



CHỌN LỌC CÁC DÒNG MÔ SẸO CHỐNG CHỊU MẶN CỦA GIỐNG ĐẬU NÀNH MTĐ 760-4 BẰNG XỬ LÝ TIA GAMMA

Lê Hồng Giang, Trần Thị Tuyết Lan và Nguyễn Bảo Toàn

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

Thông tin chung:

Ngày nhận: 18/01/2016

Ngày chấp nhận: 30/08/2016

Title:

Selection for salt tolerant callus lines of soybean cultivar 760-4 by gamma ray treatment

Từ khóa:

Giống đậu nành MTĐ 760-4, chống chịu mặn, NaCl, tia gamma, proline

Keywords:

Soybean variety MTĐ 760-4, salt tolerance, NaCl, gamma ray, proline

ABSTRACT

Salt stress affects the growth, yield and quality of soybean. Mutagenesis through irradiation method with gamma ray in combination with *in vitro* selection on the medium supplemented with NaCl was carried out on the soybean cultivar MTĐ 760-4 to obtain salt-tolerant callus lines. Results showed that, in salt concentration of 2.5 g/L, most callus grew normally. Salt tolerance to 5 g/L was achieved by culturing non-irradiated and irradiated callus at doses from 5-40 Gy on selection medium with 5 g/L of NaCl after four times of selection. Callus tolerated salinity to dose of 7.5 g/L when selected at irradiated dose of 5 Gy. Proline content was accumulated highly in salt tolerant callus lines on media containing NaCl concentrations of 5 and 7.5 g/L.

TÓM TẮT

Stress mặn ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, năng suất và phẩm chất của đậu nành. Sự tạo đột biến bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma kết hợp với chọn lọc *in vitro* trên môi trường nuôi cấy có bổ sung muối NaCl đã được thực hiện trên mô sẹo giống đậu nành MTĐ 760-4 nhằm tạo nên các dòng mô sẹo có khả năng chống chịu mặn. Kết quả cho thấy, ở nồng độ mặn 2,5 g/L mô sẹo đậu nành sinh trưởng bình thường. Sự chống chịu mặn 5 g/L đạt được khi nuôi cấy mô sẹo không chiếu xạ và mô sẹo được chiếu xạ với liều từ 5-40 Gy trên môi trường chọn lọc với muối NaCl 5 g/L sau 4 lần chọn lọc. Mô sẹo chống chịu mặn đến 7,5 g/L khi được chọn lọc ở liều chiếu xạ 5 Gy. Hàm lượng proline tích lũy cao trong các dòng mô sẹo chịu mặn ở môi trường chứa muối 5 và 7,5 g/L.

Trích dẫn: Lê Hồng Giang, Trần Thị Tuyết Lan và Nguyễn Bảo Toàn, 2016. Chọn lọc các dòng mô sẹo chống chịu mặn của giống đậu nành MTĐ 760-4 bằng xử lý tia gamma. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 45b: 39-48.

1 GIỚI THIỆU

Đậu nành (*Glycine max* (L.) Merrill) là cây thực phẩm cũng như 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) tuy có diện tích trồng đậu nành thấp hơn miền Bắc, nhưng năng suất thường cao hơn. Tuy nhiên, hiện nay do tình hình

biến đổi khí hậu, ĐBSCL là một trong những vùng chịu ảnh hưởng trực tiếp, đặc biệt là tình trạng xâm nhập mặn vào sâu trong đất liền nên khiến cho nhiều diện tích đất canh tác bị thu hẹp. Đối với những vùng bị nhiễm mặn, vào những mùa vụ năng suất trồng lúa không cao thì nông dân có thể trồng cây đậu nành thay thế. Chính vì vậy, để có thể canh tác tốt và mở rộng diện tích cây trồng này ở ĐBSCL, việc sử dụng giống chịu mặn là một trong các phương pháp thích hợp nhất và ít tốn

kém nhất so với các phương pháp khác như cải tạo đất hoặc làm đê bao ngăn mặn. Tuy nhiên, công tác lai tạo và chọn giống theo cách cổ điển rất khó, tốn nhiều thời gian, công sức và chi phí. Trong khi đó phương pháp nuôi cấy mô kết hợp với kỹ thuật gây đột biến *in vitro* có thể khắc phục được các hạn chế trên, giúp chọn tạo các dòng cây trồng có khả năng chống chịu mặn. Phương pháp này đã được ứng dụng trên nhiều giống cây trồng như trên cây lúa (Saleem *et al.*, 2005), lúa mì (El-Sayed *et al.*, 2007), mía (Patade *et al.*, 2008), khoai tây (Yaycili và Alikamanoglu, 2012)... Trên cây đậu nành, nghiên cứu chọn tạo giống chịu mặn còn rất ít. Báo cáo của Liu và Staden (2000) trên giống đậu nành cv. Acme. cho thấy đã tạo được 1 dòng mô sẹo có khả năng chống chịu mặn ở nồng độ muối NaCl 100 mM. Ở nước ta chưa tìm thấy tài liệu nghiên cứu về lĩnh vực này. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm chọn lọc các dòng đậu nành chống chịu mặn của giống đậu nành MTĐ 760-4, phục vụ cho công tác tạo giống mới thích nghi với điều kiện biến đổi khí hậu 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 A 70 Đại học Cần Thơ, được thu thập tại Bộ môn Di truyền giống nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

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 (autoclave), 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.

Thiết bị chiếu xạ: Máy chiếu xạ tia gamma ⁶⁰Co của Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt.

2.1.4 Điều kiện thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Cây mô, Bộ môn Sinh lý Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ có điều kiện nhiệt độ 26±2°C, cường độ chiếu sáng khoảng 1.500 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Mẫu mô sẹo được chiếu xạ tia gamma với nguồn ⁶⁰Co tại Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.

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, ngâm trong dung dịch thủy ngân clorua (HgCl₂) 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 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). Môi trường sau khi pha chế xong được điều chỉnh ở pH = 5,8 sau đó nấu cho tan agar và rót vào keo có đường kính 6 cm, cao 12 cm với lượng 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 liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 1.

Mô sẹo được cấy vào đĩa petri chứa môi trường MS có bổ sung các nồng độ muối NaCl để xử lý chiếu xạ, với 15 mẫu mô sẹo/đĩa, mẫu mô sẹo có kích thước 0,5x0,5 cm. Mô sẹo sau đó được cấy chuyển vào keo có môi trường tương tự với 5 mẫu mô sẹo/keo để theo dõi.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên thừa số hai nhân tố, với nhân tố thứ nhất là 5 liều chiếu xạ tia gamma (0, 5, 10, 20 và 40 Gy) và nhân tố thứ hai là 4 nồng độ muối NaCl (0; 2,5; 5 và 7,5 g/L). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 10 lần, mỗi lần lặp lại là 1 keo, mỗi keo cấy 5 mẫu mô sẹo.

– Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 2.

– Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 3.

– Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống 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 được nuôi cấy trên cùng môi trường 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. Thời gian lấy chỉ tiêu: 1, 3, và 5 tuần sau khi cấy.

– Hàm lượng proline trong mô sẹo đậu nành được đo sau lần chọn lọc thứ 4 với 2-6 lần lặp lại trong một nghiệm thức. Quy trình phân tích proline được thực hiện theo Bates *et al.* (1973).

2.2.5 Xử lý số liệu

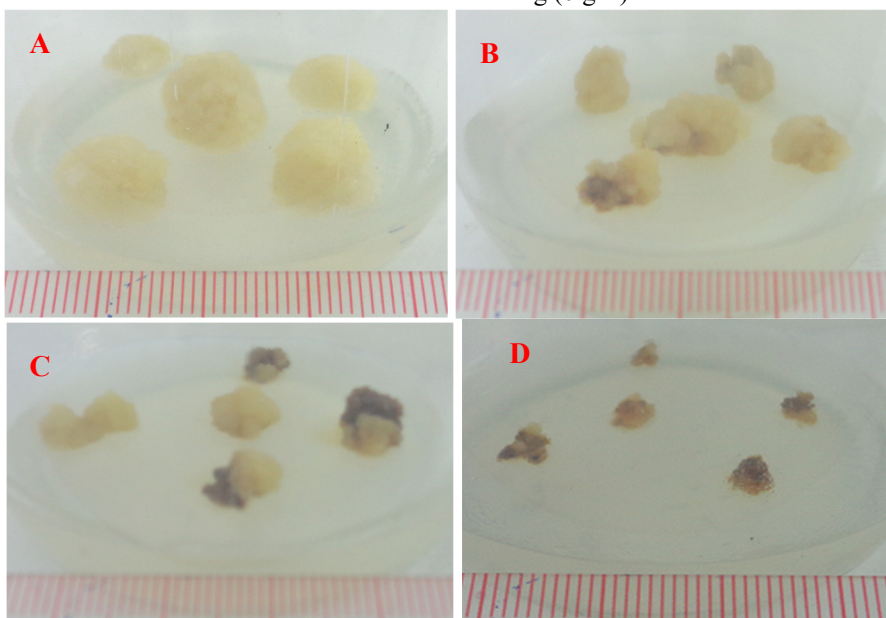
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và thống kê bằng chương trình SPSS version 20, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 1% và 5%.

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 liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối đến tỷ lệ sống 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), liều chiếu xạ tia gamma cũng như các nồng độ muối NaCl xử lý không có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹo. Đến 3 tuần sau khi cấy (SKC), hai nhân tố này có ảnh hưởng riêng rẽ đến khả năng sống của mô sẹo. Liều chiếu 5 và 10 Gy không khác biệt so với đối chứng (0 Gy), nhưng khi tăng liều đến 20 và 40 Gy thì tỷ lệ sống giảm rất đáng kể (trung ứng còn 76 và 77,5%). Khi tăng nồng độ muối NaCl lên 5 và 7,5 g/L thì khả năng sống của mô sẹo bị ảnh hưởng mạnh. Tỷ lệ sống giảm còn 74,8% ở nồng độ 5 g/L và 63,6% ở 7,5 g/L, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (0 g/L).



Hình 1: Mức độ sống sót của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 sau 5 tuần nuôi cấy ở lần chọn lọc 1
(A) Môi trường MS (đối chứng) (B) Môi trường MS + NaCl 2,5 g/L
(C) Môi trường MS + NaCl 5 g/L (D) Môi trường MS + NaCl 7,5 g/L

Đến 5 tuần SKC, có ảnh hưởng tương tác giữa liều chiếu xạ và nồng độ muối NaCl đến khả năng sống sót của mô sẹo. Tỷ lệ sống giảm mạnh khi nồng độ muối cao và liều chiếu xạ cao. Mô sẹo sống thấp nhất (chỉ 14%) ở liều chiếu 40 Gy kết

hợp xử lý muối 7,5 g/L. Xử lý chiếu xạ từ 0-40 Gy ở môi trường không bổ sung muối không có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹo (tỷ lệ sống từ 98-100%). Khả năng sống của mô sẹo ở nồng độ muối 2,5 g/L không khác biệt so với mô sẹo không

xử lý muối. Xét từng nhân tố riêng rẽ thì liều chiếu xạ tăng và nồng độ muối NaCl tăng thì tỷ lệ sống của mô sẹo giảm (Hình 1). Trung bình tỷ lệ sống ở

liều 40 Gy là 64,5% và ở nồng độ muối 7,5 g/L là 43,5%.

Bảng 1: Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống của mô sẹo (%) ở 1, 3 và 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 1

Liều chiếu xạ và nồng độ NaCl	Tuần sau khi cấy		
	1	3	5
0 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100 a
5 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100 a
10 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100 a
20 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100 a
40 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	98,0 a
0 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100	100 a
5 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	96,0	94,0 ab
10 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100	100 a
20 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	94,0	94,0 ab
40 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	86,0	84,0 abc
0 Gy + NaCl 5 g/L	100	80,0	64,0 def
5 Gy + NaCl 5 g/L	100	82,0	76,0 bcd
10 Gy + NaCl 5 g/L	100	76,0	76,0 bcde
20 Gy + NaCl 5 g/L	100	64,0	54,0 ef
40 Gy + NaCl 5 g/L	100	72,0	62,0 cdef
0 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	75,0	52,5 ef
5 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	82,0	76,0 bcde
10 Gy NaCl 7,5 g/L	100	63,0	43,0 fg
20 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	46,0	32,0 gh
40 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	52,0	14,0 h
Trung bình (Liều chiếu xạ)			
0 Gy	100	88,8 a	79,1 ab
5 Gy	100	90,0 a	86,5 a
10 Gy	100	84,8 a	79,8 ab
20 Gy	100	76,0 b	70,0 bc
40 Gy	100	77,5 b	64,5 c
Trung bình (Nồng độ NaCl)			
NaCl 0 g/L	100	100 a	99,6 a
NaCl 2,5 g/L	100	95,2 a	94,4 a
NaCl 5 g/L	100	74,8 b	66,4 b
NaCl 7,5 g/L	100	63,6 c	43,5 c
F _{liều}		*	**
F _{NaCl}		**	**
F _{liều x NaCl}		ns	**
CV (%)		23,8	28,9

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%

Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu trên mô sẹo cây mía của Nikam *et al.* (2014). Tác giả cũng gây đột biến bằng cách chiếu xạ tia gamma và chọn lọc *in vitro* giống mía Co740. Kết quả cho thấy sự sinh trưởng của mô sẹo và khả năng tái sinh cây bị ảnh hưởng đáng kể bởi liều chiếu xạ và nồng độ muối NaCl. Kết quả nghiên cứu của Chen *et al.* (2011) cũng cho thấy tốc độ tăng trưởng của mô sẹo cỏ Manlia bị ức chế bởi NaCl. Nghiên cứu trên mô sẹo mía CoC-671 của

Patade (2005) cũng cho thấy tỷ lệ sống của mô sẹo sau chiếu xạ giảm đáng kể khi được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ muối tăng từ 0-20 g/L.

3.2 Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối đến tỷ lệ sống của mô sẹo đậu nành MTD 760-4 trong lần chọn lọc 2

Kết quả Bảng 2 cho thấy, trong lần chọn lọc thứ hai, nồng độ muối NaCl vẫn có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹo. Ở 1 tuần SKC, nồng độ muối NaCl 7,5 g/L đã có dấu hiệu gây chết mô sẹo,

tỷ lệ sống giảm còn 94,9% khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Đến 3 tuần SKC, có ảnh hưởng tương tác cũng như ảnh hưởng riêng rẽ của nhân tố liều chiếu xạ và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống của mô sẹo. Liều chiếu xạ tăng và nồng độ muối tăng làm giảm khả năng sống sót. Liều 20 và 40 Gy ở nồng độ 7,5 g/L có tỷ lệ sống thấp nhất, tương ứng là 49,2 và 61,9%, trong khi ở các nồng độ muối 0, 2,5 và 5 g/L, mô sẹo sống cao từ 86,3%-100%. Ở thời điểm 5 tuần SKC, tương tác giữa liều

chiếu xạ và nồng độ muối NaCl cho thấy khi chiếu xạ với liều từ 5-40 Gy, mô sẹo được xử lý muối 7,5 g/L bị giảm tỷ lệ sống rất đáng kể, nhất là mô sẹo ở liều 20 và 40 Gy (tương ứng là 25,8 và 34,6%). Xét riêng rẽ từng nhân tố thì liều chiếu xạ cũng như nồng độ NaCl đều có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹo, tỷ lệ sống cũng giảm khi liều chiếu xạ và nồng độ muối cao. Trung bình ở liều 20 và 40 Gy là 74% và ở nồng độ 7,5 g/L là 53,2%.

Bảng 2: Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống của mô sẹo (%) ở 1, 3 và 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 2

Liều chiếu xạ và nồng độ NaCl	Tuần sau khi cấy		
	1	3	5
0 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
5 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
10 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
20 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
40 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
0 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100 a	100 a
5 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	98,0 a	94,0 a
10 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100 a	100 a
20 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100 a	100 a
40 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100 a	100 a
0 Gy + NaCl 5 g/L	100	90,9 a	84,2 ab
5 Gy + NaCl 5 g/L	98,0	90,0 a	78,0 bc
10 Gy + NaCl 5 g/L	100	96,0 a	83,7 ab
20 Gy + NaCl 5 g/L	100	86,3 a	70,0 bc
40 Gy + NaCl 5 g/L	100	90,7 a	61,4 cd
0 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	100 a	91,3 a
5 Gy + NaCl 7,5 g/L	94,0	69,3 b	51,0 de
10 Gy NaCl 7,5 g/L	100	72,5 b	63,4 cd
20 Gy + NaCl 7,5 g/L	87,5	49,2 c	25,8 f
40 Gy + NaCl 7,5 g/L	92,8	61,9 bc	34,6 ef
Trung bình (Liều chiếu xạ)			
0 Gy	100	97,7 a	92,9 a
5 Gy	98,0	89,3 b	80,8 bc
10 Gy	100	92,1 ab	86,8 ab
20 Gy	96,9	83,9 b	74,0 c
40 Gy	98,2	88,1 b	74,0 c
Trung bình (Nồng độ NaCl)			
NaCl 0 g/L	100 a	100 a	100 a
NaCl 2,5 g/L	100 a	99,6 a	98,8 a
NaCl 5 g/L	99,6 a	90,8 b	75,5 b
NaCl 7,5 g/L	94,9 b	70,6 c	53,2 c
F_{liều}	ns	**	**
F_{NaCl}	**	**	**
F_{liều x NaCl}	ns	**	**
CV (%)	7,8	17,5	24,0

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%

Nhìn chung, qua lần chọn lọc thứ 2, stress mặn vẫn có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4. Nồng độ muối NaCl cao từ 5-7,5 g/L thì tỷ lệ sống của mô sẹo giảm đáng kể.

Liều chiếu xạ cao cũng ảnh hưởng đến sinh trưởng của mô sẹo. Mô sẹo không chiếu xạ vẫn có khả năng chịu mặn ở nồng độ muối 5 và 7,5 g/L.

3.3 Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối đến tỷ lệ sống của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 3

Trong lần chọn lọc thứ ba, tỷ lệ sống của mô sẹo bắt đầu giảm ở tuần 3. Liều chiếu xạ và nồng độ muối NaCl cũng có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹo. Tỷ lệ sống giảm ở liều chiếu xạ cao cũng như nồng độ NaCl cao. Liều 40 Gy có tỷ lệ sống thấp nhất là 83%, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (96,4%) và nồng độ NaCl 7,5 g/L có tỷ lệ sống thấp nhất là 75%, khác biệt có ý nghĩa so

với muối 5 g/L và 0 g/L (lần lượt là 84,7 và 100%).

Đến 5 tuần SKC, liều chiếu xạ và nồng độ NaCl vẫn có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹo. Mô sẹo chết cao khi tăng nồng độ muối hoặc tăng liều chiếu xạ. Cụ thể, ở liều 40 Gy mô sẹo sống 67,8%, thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa so với liều 0 Gy. Ở nồng độ NaCl 7,5 g/L, mô sẹo sống với tỷ lệ thấp nhất là 45,9% (so với đối chứng là 100%). Không có ảnh hưởng tương tác giữa liều chiếu xạ và nồng độ NaCl lên sự sinh trưởng của mô sẹo.

Bảng 3: Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống của mô sẹo (%) ở 1, 3 và 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 3

Liều chiếu xạ và nồng độ NaCl	Tuần sau khi cấy		
	1	3	5
0 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100
5 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100
10 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100
20 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100
40 Gy + NaCl 0 g/L	100	100	100
0 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100	100
5 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100	100
10 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100	100
20 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100	98,0
40 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	98,0	98,0
0 Gy + NaCl 5 g/L	100	100	73,4
5 Gy + NaCl 5 g/L	100	77,2	69,3
10 Gy + NaCl 5 g/L	100	91,7	81,3
20 Gy + NaCl 5 g/L	100	77,8	53,0
40 Gy + NaCl 5 g/L	100	77,0	49,0
0 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	85,7	63,1
5 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	81,0	53,0
10 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	76,3	49,4
20 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	75,0	40,0
40 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	57,0	24,0
Trung bình (Liều chiếu xạ)			
0 Gy	100	96,4 a	84,1 a
5 Gy	100	89,6 ab	80,6 ab
10 Gy	100	92,0 ab	82,7 a
20 Gy	100	88,2 ab	72,8 ab
40 Gy	100	83,0 b	67,8 b
Trung bình (Nồng độ NaCl)			
NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
NaCl 2,5 g/L	100	99,6 a	99,2 a
NaCl 5 g/L	100	84,7 b	65,2 b
NaCl 7,5 g/L	100	75,0 c	45,9 c
F_{liều}		*	*
F_{NaCl}		**	**
F_{liều x NaCl}		ns	ns
CV (%)		22,5	30,3

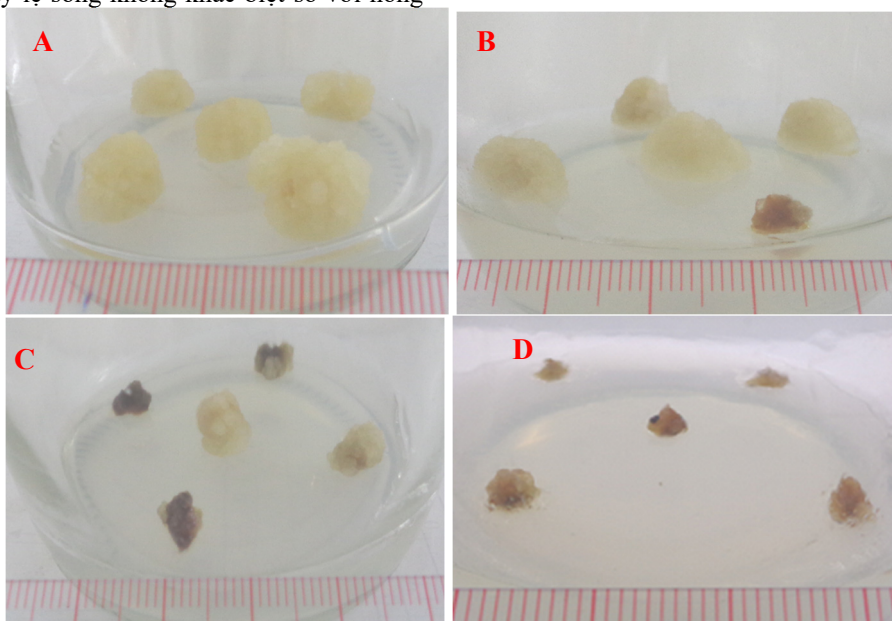
Những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan;(ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (*): khác biệt ở mức 5%; (**): khác biệt ở mức 1%

3.4 Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối đến tỷ lệ sống của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 trong lần chọn lọc 4

Bảng 4 cho thấy đến lần xử lý mặn thứ tư, ở 1 tuần SKC, nồng độ NaCl có ảnh hưởng đến khả năng sống của mô sẹo. Ở nồng độ 7,5 g/L, tỷ lệ sống của mô sẹo giảm tương đối ít (còn 91,7%), tuy nhiên thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nồng độ khác. Ở thời điểm này, liều chiếu xạ cũng như tương tác giữa liều chiếu xạ và nồng độ muối không có ảnh hưởng khác biệt trên tỷ lệ sống. Đến 3 và 5 tuần SKC thì ảnh hưởng của từng nhân tố cũng như tương tác giữa 2 nhân tố này khác biệt có ý nghĩa thống kê. Cụ thể, ở 3 tuần SKC, ở nồng độ muối 7,5 g/L, gần như các mô sẹo được chiếu xạ với các liều từ 5-40 Gy có tỷ lệ sống thấp (từ 25,6-45,7%), khác biệt có ý nghĩa so với mô sẹo không chiếu xạ ở cùng nồng độ muối. Trong đó, thấp nhất là mô sẹo ở liều 40 Gy (có tỷ lệ sống là 25,6%). Ở 5 tuần SKC thì các mô sẹo được chiếu xạ từ 10-40 Gy đều bị chết 100% ở nồng độ mặn 7,5 g/L, duy nhất có 1 dòng mô sẹo sống sót với tỷ lệ 22,9% ở liều 5 Gy. Mô sẹo không chiếu xạ có tỷ lệ sống cao ở 3 tuần SKC (83,3%) cũng bị chết 100% ở thời điểm này. Đối với các mẫu mô sẹo sống sót ở nồng độ mặn 5 g/L, tỷ lệ sống đạt được trên 50% ở cả mô sẹo chiếu xạ và không chiếu xạ, ngoại trừ mô sẹo ở liều chiếu xạ 40 Gy (4%). Những mẫu sống sót ở nồng độ mặn 2,5 g/L có tỷ lệ sống không khác biệt so với nồng

độ muối 0 g/L cho thấy mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 sinh trưởng bình thường ở điều kiện mặn 2,5 g/L. Nhìn chung, mô sẹo chết cao khi tăng liều chiếu xạ cũng như tăng nồng độ muối NaCl. Tỷ lệ sống trung bình ở liều 40 Gy là 70,4% và nồng độ muối 7,5 g/L là 42,5% ở 3 tuần SKC và giảm còn 50,5% ở liều chiếu xạ 40 Gy và 4,6% ở nồng độ mặn 7,5 g/L.

Kết quả sau 4 lần cấy chuyển liên tục trên môi trường mặn cho thấy khả năng sống của mô sẹo bị ảnh hưởng không chỉ do nồng độ mặn mà còn do tổn thương của sự chiếu xạ. Liều chiếu xạ tăng và tăng nồng độ muối NaCl thì tỷ lệ sống của mô sẹo giảm đáng kể (Hình 2). Mô sẹo sống sót ở nồng độ mặn cao 7,5 g/L chỉ đạt được đối với mẫu được chiếu xạ với liều 5 Gy (1 dòng). Nhìn chung, các dòng mô sẹo có khả năng chịu mặn ở nồng độ 5 g/L có tỷ lệ sống khá cao ở cả nghiệm thức không chiếu xạ và chiếu xạ (ngoại trừ liều 40 Gy) cho thấy có thể chọn lọc đơn thuần hoặc kết hợp chiếu xạ tia gamma với liều từ 5-40 Gy để tạo các dòng mô sẹo chịu mặn ở nồng độ 5 g/L. Bên cạnh đó cũng cho thấy giống đậu nành MTĐ 760-4 ở mức độ mô sẹo có khả năng sinh trưởng bình thường ở nồng độ mặn NaCl 2,5 g/L. Trong chọn lọc giống đậu nành cv. Acme., Liu và Staden (2000) đã thu được 1 dòng tế bào chống chịu mặn với nồng độ muối NaCl 100 mM bằng cách cấy chuyển liên tục trên môi trường này.



Hình 2: Mức độ sống sót của mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 sau 5 tuần nuôi cấy ở lần chọn lọc 4
(A) Môi trường MS (đối chứng) (B) Môi trường MS + NaCl 2,5 g/L
(C) Môi trường MS + NaCl 5 g/L (D) Môi trường MS + NaCl 7,5 g/L

Bảng 4: Ảnh hưởng của liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối NaCl đến tỷ lệ sống của mô sẹo (%) ở 1, 3 và 5 tuần sau khi cấy trong lần chọn lọc 4

Liều chiếu xạ và nồng độ NaCl	Tuần sau khi cấy		
	1	3	5
0 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
5 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
10 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
20 Gy + NaCl 0 g/L	100	96,0 a	94,0 a
40 Gy + NaCl 0 g/L	100	100 a	100 a
0 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100 a	100 a
5 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100 a	94,0 a
10 Gy + NaCl 2,5 g/L	98,0	98,0 a	98,0 a
20 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	96,0 a	86,0 a
40 Gy + NaCl 2,5 g/L	100	100 a	98,0 a
0 Gy + NaCl 5 g/L	100	78,0 bc	62,8 b
5 Gy + NaCl 5 g/L	100	80,7 b	64,7 b
10 Gy + NaCl 5 g/L	96,7	68,7 bcd	62,7 b
20 Gy + NaCl 5 g/L	95,0	60,9 cd	60,9 b
40 Gy + NaCl 5 g/L	100	56,0 de	4,00 d
0 Gy + NaCl 7,5 g/L	100	83,3 b	0,0 d
5 Gy + NaCl 7,5 g/L	97,1	45,7 def	22,9 c
10 Gy + NaCl 7,5 g/L	91,4	27,9 fg	0,0 d
20 Gy + NaCl 7,5 g/L	82,5	30,0 efg	0,0 d
40 Gy + NaCl 7,5 g/L	87,5	25,6 g	0,0 d
Trung bình (Liều chiếu xạ)			
0 Gy	100	90,3 a	60,7 a
5 Gy	99,3	81,6 ab	70,4 a
10 Gy	96,5	73,6 bc	65,2 a
20 Gy	94,4	70,7 bc	60,2 a
40 Gy	96,9	70,4 c	50,5 b
Trung bình (Nồng độ NaCl)			
NaCl 0 g/L	100 a	99,2 a	98,8 a
NaCl 2,5 g/L	99,6 a	98,8 a	95,2 a
NaCl 5 g/L	98,3 a	68,9 b	51,0 b
NaCl 7,5 g/L	91,7 b	42,5 c	4,60 c
F_{liều}	ns	**	**
F_{NaCl}	**	**	**
F_{liều x NaCl}	ns	**	*
CV (%)	10,2	23,9	27,2

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 5%; (**): khác biệt ở mức 1%.

Kết quả phân tích proline ở Bảng 5 cho thấy có ảnh hưởng của nồng độ muối lên sự tích lũy proline trong mẫu mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4, nồng độ muối tăng thì hàm lượng proline tăng. Hàm lượng proline cao nhất ở nồng độ muối 5 và 7,5 g/L (tương ứng là 2,32 và 2,42 μmol/g trọng lượng tươi), không khác biệt nhau nhưng khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (1,36 μmol). Tương tác giữa liều chiếu xạ và nồng độ NaCl cũng có ý

nghĩa. Mô sẹo không chiếu xạ hoặc chiếu xạ 5 và 40 Gy mà không xử lý mặn hoặc xử lý mặn 2,5 g/L ở liều 0 và 5 Gy thì hàm lượng proline thấp nhất (khoảng 0,76-1,12 μmol). Mô sẹo không chiếu xạ và mô sẹo ở liều 10 Gy khi được xử lý mặn ở 5 g/L có hàm lượng proline cao nhất với tương ứng là 3,62 và 2,86 μmol. Mô sẹo chiếu xạ 5 Gy có khả năng sống ở nồng độ muối 7,5 g/L cũng có sự tích lũy proline khá cao (2,42 μmol).

Bảng 5: Hàm lượng proline của mô sẹo đậu nành sau 4 lần chọn lọc với muối NaCl ($\mu\text{mol/g}$ trọng lượng tươi)

Liều chiếu xạ (Gy)	Nồng độ NaCl (g/L)				Trung bình
	0	2,5	5	7,5	
0	0,85 e	1,10 e	3,62 a	-	1,85
5	1,05 e	0,76 e	1,52 cde	2,42 bcd	1,44
10	1,28 de	1,61 cde	2,86 ab	-	1,91
20	2,49 bc	1,30 de	1,31 de	-	1,70
40	1,12 e	1,69 cde	2,33 bcd	-	1,71
Trung bình	1,36 b	1,29 b	2,32 a	2,42 a	
F_{liều}			ns		
F_{NaCl}			**		
F_{liều x NaCl}			**		
CV (%)			40,7		

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%

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 thâm 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 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 cho thấy trong các dòng mô sẹo sống sót ở nồng độ NaCl cao 5 g/L và 1 dòng ở nồng độ 7,5 g/L thì dòng mô sẹo ở liều 0, 10 và 40 Gy và ở nồng độ 7,5 g/L với liều 5 Gy có khả năng chống chịu mặn do có sự tích lũy proline cao, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (0 Gy + 0 NaCl).

Kết quả tổng hợp được cho thấy, qua 4 lần chọn lọc với muối NaCl, mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 được chiếu xạ tia gamma từ 5-40 Gy hoặc không chiếu xạ có khả năng chống chịu mặn đến nồng độ 5 và 7,5 g/L. Hàm lượng proline tích lũy cao ở các dòng mô sẹo này chứng tỏ chúng đã có sự điều chỉnh áp suất thâm 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 MTĐ 760-4 sinh trưởng bình thường ở nồng độ muối NaCl 2,5 g/L. Qua 4 lần chọn lọc thu được các dòng mô sẹo đậu nành MTĐ 760-4 có khả năng chịu mặn với nồng độ muối NaCl 5 g/L ở mẫu không chiếu xạ hoặc ở mẫu chiếu xạ tia gamma với liều từ 5-40 Gy và một

dòng mô sẹo chịu mặn cao đến 7,5 g/L ở mẫu được chiếu xạ với liều 5 Gy.

4.2 Đề xuất

Tái sinh chồi và tạo thành cây các dòng mô sẹo chống chịu mặn để tiếp tục đánh giá sự ổn định của tính chống chịu mặn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Basu, S., G. Gangopadhyay, B.B. 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, 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.

Chen, S., C. Mingliang, J. Yuàng, G. Zhongshan, Z. Li, Minxia Gu (2011). In vitro selection of salt tolerant variants following 60Co gamma irradiation of long-term callus cultures of *Zoysia matrella* (L.) Merr. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 493-500.

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., Mathur, G., Koul, S. & Sarin, NB. 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.
- 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.
- Nikam, A. A., R. M. Devarumath, M. G. Shitole, V. S. Ghole, P. N. Tawar and P. Suprasanna, 2014. Gamma radiation, in vitro selection for salt (NaCl) tolerance, and characterization of mutants in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. DOI 10.1007/s11627-014-9630-4.
- 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.
- Patade, V. Y., P. Suprasanna and V. A. Bapat, 2008. Gamma Irradiation of Embryogenic Callus Cultures and In vitro Selection for Salt Tolerance in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Agricultural Sciences in China*, 7 (9): 1147–1152.
- 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.
- Yaycili, O. and S. Alikamanoğlu, 2012. Induction of salt-tolerant potato (*Solanum tuberosum* L.) mutants with gamma irradiation and characterization of genetic variations via RAPD-PCR analysis. *Turk J Biol*, 36: 405-412.