo.

Hàm lượng proline tăng ở mô sẹo chịu mặn với muối NaCl cũng đã được báo cáo trên cây đậu nành trong nghiên cứu của Liu và Staden (2000) và trên nhiều giống cây trồng khác như đậu phộng (Jain *et al.*, 2001), lúa mạch (Chaudhuri *et al.*, 1997), lúa (Basu *et al.*, 2002), mía (Gandonou *et al.*, 2006)...

Kết quả tổng hợp được cho thấy, qua 4 lần chọn lọc với muối NaCl, mô sẹo đậu nành MTD 760-4 được chọn lọc *in vitro* trên môi trường stress mặn có khả năng chống chịu mặn đến nồng độ 5 g/L. Hàm lượng proline tích lũy cao ở các mẫu mô sẹo này chứng tỏ chúng đã có sự điều chỉnh áp suất thẩm thấu trong tế bào để có thể thích nghi với điều kiện mặn của môi trường.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Mô sẹo đậu nành MTD 760-4 sinh trưởng bình thường ở nồng độ muối NaCl 2,5 g/L. Qua 4 lần chọn lọc đã thu được các mẫu mô sẹo đậu nành MTD 760-4 có khả năng chịu mặn với nồng độ muối NaCl 5 g/L và tỷ lệ sống trên 90% sau 5 tuần nuôi cấy. Hàm lượng proline tích lũy cao trong mô sẹo ở nồng độ muối 5 g/L.

4.2 Đề xuất

Nghiên cứu tái sinh cây từ các mẫu mô sẹo chống chịu mặn để tiếp tục đánh giá khả năng chống chịu mặn của cây con.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Basu, S., G. Gangopadhyay, BB. Mukherjee and S. Gupta, 2002. Plant regeneration of salt adapted callus of indica rice (var. Basmati 370) in saline conditions. *Plant Tissue & Organ Culture.*, 50: 153-159.
- Bates, L.S, R.P. Waldren, and I.D. Teare, 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Chaudhuri, P., R.K. Sengupta and P. Ghosh, 1997. In vitro assessment of salinity tolerance in *Hordeum vulgare*. *Indian J Plant Physiol.*, 2 (2): 123-126.
- El-Sayed, O. E., A. A. Rizkalla and S. R. S. Sabri, 2007. *In vitro* mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(5): 377-383.
- Gandonou, C. B., T. Errabii, J. Abrini, M. Idaomar and N. S. Senhaji, 2006. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt stress. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 87: 9-16.
- Ghoulam, C., F. Ahmed, and F. Khalid, 2001. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 47: 139–150.
- Gomez, K.A. and A.A. Gomez, 1984. Statistical procedures for agricultural research. John Wiley & Son. Inc.
- Jain, M., G. Mathur, S. Koul, and N.B. Sarin, 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) *Plant Cell Rep.* 20: 463-468.
- Kowles, R. V. 2010. Regulation of water in plant cells. *Bioscene* 36(1): 34-42.
- Liu, T., and J. V. Staden, 2000. Selection and characterization of sodium chloride-tolerant callus of *Glycine max* (L.) Merr cv. Acme. *Plant Growth Reg.*, 31: 195–207.
- Murashige T. and F.Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473 - 497.
- Nguyễn Bảo Toàn, 2010. Giáo trình Nuôi cấy mô tế bào thực vật. NXB Đại học Cần Thơ, 185 trang.
- Patade V.Y., P. Suprasanna, V.A. Bapat and U.G. Kulkarni, 2005. Selection for abiotic (salinity and drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerant lines in sugarcane. *Nuclear Agricultural and Biotechnology Division Bhabha Atomic Research Centre and Department of Agricultural Biotechnology Marathwada Agricultural University. Parbhani*, 1: 402-431.
- Saleem, M. Y., Z. Mukhtar, A. A. Cheema and B. M. Atta, 2005. Induced mutation and in vitro techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 2(2): 141-145.
- Zinnah, K. M. A., N. Zobayer, S. U. Sikdar, L. N. Liza, Md. Al N. Chowdhury and M. Ashrafuzzaman, 2013. *In Vitro* Regeneration and screening for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(11): 29-36.