

Tìm hiểu sự phát triển chồi *in vitro* của cây cúc đại đóa (*Chrysanthemum indicum* L.) trong điều kiện stress mặn

Trần Thanh Thắng, Phan Thị Diễm Trinh, Trần Thanh Hương

Tóm tắt—Trong nghiên cứu này, NaCl ở các nồng độ thay đổi từ 4–10 g/L được dùng để khảo sát khả năng chịu mặn của các khúc cắt mang chồi cây cúc đại đóa trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Các biến đổi hình thái, sinh lý và sinh hóa trong quá trình đáp ứng với stress mặn của các khúc cắt chồi được phân tích. NaCl ở nồng độ 6 g/L làm giảm khả năng phát triển của các khúc cắt chồi. Trong điều kiện stress mặn, các tế bào nhu mô gần gân chính của các lá phát triển từ khúc cắt chồi có sự giảm lục lạp, trước khi hóa nâu và chết. Bên cạnh đó, hàm lượng carotenoid, tinh bột và cường độ quang hợp của lá giảm. Ngược lại, cường độ hô hấp, hàm lượng proline và đường tổng số, hoạt tính IAA và gibberellin nội sinh tăng mạnh. Việc áp dụng IAA 0,25 mg/L, zeatin 0,1 mg/L và GA₃ 0,1 mg/L giúp chồi tăng trưởng tốt hơn trong điều kiện stress mặn. Sự phối hợp BA 0,2 mg/L, NAA 2 mg/L và NaCl 6 g/L giúp tạo các chồi có khả năng phát triển tốt hơn trong điều kiện stress mặn.

Từ khóa—*Chrysanthemum indicum*, phát triển chồi, stress mặn, chất điều hòa tăng trưởng thực vật.

1 MỞ ĐẦU

Cúc là một trong những loài cây có hoa đẹp và giá trị kinh tế cao. Trên thế giới, hoa cúc xếp thứ hai sau hoa hồng về tỉ lệ hoa cắt cành. Giá trị xuất khẩu hoa cúc trên thế giới đạt 1,5 tỷ USD mỗi năm [13]. Tại Việt Nam, cúc có nhiều giống trồng khác nhau với sự đa dạng về màu sắc, hương thơm và kiểu dáng. Trong đó cúc đại đóa là giống trồng được ưu tiên chọn lựa vì có nhu cầu tiêu thụ trên thị trường cao. Trên thị trường hiện nay, cúc đại

đóa được tiêu thụ phổ biến ở hai dạng là hoa cắt cành và hoa trồng trong chậu. Tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, việc trồng chậu thường được các nhà vườn đặc biệt quan tâm. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, tình trạng nhiễm mặn ở Đồng bằng sông Cửu Long đã đến mức báo động, ảnh hưởng trên diện rộng và gây ra thiệt hại lớn cho việc sản xuất loài cây này [9]. Sự nhiễm mặn do nước tưới làm giảm sự tăng trưởng và phát triển của cây, dẫn đến giảm năng suất và chất lượng hoa. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát sự phát triển chồi *in vitro* cây cúc đại đóa trong điều kiện stress mặn nhằm đánh giá khả năng chịu mặn của cây cúc đại đóa và tạo vật liệu tái sinh có khả năng thích nghi với điều kiện stress mặn.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây cúc đại đóa *in vitro* 5 tuần tuổi có chiều cao 4–5 cm, mang 8–9 lá tăng trưởng trên môi trường MS [14] ở nhiệt độ 22 ± 2 °C, cường độ ánh sáng 2000 ± 200 lux, độ ẩm 56 ± 2 %.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của NaCl ở các nồng độ khác nhau trên sự phát triển của khúc cắt chồi từ cây in vitro

Các khúc cắt chồi nách ở các vị trí từ 2 đến 4 (tính từ ngọn chồi) có chiều cao khoảng 0,5 cm từ cây *in vitro* tăng trưởng trên môi trường MS [10] được cô lập và cấy vào ống nghiệm chứa 15 mL môi trường MS ½ có hay không có bổ sung NaCl ở các nồng độ 4, 6, 8 hay 10 g/L. Các mẫu cây được đặt nuôi ở điều kiện ánh sáng 2000 ± 200 lux (12/24 giờ), nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 mẫu cây. Sau 3 tuần nuôi cấy, chiều cao cây, số lá,

Ngày nhận bản thảo: 12-9-2017; Ngày chấp nhận đăng: 10-10-2017, Ngày đăng: 15-10-2018.

Tác giả Trần Thanh Thắng, Phan Thị Diễm Trinh, Trần Thanh Hương* – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(e-mail: trthuong@hcmus.edu.vn)

diện tích lá, số rễ, chiều dài rễ và thời điểm hóa nâu của lá được xác định.

Quan sát các biến đổi hình thái

Các biến đổi hình thái được quan sát trực tiếp, dưới kính hiển vi soi nổi hay thông qua kính hiển vi quang học sau sự cắt bằng tay.

Xác định hàm lượng diệp lục tố và carotenoid

Hàm lượng diệp lục tố a, b, carotenoid trong mẫu được ly trích bằng ethanol, sau đó thực hiện theo các bước đun cách thủy 70 °C trong 10 phút, ly tâm 2500 vòng/phút trong 10 phút lấy dịch nổi, xác định nhờ máy đo quang phổ (UV-2602, USA) ở 3 bước sóng 470 nm, 648 nm, 664 nm và được tính theo Lichtenthaler (1987) [5]. Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Đo cường độ quang hợp và hô hấp

Cường độ quang hợp ($\mu\text{mol O}_2/\text{cm}^2/\text{giờ}$) và hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g}$ trọng lượng tươi/giờ) của mẫu cây được xác định bằng điện cực oxygen dựa trên sự giảm tỉ lệ oxygen trong buồng đo (LeafLab2, Hansetech) theo thời gian, ở nhiệt độ 22 °C. Cường độ quang hợp được đo ở cường độ ánh sáng 2000 lux. Cường độ hô hấp được đo trong tối. Kết quả là giá trị trung bình của 5 lần lặp lại.

Xác định hàm lượng tinh bột và đường tổng số

Hàm lượng đường tổng số và tinh bột có trong mẫu được ly trích bằng dung dịch ethanol, thực hiện phản ứng màu với H_2SO_4 , phenol và xác định các hàm lượng bằng cách so sánh với đường chuẩn sucrose (hàm lượng đường tổng số) hay glucose (hàm lượng tinh bột) bằng máy đo quang phổ (UV-2602, USA) ở bước sóng 490 nm [6]. Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Xác định hàm lượng proline

Hàm lượng proline có trong mẫu được ly trích bằng dung dịch ethanol, thực hiện phản ứng màu với ninhydrin, acetic acid, ethanol ở 95 °C trong 20 phút và xác định nhờ so sánh với đường chuẩn proline bằng máy đo quang phổ (UV-2602, USA) ở bước sóng 520 nm [12]. Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Ly trích và đo hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: auxin (IAA), cytokinin (zeatin), gibberellin, abscisic acid

(ABA) có trong mẫu cây được ly trích và cô lập bằng cách dùng các dung môi thích hợp, sau đó thực hiện sắc ký trên bản mỏng silica gel 60 F254 (mã số 1,05554; Merck), ở nhiệt độ 29 °C với dung môi di chuyển chloroform : methanol : acetic acid (80:15:5 v/v). Vị trí của các hormone tăng trưởng thực vật được phát hiện nhờ quan sát trực tiếp dưới tia UV. Hoạt tính các hormone tăng trưởng thực vật được đo bằng sinh trắc nghiệm: diệp tiêu lúa (*Oryza sativa* L.) cho auxin và abscisic acid, từ diệp dưa leo (*Cucumis sativus* L.) cho cytokinin, cây mầm xà lách (*Lactuca sativa* L.) cho gibberellin [3, 4].

Áp dụng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát triển chồi từ cây in vitro trong điều kiện stress mặn

Các khúc cắt chồi nách ở các vị trí từ 2 đến 4 (tính từ ngọn chồi) có chiều cao khoảng 0,5 cm từ cây *in vitro* tăng trưởng trên môi trường MS [10] được cô lập và cấy vào ống nghiệm chứa 15 mL môi trường MS $\frac{1}{2}$ với NaCl có hay không có bổ sung IAA 0,25 mg/L, zeatin 0,1 mg/L và GA₃ 0,1 mg/L. Các mẫu cây được đặt nuôi ở điều kiện ánh sáng 2000 \pm 200 lux (12/24 giờ), nhiệt độ 22 \pm 2 °C và ẩm độ 58 \pm 3 %. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 mẫu cây. Sau 3 tuần nuôi cấy, chiều cao cây, số lá, diện tích lá, số rễ và chiều dài rễ được xác định.

Tạo chồi có khả năng tăng trưởng trong điều kiện stress mặn

Lá mở thứ 2 của cây cúc đại đóa *in vitro* 5 tuần tuổi tính từ ngọn, tăng trưởng trên môi trường MS được cô lập, tạo các vết thương vuông góc với gân chính và cấy vào erlen 250 mL chứa 20 mL môi trường MS $\frac{1}{2}$ với BA 0,2 mg/L, NAA 2 mg/L [10] có hay không có bổ sung NaCl 6 g/L. Các mẫu cây được đặt nuôi ở điều kiện ánh sáng 2000 \pm 200 lux (12/24 giờ), nhiệt độ 22 \pm 2 °C và ẩm độ 58 \pm 3 %. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 erlen, mỗi erlen gồm 3 mẫu cây. Sau 6 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo chồi và số chồi được xác định.

Các chồi tái sinh có chiều cao khoảng 0,5 cm được cô lập và cấy vào ống nghiệm chứa 15 mL môi trường MS $\frac{1}{2}$ với NaCl 6 g/L. Các mẫu cây được đặt nuôi ở điều kiện ánh sáng 2000 \pm 200 lux (12/24 giờ), nhiệt độ 22 \pm 2 °C và ẩm độ 58 \pm 3%.

Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 10 mẫu cây. Sau 3 tuần nuôi cấy, chiều cao cây, số lá, diện tích lá, số rễ và chiều dài rễ được xác định.

Xử lý thống kê

Kết quả thí nghiệm được phân tích bằng chương trình thống kê SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) dùng cho Window phiên bản 20.0. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 95% của giá trị được thể hiện bởi các mẫu tự hoặc chữ số kèm theo.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của NaCl ở các nồng độ khác nhau trên sự phát triển của khúc cắt chồi từ cây *in vitro*

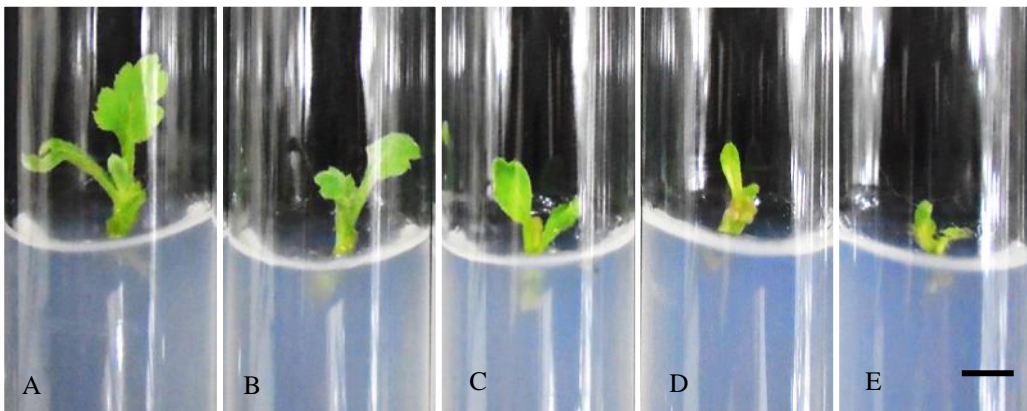
Sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung NaCl ở các nồng độ từ 4 – 10 g/L, sự tăng trưởng của chồi và rễ giảm dần khi gia tăng nồng độ NaCl xử lý. Ở nồng độ NaCl 4 g/L, sự tăng trưởng của chồi không bị ảnh hưởng, số rễ không thay đổi nhưng chiều dài rễ giảm mạnh so với đối chứng. Ở các nồng độ NaCl từ 6 g/L đến 10 g/L chiều cao cây, số lá, diện tích lá giảm mạnh và đặc biệt không có sự tạo rễ (Bảng 1, Hình 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của NaCl ở các nồng độ khác nhau trên sự phát triển chồi từ khúc cắt chồi *in vitro* cây cúc đại đóa sau 3 tuần nuôi cấy

Nồng độ NaCl xử lý (g/L)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Diện tích lá (cm ²)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)
Đối chứng (MS ½)	1,36 ± 0,13 ^a	2,83 ± 0,18 ^a	1,27 ± 0,06 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	0,80 ± 0,03 ^a
4	1,33 ± 0,11 ^a	2,80 ± 0,24 ^a	1,22 ± 0,05 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	0,60 ± 0,05 ^b
6	1,08 ± 0,07 ^b	2,20 ± 0,13 ^b	0,90 ± 0,03 ^b	-	-
8	0,56 ± 0,04 ^c	1,20 ± 0,23 ^c	0,52 ± 0,02 ^c	-	-
10	0,52 ± 0,02 ^c	0,80 ± 0,22 ^c	0,48 ± 0,03 ^c	-	-

Ghi chú: (-): không có sự tạo rễ

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$



Hình 1. Sự phát triển chồi từ khúc cắt chồi nách trên môi trường có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy; Thanh ngang 1 cm
 (A). Đối chứng (MS ½); (B). NaCl 4 g/L; (C). NaCl 6 g/L; (D). NaCl 8 g/L; (E). NaCl 10 g/L

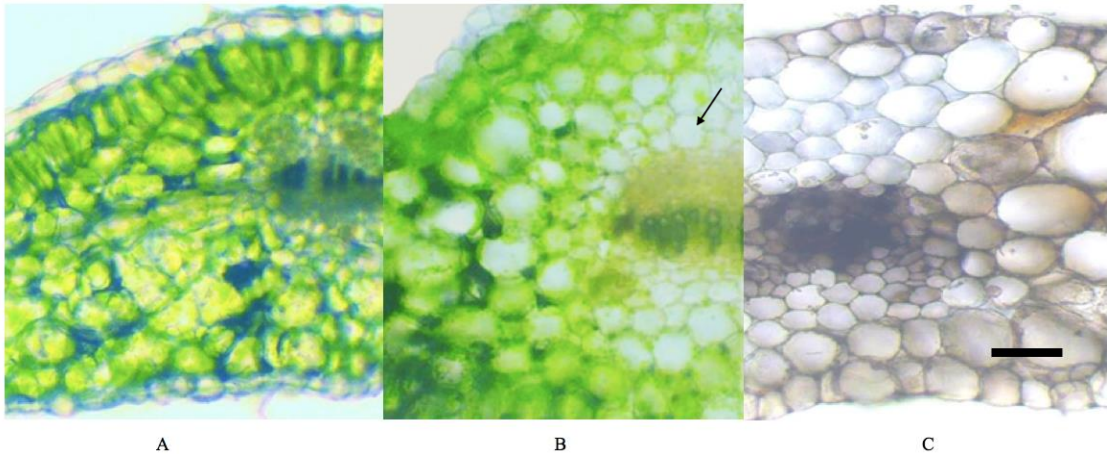
Việc bổ sung NaCl dẫn đến sự xuất hiện các đốm nâu trên lá, sự xuất hiện các đốm nâu xảy ra nhanh hơn khi tăng dần nồng độ NaCl. Các đốm nâu xuất hiện sớm nhất ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có bổ sung NaCl 10 g/L, chậm hơn ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có bổ sung

NaCl 8 g/L, 6 g/L và chậm nhất ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có bổ sung NaCl ở nồng độ 4 g/L (Bảng 2). Sự hóa nâu ở lá bắt đầu do sự giảm diệp lục tố ở các tế bào nhu mô gần mạch dẫn. Sau đó tế bào tiếp tục hóa nâu và chết (Hình 2).

Bảng 2. Thời điểm xuất hiện đốm nâu trên lá của khúc cắt chồi *in vitro* tăng trưởng trên môi trường MS ½ có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ NaCl xử lý (g/L)	Thời điểm xuất hiện đốm nâu trên lá (ngày)
Đối chứng (MS ½)	0 ± 0 ^a
4	32 ± 3 ^a
6	26 ± 2 ^b
8	17 ± 1 ^c
10	7 ± 1 ^d

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$

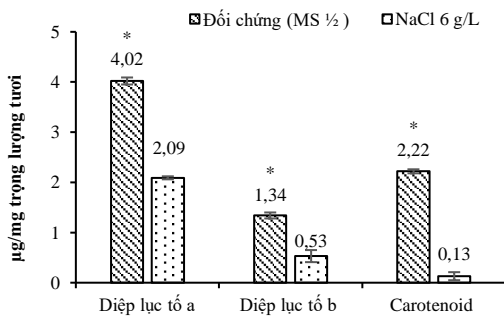


Hình 2. lát cắt ngang qua gân chính của lá của mẫu cây tăng trưởng trên môi trường MS ½ có bổ sung NaCl 6 g/L ở các thời điểm ngày 0 (A), 23 (B) và 26 (C). Mũi tên: các tế bào nhu mô gần mạch bị mất diệp lục tố; Thanh ngang 100 μm.

Các biến đổi sinh lý, sinh hóa của mẫu cây trong điều kiện stress mặn

Hàm lượng diệp lục tố và carotenoid

Sau 2 tuần nuôi cấy, hàm lượng diệp lục tố a, b và đặc biệt là carotenoid trong mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có bổ sung NaCl 6 g/L thấp hơn so với đối chứng (Hình 3).

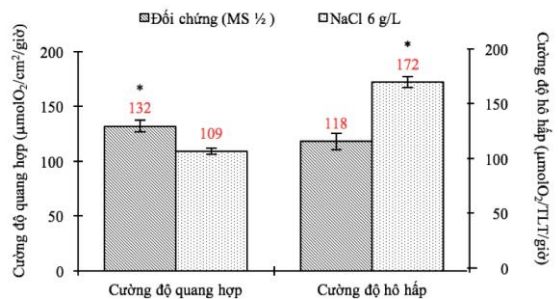


Hình 3. Hàm lượng diệp lục tố a, b và carotenoid trong khúc cắt chồi *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy

(*), trong cùng 1 chỉ tiêu theo dõi khác biệt có ý nghĩa $p = 0,05$ (T-Test)

Cường độ quang hợp và hô hấp

Sau 2 tuần nuôi cấy, cường độ quang hợp của mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có bổ sung NaCl 6 g/L thấp hơn so với đối chứng. Ngược lại, cường độ hô hấp của mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có bổ sung NaCl 6 g/L cao hơn so với đối chứng (Hình 4).

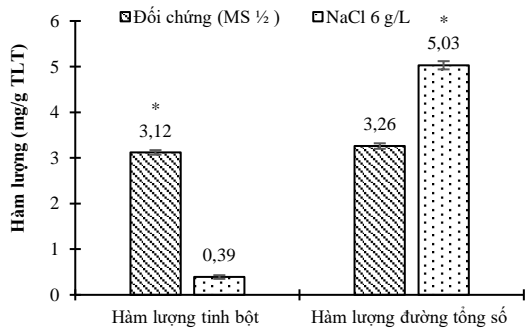


Hình 4. Cường độ quang hợp và hô hấp của khúc cắt chồi *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy

(*), trong cùng 1 chỉ tiêu theo dõi khác biệt có ý nghĩa $p = 0,05$ (T-Test)

Hàm lượng tinh bột và đường tổng số

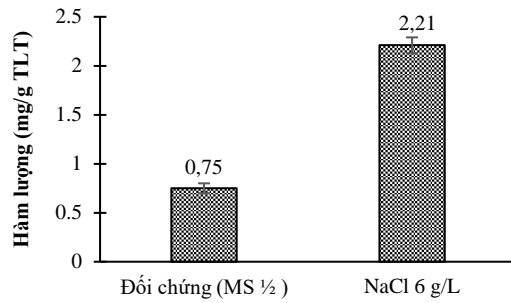
Sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung NaCl 6 g/L, hàm lượng tinh bột trong mẫu cây giảm mạnh trong khi đó hàm lượng đường tổng số tăng cao khi so với đối chứng (Hình 5).



Hình 5. Hàm lượng tinh bột và đường tổng số của khúc cắt chồi *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy (*), trong cùng 1 chỉ tiêu theo dõi khác biệt có ý nghĩa $p = 0,05$ (T-Test)

Hàm lượng proline

Trong điều kiện xử lý NaCl 6 g/L, mẫu cây có sự gia tăng tổng hợp proline. Hàm lượng proline có sự tăng cao so với đối chứng (Hình 6).



Hình 6. Hàm lượng proline trong khúc cắt chồi *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy (*), khác biệt có ý nghĩa $p = 0,05$ (T-Test)

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh

Sau hai tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung NaCl 6 g/L, hoạt tính IAA và gibberellin gia tăng, đặc biệt là hoạt tính gibberellin. Hoạt tính zeatin và ABA trong mẫu cây không có sự khác biệt so với đối chứng (Bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong khúc cắt chồi *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh (mg/L)			
	IAA	Zeatin	Gibberellin	ABA
Đối chứng (MS ½)	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,02
NaCl 6 g/L	0,32 ± 0,03 *	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,05 *	0,12 ± 0,03

(*), khác biệt trong cột có ý nghĩa $p = 0,05$ (T-Test)

Ảnh hưởng của sự phối hợp các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát triển chồi *in vitro* trong điều kiện stress mặn

0,25 mg/L; zeatin 0,1 mg/L và GA₃ 0,1 mg/L vào môi trường MS ½ có NaCl 6 g/L giúp cải thiện sự phát triển chồi và rễ (Bảng 4).

Sau 3 tuần nuôi cấy, sự phối hợp bổ sung IAA

Bảng 4. Ảnh hưởng của sự phối hợp các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát triển chồi *in vitro* trong điều kiện stress mặn sau 2 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Diện tích lá (cm ²)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ
Đối chứng (MS ½)	1,36 ± 0,13 ^a	2,83 ± 0,18 ^a	1,27 ± 0,06 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	0,80 ± 0,03 ^a
NaCl 6 g/L	1,08 ± 0,07 ^b	2,20 ± 0,13 ^b	0,90 ± 0,03 ^b	-	-
NaCl 6 g/L, IAA 0,25 mg/L, zeatin 0,1 mg/L và GA ₃ 0,1 mg/L	1,26 ± 0,07 ^a	2,67 ± 0,15 ^a	1,36 ± 0,09 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	0,75 ± 0,09 ^a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$

Khả năng tái sinh chồi từ lá cúc đại đóa *in vitro* trong điều kiện stress mặn

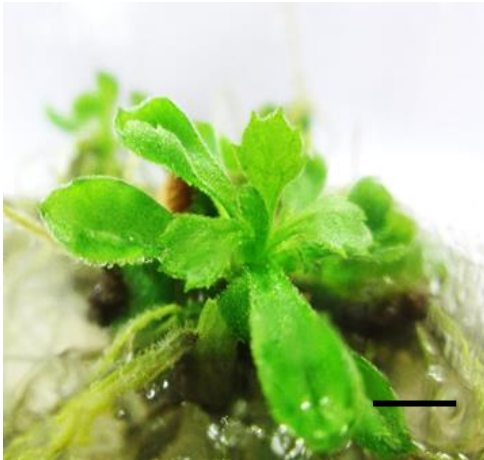
Sau 6 tuần nuôi cấy trong điều kiện stress mặn (MS ½ với BA 0,2 mg/L, NAA 2 mg/L và NaCl 6 g/L), các lá vẫn có khả năng tạo chồi. Tuy nhiên, tỉ lệ mẫu tạo chồi và số chồi trên mẫu cấy giảm mạnh so với đối chứng (Bảng 5, Hình 7).

Bảng 5. Khả năng tái sinh chồi từ lá cây *in vitro* trong điều kiện stress mặn sau 6 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu
Đối chứng **	100,00 ± 0,00 *	8,25 ± 1,42 *
NaCl 6 g/L	62,47 ± 3,17	2,53 ± 1,67

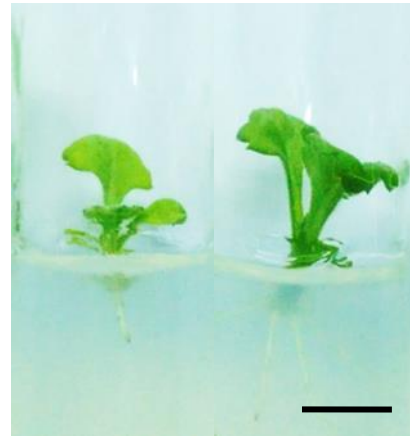
(*), khác biệt trong cột có ý nghĩa $p = 0,05$ (T-Test)

(**), đối chứng: MS ½ với BA 0,2 mg/L và NAA 2 mg/L



Hình 7. Chồi tái sinh trên môi trường MS ½ với NaCl 6 g/L có bổ sung BA 0,2 mg/L và NAA 2 mg/L sau 6 tuần nuôi cấy. Thanh ngang 1 cm.

Các chồi tái sinh trên môi trường có bổ sung BA 0,2 mg/L và NAA 2 mg/L tăng trưởng tốt hơn so với các chồi tái sinh trên môi trường chỉ bổ sung chất điều hòa tăng trưởng thực vật sau 5 tuần nuôi cấy trong điều kiện stress mặn. Chiều cao cây, diện tích lá, số rễ và chiều dài rễ từ chồi tái sinh trong điều kiện stress mặn đạt cao hơn so với đối chứng (Bảng 6, Hình 8).



Hình 8. Sự phát triển của các chồi tái sinh có nguồn gốc khác nhau sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường stress mặn. Thanh ngang 1 cm.

(A) Đối chứng; (B) chồi được tạo trong điều kiện stress mặn

Thảo luận

Khả năng chịu mặn của thực vật tùy thuộc vào loài, độ mặn của môi trường và thời gian tác động [1]. Ở cúc đại đóa, sau 3 tuần nuôi cấy, khả năng phát triển của khúc cắt chồi không bị ảnh hưởng khi xử lý với NaCl ở nồng độ 4 g/L. Khi tăng nồng độ NaCl lên 6 g/L, các khúc cắt chồi có sự giảm tăng trưởng, đặc biệt là không có sự tạo rễ (bảng 1, hình 1). Như vậy, NaCl ở nồng độ 6 g/L được xem là nồng độ gây stress và được bổ sung vào môi trường để khảo sát ảnh hưởng của stress mặn lên sự thay đổi các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa của chồi và dùng trong thí nghiệm tạo nguồn vật liệu có khả năng chịu mặn.

Sự gia tăng nồng độ NaCl trong môi trường nuôi cấy làm gia tăng áp suất thẩm thấu, hạn chế sự hấp thu nước, đồng thời tích lũy ion Na^+ và Cl^- trong tế bào. Sự hấp thu ion Na^+ làm thay đổi hoạt động của các bơm trên màng, đặc biệt là các bơm Ca^{2+} làm ảnh hưởng đến sự truyền tín hiệu thứ cấp của auxin hay bơm K^+ dẫn đến cản sự hoạt hóa của các kinase, cản tổng hợp protein, làm giảm hàm lượng diệp lục tố và thúc đẩy sự lão hóa trong tế bào [1]. Điều này giải thích tại sao hàm lượng diệp lục tố và carotenoid trong tế bào của khúc cắt chồi giảm trong điều kiện xử lý NaCl 6 g/L (Hình 3). Sự mất diệp lục tố xảy ra đầu tiên ở các tế bào nhu mô quanh mạch dẫn sau đó các tế bào này tiếp tục bị hóa nâu và chết (Hình 2). Bên cạnh sự giảm hàm lượng diệp lục tố và

carotenoid, cường độ quang hợp của lá ở mẫu cây tăng trưởng trong điều kiện stress mặn cũng giảm mạnh (Hình 4). Tế bào thực vật chỉ quang hợp được khi chứa diệp lục tố. Do đó, khi hàm lượng diệp lục tố, đặc biệt là diệp lục tố a giảm, cường độ quang hợp cũng giảm. Sự giảm hàm lượng diệp lục tố dẫn đến giảm quang hợp cũng được ghi nhận ở trong trường hợp lúa mì tăng trưởng trong điều kiện stress mặn [11].

Trong điều kiện stress mặn, hàm lượng tinh bột giảm, hàm lượng đường tổng số và cường độ hô hấp gia tăng (Hình 4–5). Điều này cũng được ghi nhận ở cây lúa mì tăng trưởng trong điều kiện stress mặn [2]. Kết quả phân tích hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh cho thấy hoạt tính gibberellin trong mẫu cây tăng trưởng trong điều kiện stress mặn có sự gia tăng. Sự gia tăng hàm lượng đường tổng số và giảm hàm lượng tinh bột có thể là do quá trình thủy giải tinh bột dưới tác động của gibberellin [1]. Chính sự gia tăng hàm lượng đường góp phần điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào, ngoài ra còn cung cấp tiền chất cho con đường hô hấp. Trong điều kiện stress mặn, hoạt động hô hấp của tế bào gia tăng không chỉ tạo năng lượng mà còn cung cấp các tiền chất cho các con đường tổng hợp proline, một hợp chất thường được tổng hợp trong tế bào với hàm lượng cao khi thực vật đáp ứng với điều kiện mặn [7]. Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng proline tăng mạnh khi mẫu cây được đặt nuôi trong môi trường có bổ sung NaCl 6 g/L (Hình 6). Sự tăng hàm lượng proline có vai trò giúp ổn định cấu trúc màng tế bào, duy trì áp suất thẩm thấu đồng thời giúp cung cấp nguồn nitrogen cần thiết cho quá trình phục hồi của cây trong điều kiện stress mặn [7]. Theo Ludwig-Muller (2007), trong điều kiện stress mặn hàm lượng auxin nội sinh gia tăng trong lá kích thích sinh tổng hợp proline [8]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng IAA nội sinh trong mẫu cây tăng trưởng trên môi trường stress mặn có sự gia tăng (Bảng 3). Do đó, trong sự tái sinh chồi từ lá cây cúc đại đóa *in vitro*, việc sử dụng phối hợp BA 0,2 mg/L và NAA 2 mg/L giúp thúc đẩy sự chuyển hóa và tổng hợp auxin, cytokinin nội sinh cần thiết giúp các tế bào lá có khả năng chống chịu với điều kiện stress mặn để bước vào con đường tái sinh thực vật (hình 7).

Các chồi tái sinh hình thành trong điều kiện mặn có khả năng tăng trưởng tốt sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ có bổ sung NaCl 6 g/L (Hình 8).

4 KẾT LUẬN

Khúc cắt chồi *in vitro* của cây cúc đại đóa có khả năng chịu mặn ở nồng độ NaCl 4 g/L. Trong điều kiện stress mặn (NaCl 6 g/L), hàm lượng diệp lục tố, carotenoid và cường độ quang hợp giảm. Theo sau sự giảm diệp lục tố là sự hóa nâu và chết của tế bào nhu mô lá. Stress mặn làm tăng hoạt tính IAA và gibberellin giúp thủy giải tinh bột thành đường dẫn đến tăng cường độ hô hấp và sự tích lũy proline. Xử lý phối hợp IAA 0,25 mg/L; zeatin 0,1 mg/L và GA₃ 0,1 mg/L giúp khúc cắt chồi *in vitro* tăng khả năng chống chịu với điều kiện mặn. Các chồi được tái sinh trên môi trường MS có bổ sung BA 0,2 mg/L; NAA 2 mg/L và NaCl 6 g/L có khả năng phát triển tốt trong điều kiện stress mặn.

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

MS: Murashige and Skoog

IAA: Indol acetic acid

GA₃: Gibberellic acid

BA: 6-Benzyl aminopurine

NAA: 1-Naphtalene acetic acid

ABA: Abscisic acid

TLT: Trọng lượng tươi

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.F. Lodeyro, N. Carrillo N., Salt stress in higher plants: mechanisms of toxicity and defensive responses. In: B. Tripathi, M. Muller M: Stress responses in plants, Springer international publishing, 1–33, 2015.
- [2] A.M. Moud, K. Maghsoudi, Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, *World J. Agric. Sci*, 4, 3, 351–358, 2008.
- [3] B.T. Việt, Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng "bông" và "trái non" Tiêu (*Piper nigrum* L.), *Tạp san Khoa học ĐHTH TP HCM*, 1, 155–165, 1992.
- [4] H. Meidner, Class experiments in plant physiology, George Allen and Unwin, London, 1984.
- [5] H.K. Lichtenthaler, Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes, *Methods in*

- Enzymology*, 148, 350–382, 1987.
- [6] J. Coombs, G. Hind, R.C. Leegood, L.L. Tieszen, A. Vonshak, Technoques in bioproductivity and photosynthesis, In: Measurement of starch and sucrose in leaves, Pergamon press, 1987.
- [7] J. Krasensky, C. Jonak, Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks, *J. Exp. Bot.*, 63, 1593–1608, 2012.
- [8] J. Ludwig-Müller, Indole-3-butyric acid synthesis in ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* under different growth conditions, *J. Plant Physiol.*, 164, 47–59, 2008.
- [9] N.T. Bình, L. Huôn, T.S. Phan, Đánh giá tổn thương có sự tham gia: trường hợp xâm nhập mặn ở đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học*, 24, 229–239, 2012.
- [10] N.T.Q. Huyền, Nuôi cấy mô phân sinh ngon chồi và tìm hiểu khả năng tái sinh ở cúc (*Chrysanthemum* sp.), Luận văn thạc sĩ sinh học, ĐHQG-HCM, 2015.
- [11] P. Mehta, A. Jajoo, S. Mathur, S. Bharti, Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 1, 16–20, 2010.
- [12] R. Paquin, P. Lechasseur, Observations sur une methode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes, *Can. J. Bot.*, 57, 1851–1854, 1979.
- [13] S. Teixeira, Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control, *Asian Journal of Plant Science*, 2, 6, 505–514, 2003.
- [14] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physio.* 1, 15, 3, 473–497, 1962.

Study on the *in vitro* development of *Chrysanthemum indicum* L. shoots in the salinity stress

Tran Thanh Thang, Phan Thi Diem Trinh, Tran Thanh Huong*

University of Science, VNUHCM

*Corresponding author: trthuong@hcmus.edu.vn

Received: 12-09-2017, Accepted: 10-10-2017, Published: 15-10-2018.

Abstract—In this study, NaCl at various concentrations of 4 – 10 g/L was used to investigate the salt tolerance of *in vitro* shoot cuttings of *Chrysanthemum indicum*. Morphological, physiological and biochemical changes during the response of shoot cuttings in the salinity stress were analyzed. NaCl at 6 g/L reduced the development of shoot cuttings. Under salinity stress conditions, there have just a little reduction of the chloroplast in parenchymal cells near the midrib of leaf before

they turn brown and die. Besides, carotenoid, starch content, and photosynthesis intensity were decreased. In contrast, respiration rate, proline and total soluble sugar content, and the activity of IAA and gibberellin were strongly increased. The application of IAA 0.25 mg/L, zeatin 0.1 mg/L and GA₃ 0.1 mg/L improved the shoot development in the salinity stress condition. Shoots in MS medium supplemented with BA 0.2 mg/L, NAA 2 mg/L and NaCl 6 g/L grow better in salinity stress condition.

Index Terms—*Chrysanthemum indicum*, shoots development, salinity stress, plant growth regulators.