Hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy mô trong chọn lọc giống lúa chống chịu mặn thông qua giai đoạn Callus

Nguyễn Văn Toàn, Nguyễn Phạm Ngọc Diệp, Tống Thị Thùy Trang, Phạm Ân Tình, Huỳnh Kỳ*
Trường Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ

Effectiveness of tissue culture technique in selecting salt-tolerant rice varieties within Callus stage

Nguyen Van Toan, Nguyen Pham Ngoc Diep, Tong Thi Thuy Trang, Pham An Tinh, Huynh Ky*
College of Agriculture, Can Tho University
**Corresponding author: Hky@ctu.edu.vn*

https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.3.2025.042-051

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 20/12/2024
Ngày phản biện: 21/01/2025
Ngày quyết định đăng: 24/02/2025

Từ khóa:
Invitro, Na^+/K^+, QTL Saltol, SSRs.

Keywords:
In vitro, Na^+/K^+, QTL Saltol, SSRs.

TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi cấy mô (in-vitro) ngoài việc sử dụng để nhân giống vô tính ở thực vật, kỹ thuật này còn được sử dụng trong nhiều nghiên cứu khác như được dùng để đánh giá khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường. Dựa vào cơ sở khoa học trên, nghiên cứu này đã đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa thông qua nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy mô với các nồng độ khác nhau của muối Natri Clorua (NaCl). Callus của các giống được thử nghiệm trên môi trường MS với các nồng độ của NaCl: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 g/L từ đó đánh giá được khả năng hấp thụ ion Na^+ và K^+ cũng như khả năng phát triển của callus trên môi trường stress mặn. Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ tích luỹ hàm lượng ion Na^+/K^+ của giống Đốc Phụng là thấp nhất và cao nhất là giống IR29 cũng tương tự với hàm lượng proline. Ngoài ra, việc sử dụng chỉ thị phân tử SSR với 18 maker liên kết với QTL chịu mặn cho thấy kết quả ở giống Đốc Phụng, FL478, Trà Lòng có mang kiểu gen chống chịu với giống với Pokkali và khác biệt hoàn toàn với giống mẫn cảm là IR29. Kết quả này cho thấy kỹ thuật nuôi cấy mô và marker SSRs có thể dùng để thanh lọc khả năng chịu mặn ở các giống lúa.

ABSTRACT

The tissue culture (In vitro) approach is utilized not only for asexual reproduction in plants but also in other studies, including the evaluation of resilience to severe environmental circumstances. This study assessed the salt tolerance of rice types using tissue culture in conditions containing varying amounts of sodium chloride (NaCl), grounded in the aforementioned scientific principles. The callus of the examined cultivars was cultivated on MS medium with NaCl concentrations of 0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 g/L, thus assessing the absorption capacity of Na+ and K+ ions and the growth potential of the callus under saline stress conditions. The research indicates that the accumulation ratio of Na+/K+ ions in the Doc Phung variety is the lowest, whereas the IR29 variety exhibits the highest ratio, paralleling the proline concentration. Moreover, the application of SSR molecular markers, comprising 18 markers associated with salt tolerance QTLs, indicates that the Doc Phung, FL478, and Tra Long varieties have genotypes resistant to salinity, akin to Pokkali, and distinctly unlike the sensitive variety IR29. This outcome indicates that tissue culture methodologies and SSR markers are applicable for screening salt tolerance in rice varieties.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa (*Oryza sativa* L.,) là một trong những loại cây quan trọng, cung cấp lương thực cho hơn một nửa thế giới dân số. Tác hại của việc xâm nhập mặn đối với sản xuất lúa có thể được giảm thiểu thông qua quản lý đất và nước. Để khắc phục nhược điểm này thì việc chọn tạo giống lúa chịu mặn là hiệu quả nhất [1, 2]. Lai tạo thông thường là cần thiết để cải thiện các đặc tính của lúa nhưng tiến độ còn chậm do một số rào cản nhất định. Những khó khăn đó có thể được đáp ứng bằng cách ứng dụng công nghệ sinh học là kết quả của việc cải thiện tính chống chịu với tiềm năng năng suất ổn định và chất lượng tốt [3].

Tính toàn năng của tế bào là cơ sở lý luận chính của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật, từ đó có nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng tái sinh một cơ thể thực vật hoàn chỉnh từ một tế bào riêng rẽ. Những mô tế bào mới được hình từ những mẫu có trạng thái sinh lý tốt thì sẽ sinh trưởng mạnh, mức độ nhiễm mầm bệnh ít hơn [4]. Trên môi trường cảm ứng mô sẹo được tìm thấy khả năng sinh trưởng giảm với sự gia tăng nồng độ muối của môi trường cần thiết để cảm ứng mô sẹo đặt điểm hình thái đặc trưng cho mô sẹo ở lúa lai tạo thành phôi và không thành phôi, ở nghiên cứu này đặc điểm mô sẹo thay đổi dựa trên hình thái của mô sẹo khi tăng nồng độ muối (NaCl) trong môi trường nuôi cấy và thời gian nuôi cấy [5]. Việc xử lý auxin để tỷ lệ cytokinin trong môi trường có thể dẫn đến sự phát triển của chồi, phôi rễ từ đó toàn bộ cây sau đó có thể được sản xuất hàng loạt. Ngoài ra, BAP đã được báo cáo là có khả năng đáp ứng cho sự hình thành chồi nhanh ở nhiều loài thực vật [6, 7]. Sản phẩm cây giống đồng nhất và có độ đều cao dù xuất phát từ cây mẹ có kiểu gen dị hợp hay đồng hợp. Ngoài ra, tế bào ban đầu chứa đầu đủ các kiểu gen khác nhau mang khả năng tái sinh của thực vật và toàn bộ lượng thông tin di truyền (DNA) cần thiết và đủ cho toàn bộ sinh vật, khi gặp điều kiện thích hợp ở mỗi tế bào [8].

Tình hình biến đổi khí hậu diễn ra ngày càng khắc nghiệt như hiện nay đã ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất và chất lượng gây ra nguy cơ thiếu lương thực nghiêm trọng. Năng suất và sản lượng phần lớn sẽ bị ảnh hưởng bởi các điều kiện bất lợi từ môi trường, thiên tai, xâm nhiễm mặn và các điều kiện thay đổi của biến đổi khí hậu. Độc tính Na^+ trong tế bào chủ yếu ion gây ra do stress mặn từ môi trường, dẫn đến ức chế đến nhiều quá trình như hấp thụ K^+, các phản ứng enzyme quan trọng, tổng hợp protein và quang hợp. Na^+ bị loại trừ khỏi chồi và K^+ được tích lũy trong chồi giúp ổn định tỷ lệ K^+/Na^+ trong tế bào cao đặc biệt là ở trong lá [9]. Khi gặp nồng độ Na^+ cao và K^+ thấp trong dịch tế bào, bằng cách điều chỉnh sự biểu hiện của các chất vận chuyển K^+ và Na^+ của cổng bơm H^+ tạo ra động lực cho quá trình vận chuyển [2]. Nghiên cứu về khả năng chịu mặn ở giai đoạn đầu của lúa là mẫn cảm với điều kiện mặn dẫn đến giảm năng suất cây trồng hơn 50% khi tiếp xúc trực tiếp với môi trường có EC 6,65 dS/m và độ mặn của đất [10]. Proline tích lũy trong thực vật tiếp xúc với căng thẳng muối đã có tương quan ở nhiều loài với thích ứng với căng thẳng thẩm thấu. Do đó, nghiên cứu được hiện với mục tiêu nghiên cứu khả năng chịu mặn góp phần trong công tác chọn tạo giống lúa trong giai đoạn biến đổi khí hậu hiện nay và cung cấp cơ sở dữ liệu chọn lọc giống lúa chất lượng mang khả năng chịu mặn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đánh giá khả năng chịu mặn trong điều kiện nuôi cấy mô

Các giống lúa bao gồm FL478, Trà Lòng, Đốc Phụng, Nếp Mỡ được thực hiện để đánh giá khả năng kháng mặn. Trong đó Pokkali là giống chống chịu mặn và IR29 là giống đối chứng mẫn cảm.

Bảng 1. Nguồn giống sử dụng trong nghiên cứu

STT	Giống	Nguồn giống
1	Đốc Phụng	Ngân hàng gen Trường Đại học Cần Thơ
2	FL478	
4	Nếp Mỡ	
6	Trà Lòng	
5	Pokkali (Chuẩn kháng)	
3	IR29 (Chuẩn nhiễm)	

2.1.1. Chuẩn bị môi trường

Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là môi trường MS [11] với độ pH = 5,7-5,8 bằng HCl hoặc KOH. Môi trường được khử trùng ở 121°C và 1atm trong 20 phút. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, kháng sinh được khử trùng bằng phương pháp lọc và thêm vào môi trường sau khi đã khử trùng. Tiến hành cấy trên môi trường MS. Sau 2 tuần tăng sinh mô sẹo sẽ được chuyển sang môi trường môi trường MS có bổ sung BAP và NAA để phát triển nên chồi hoàn chỉnh. Ở giai đoạn tái sinh chồi cần bổ sung BAP (6 – Benzyladenime) ở nồng độ 3 mg/l môi trường và NAA (Naptilacetic) ở nồng độ 1 mg/l. Quá trình tăng sinh callus trong 2 tuần và sẽ có những callus phát triển nên những chồi (mầm xanh) có khả năng phát triển thành cây hoàn chỉnh.

2.1.2 Quy trình thử nghiệm mặn

Sau giai đoạn tăng sinh của callus trong 7 ngày được chuyển sang môi trường MS có bổ sung NaCl với các nghiệm thức là bổ sung NaCl với các nồng độ: 0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2 g/L môi trường MS. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 6 giống, 5 nghiệm thức [12].

Bảng 2. Bảng mô tả đặc điểm hình thái mô sẹo [12]

STT	Mô tả của mô sẹo
1	Hoàn toàn chuyển sang màu đen, hoặc nâu sẫm, chết
3	Xuất hiện nước dính, hơn 75% mô sẹo chuyển sang màu nâu
5	Màu từ vàng đến nâu, ngâm nước với bề mặt nhầy nhụa
7	Ngâm nước có màu vàng đến vàng nhạt xen kẽ với các mô sẹo bở màu vàng nhạt
9	Màu vàng nhạt đến trắng, khỏe mạnh, có nốt sần và bở

2.2. Khả năng chịu mặn

2.2.1. Quy trình phân tích hàm lượng Na^+ và K^+

Mẫu callus được sấy ở nhiệt độ 70°C trong 24 giờ. Sau khi sấy sẽ tiến hành trích mẫu. Lưu ý: Chọn callus thực hiện định lượng $Na^{+,}$ K^+ là callus phát triển toàn diện có mà vàng nhạt đến trắng, tơi xốp và kích thước đồng nhất [13].

2.2.2 Quy trình phân tích hàm lượng proline

Mẫu callus được phân tích là mẫu tươi, với 3 lập lại ở mỗi nghiệm thực. Cần chọn những callus phát triển toàn diện [3] (Chen & Zhang, 2016).

2.2.3 Nhận diện kiểu gen chịu mặn bằng sinh học phân tử

Quy trình ly trích DNA được thực hiện theo phương pháp CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) của [14] có cải tiến. DNA sau khi được ly trích và tinh sạch sẽ được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Quy trình PCR dựa trên nền tảng Mullis (1983) [15]. Kiểu gen chịu mặn được đánh giá dựa vào sự liên kết của 12 cặp mồi SSR liên kết với 12 nhiễm sắc thể (NST).

Bảng 3. Các cặp mồi SSR liên kết với các QTL chống chịu mặn nhận diện gen *saltol*

Primer	NST	(bp)	*QTL*	Trình tự
RM10793	1	123	*qSKC1/qRNK1 /qSNK1*	GACTTGCCAACTCCTTAATTGG
				GACTTGCCAACTCCTTCAATTCG
RM10825	1	97	*qSKC1/qSNK/qRNK1*	GGACACAAGTCCATGATCCTATCC
				GTTTCCTTTCCATCCTTGTTGC

2.3. Xử lý số liệu

Thống kê kết quả và đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phần mềm SPSS 22.0. Sử dụng Origin 2021 để thực hiện vẽ các biểu đồ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá khả năng chịu mặn trong điều kiện nuôi cấy mô

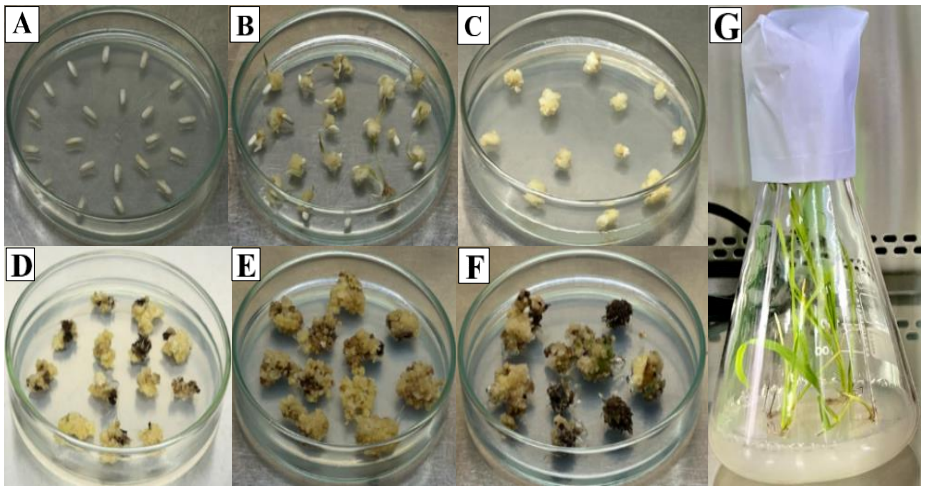
3.1.1. Tỷ lệ tái sinh

Khả năng tạo callus cho thấy các giống đều đạt được mức độ tại sinh phù hợp (> 50%) ở tất cả các giống, riêng đôi với giống FL478 có hiệu suất tái tạo callus là 92,76% tại giai đoạn tái tạo callus để có thể giải thích cho việc sự khác biệt giữa hiệu suất tái sinh giữa các giống là do khả năng tái sinh của các giống trong điều kiện nuôi cấy mô khác nhau và dẫn đến hiệu suất tái tạo callus khác nhau.

Bảng 4. Kết quả hiệu tỉ lệ % hiệu suất tái sinh ở các giống

Giai đoạn	Đốc Phụng	FL478	IR29	Nếp Mỡ	Pokkali	Trà Lòng
Tái tạo callus	81,00	92,67	65,50	67,00	89,33	65,3
Tăng sinh callus	61,00	75,33	54,00	56,50	69,00	53,00
Tạo chồi	61,00	60,67	49,00	44,50	46,67	27,33
Tạo cây	35,00	36,00	28,50	26,50	30,33	16,33

Bên cạnh đó, thử nghiệm đánh giá khả năng chịu mặn ở hai giống Basmati cho khả năng tái sinh trên 90% [16]. Như vậy, trong thí nghiệm ở 6 giống đều có khả năng tạo callus trong môi trường nuôi cấy mô phù hợp và được chọn làm vật liệu nghiên cứu.



Hình 1. Kết quả của quy trình tái sinh giống Đốc Phụng

(A: Giai đoạn khử trùng hạt; B: Giai đoạn tạo callus; C: Sau khi tách callus khỏi hạt gạo và diệp tiêu; D: Giai đoạn tăng sinh callus; E: Giai đoạn tạo chồi; F: Sau 14 ngày tạo chồi; G: Hình thành cây hoàn chỉnh)

3.1.2. Khả năng chống chịu mặn

Khả năng tái sinh ở các giống tuy khác nhau nhưng có sự phù hợp về khả năng tạo callus ở giai đoạn tái sinh và hình thành callus. Nghiên cứu thực hiện trên 6 giống và có khả năng tạo callus ở giống Pokkali là 47,8% [3]. Ở giai đoạn 14 ngày sau khi cho muối nhận thấy khả năng tái sinh giảm dần từ nồng độ muối thấp đến nồng độ muối cao ở các giống được thể hiện ở Bảng 5, giống Đốc Phụng có khả năng sinh trưởng cao hơn các giống khác, với tỉ lệ tái sinh 88% ở nghiệm thức không cho muối và 77,7% ở nghiệm thức 2.0 g/L muối, tiếp theo là giống FL478 có khả năng tái sinh 90,5% ở nghiệm thức không cho muối và 64% ở nghiệm thức 2,0 g/L. Giống có khả năng tái sinh thấp nhất là giống

IR29 với tỉ lệ tái sinh 80,6% ở nghiệm thức không cho muối và 26,7% ở nghiệm thức 2,0 g/L, kết quả phù hợp với nghiên cứu [17] về khả năng phát triển callus ở các nồng độ khác nhau tạo nên sự khác biệt giữa các giống. Sau 21 ngày thử nghiệm mặn thấy được khả năng tăng sinh cũng như sự sống sót ở các giống đều có sự giảm xuống ở tất các giống, đặc biệt giống chuẩn mẫn cảm là IR29 có tỉ lệ thấp nhất là 9,6% ở nồng độ 2 g/L và giống có khả phát triển cao nhất là giống Đốc Phụng với 67,7% cao hơn so với giống chuẩn chống chịu là Pokkali 52,8%.

Bảng 5. Khả năng chịu mặn của 6 giống lúa ở các giai đoạn (%)

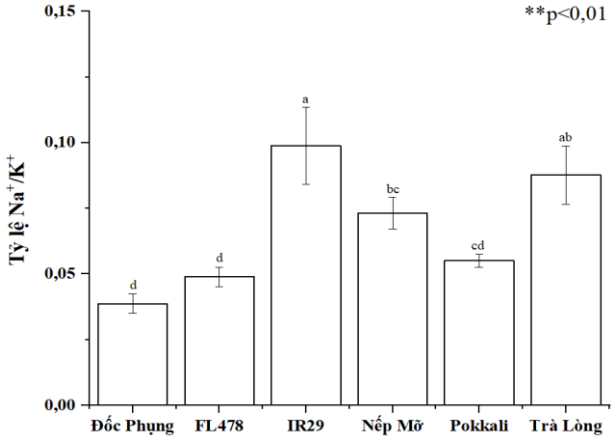
Ngày xử lý mặn	Nồng độ NaCl	Giống					
		Đốc Phụng	FL478	IR29	Nếp Mỡ	Pokkali	Trà Lòng
0	0,0	96,5±0,5	94,4±2,4	92,0±3,0	93,3±9,3	93,3±7,0	92,0±8,5
	0,5	94,4±2,6	90,0±8,0	73,3±1,7	87,5±1,5	86,0±3,0	85,0±1,0
	1,0	92,0±8,0	90,0±7,0	63,3±8,7	76,0±9,8	83,3±9,3	78,0±2,0
	1,5	91,7±0,3	84,0±8,0	60,0±2,0	74,0±5,0	82,0±5,0	78,0±9,0
	2,0	86,1±2,8	80,0±2,0	60,0±5,0	72,0±4,0	76,0±4,0	74,0±7,0
14	0,0	88,0±6,0	90,5±0,5	80,6±8,6	88,0±8,0	87,3±7,4	80,0±1,7
	0,5	88,9±2,9	76,0±3,0	33,3±1,7	74,7±6,8	84,0±4,0	70,0±3,0
	1,0	81,7±1,5	70,0±5,0	30,0±7,0	62,7±4,2	66,7±9,0	67,3±5,5
	1,5	77,8±2,8	70,0±3,0	30,0±9,0	62,0±6,0	70,0±4,0	58,3±3,2
	2,0	77,8±3,2	64,0±3,0	26,7±1,7	60,0±3,0	64,0±4,0	57,7±2,1
21	0,0	82,9±4,4	86,4±1,4	78,2±8,3	86,0±7,8	85,5±2,9	78,7±2,9
	0,5	79,1±2,6	66,7±2,6	28,7±1,4	71,2±9,6	73,9±3,5	60,8±2,6
	1,0	72,5±2,3	59,4±4,3	18,6±4,3	52,5±1,6	64,6±8,5	60,2±7,7
	1,5	66,3±2,4	60,1±2,6	17,4±5,2	48,4±4,7	58,1±3,32	52,7±5,1
	2,0	67,7±2,8	54,1±2,5	9,6±0,60	35,4±1,8	52,8±3,3	51,0±2,5

Vậy khi thời gian trong môi trường có muối càng lâu thì khả năng phát triển của từng giống sẽ khác nhau và sẽ giảm khả năng phát triển cũng như chết đi ở từng giống có sự khác biệt khả năng chống chịu mặn ở từng giống. Như vậy, Đốc Phụng là giống có khả năng chống chịu với điều kiện mặn cao nhất ở 14 ngày và 21 ngày ở nồng độ 2 g/L NaCl là 77,8% và 67,7% ở hầu hết các nồng độ trong điều kiện nuôi cấy mô và cao hơn so với giống đối chứng chuẩn chống chịu Pokkali lần lượt ở ngày 14 và 21 ở nồng độ 2g/L NaCl là 64% và 52,8%. Vậy khi tăng nồng độ thì khả năng tăng sinh callus giảm. Giống Đốc Phụng có khả năng phát triển và biểu hiện tốt nhất, giống Nếp mỡ và giống IR29 lại có khả năng phát triển kém nhất và đã có những hiện tượng hóa nâu vàng.

3.1.3. Khả năng hấp thụ ion Na^+ và K^+ở callus của các giống thử nghiệm trong điều kiện mặn

3.1.3.1 Hàm lượng Na^+/K^+ trước thử nghiệm mặn

Duy trì hàm lượng K^+ ở tế bào thấp được xem là một trong các yếu tố chính đối với khả năng chịu mặn ở lúa. Trong điều kiện nuôi cấy bình thường hàm lượng Na^+ trong tế bào của callus thông thường sẽ thấp hơn so với hàm lượng K^+ trong tế bào [3]. Trong điều kiện mặn, thực vật có cơ chế hấp thu lượng Na^+ duy trì trong tế bào cao hơn so với K^+ kéo theo đó là tỷ lệ Na^+/K^+ sẽ tăng theo khi gia tăng nồng độ Na^+ trong môi trường nuôi cấy. Có sự giảm nồng độ K^+ và tăng nồng độ Na^+ trong điều kiện mặn, như vậy tỉ lệ Na^+/K^+ là cơ chế quan trọng kiểm soát khả năng chịu mặn ở lúa.



Hình 2. Tỷ lệ Na^+/K^+ trong callus tại thời điểm trước khi xử lý mặn của 6 giống lúa

(a, b, c, d: các trung bình thì khác biệt không ý nghĩa qua kiểm định Tukey HSD (p > 0,01))

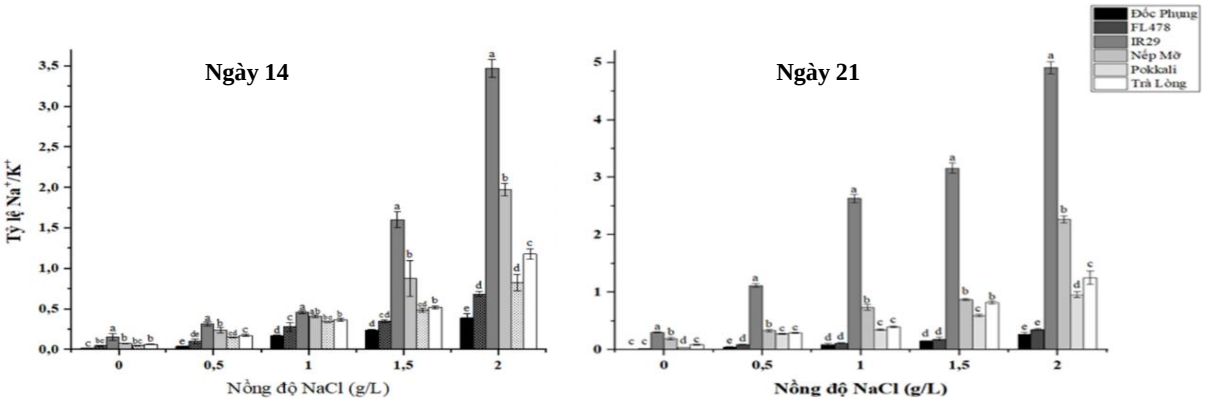
Phân tích thống kê thể hiện khác biệt hàm lượng Na^+/K^+ cho thấy tỷ lệ Na^+/K^+ ở giống IR29 là cao nhất biểu hiện của sự mẫn cảm với điều kiện mặn từ môi trường và giống có tỷ lệ Na^+/K^+ thấp nhất là giống Đốc Phụng. Khi tăng nồng độ muối thì tất cả giống đều hấp thụ lượng Na+ tăng lên ở tất cả các giống và kết quả này phù hợp với nghiên cứu của [11] về khả năng hấp thu Na^+.

3.1.3.2 Tỷ lệ Na^+/K^+ thử nhiệm sau 14 ngày

Sau 14 ngày trong môi trường có bổ sung nồng độ muối khác nhau, tỷ lệ Na^+/K^+ có sự khác biệt ở các giống. Giống IR29 có tỷ lệ Na^+/K^+ cao nhất là 0,156 và giống có tỷ lệ Na^+/K^+ thấp nhất là Đốc Phụng là 0,019 và đối với nghiệm thức 2 g/L giống IR29 có tỷ lệ Na^+/K^+ là 3,474 cao nhất so với những giống còn lại, giống Pokkali lại có tỷ lệ Na^+/K^+ là 0,829 trong khi đó giống Đốc Phụng lại có tỷ lệ Na^+/K^+ là 0,392 thấp hơn so với Pokkali. Tỷ lệ Na^+/K^+ phụ thuộc hoàn toàn vào khả năng tích lũy Na^+ và khả năng duy trì K^+ trong tế bào ở kết quả thực hiện thấy được giống Đốc Phụng có tỷ lệ Na^+/K^+ thấp nhất, cho thấy được giống Đốc Phụng có khả năng chịu mặn ở nồng độ cao tốt hơn so với những giống còn lại được thể hiện ở Hình 3.

Sau 21 ngày xử lý mặn thì tỉ lệ Na^+/K^+ có biểu hiện thay đổi tăng lên ở những giống có khả năng hấp thu Na^+ tăng, đồng thời giảm khả năng tích lũy K^+ trong callus và điều này đồng nghĩa với việc hàm lượng Na^+ tăng lên và giảm lượng K^+ xuống ở mức thấp hơn so với 14 ngày xử lý mặn. Điều này nói lên được sau tăng thời gia stress mặn của môi trường tăng lên thì đồng nghĩa tỉ lệ Na^+/K^+ cũng sẽ tăng lên, cho thấy được rằng thời gian trong quá trình xâm nhiễm mặn sẽ ảnh hưởng trực tiếp lên quá trình tích lũy Na^+ và khả năng duy trình hàm lượng K^+. Ngoài ra ở thời điểm 21 ngày xử lý mặn thì tỷ lệ vẫn sẽ tăng lên khi tăng nồng độ Na^+ trong môi trường lên thì biểu hiện của quá trình tích lũy Na^+ trong callus tăng lên và để đáp được lượng Na+ hấp thu vào thì khả năng K^+ cần được duy trì ở mức ổn định để có thể phát triển. Tổng quát có thể thấy được tỉ lệ Na^+/K^+ của giống Đốc Phụng thấp nhất so với những giống còn lại, giống Pokkali là giống đối chứng chống chịu thì cho thấy được tỉ lệ này ở mức trung bình và đặc biệt giống IR29 có tỉ lệ Na^+/K^+ cao nhất [17] .

Như vậy, tỷ lệ Na^+/K^+ thấp thì được biểu hiện ở các giống có khả năng chống chịu với điều kiện mặn và những giống mẫn cảm với điều kiện mặn thì tỷ lệ này sẽ tăng. Khi tăng nồng độ muôi trong môi trường lên thì tỷ lệ Na^+/K^+ cũng sẽ tăng và biểu hiện rõ rệt ở giống có khả năng mẫn cảm với điều kiện mặn hơn so những giống có khả năng chống chịu với điều kiện mặn từ môi trường. Theo Revathi & Pillai (2015), kết quả cho thấy khi gia tăng nồng độ muốn trong môi trường và thời gian trong mẫu thì việc tỷ lệ Na^+/K^+ sẽ tăng lên và đã phù hợp với nghiên cứu được thực hiện [18].

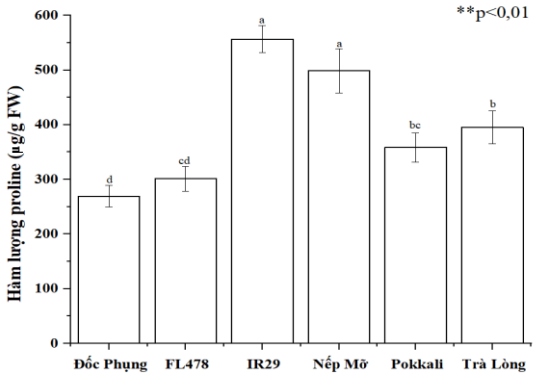


Hình 3. Tỷ lệ Na+/K+ trong callus tại thời điểm sau khi xử lý mặn của 6 giống lúa
(*a, b, c, d: các trung bình thì khác biệt không ý nghĩa qua kiểm định Tukey HSD (p > 0,01))*

3.1.4. Khả năng tích luỹ proline trong điều kiện mặn

3.1.4.1 Hàm lượng proline trước khi xử lý mặn

Độ mặn cao ảnh hưởng đến các hoạt động trao đổi chất cơ bản trong lúa bao gồm ảnh hưởng thành tế bào dẫn đến tổn thương tế bào chất và mạng lưới nội chất. Ngoài ra, việc tích tụ citrate làm tăng lượng proline, giảm tối đa hiệu suất năng lượng tử của hệ thống quang học II (Fv/Fm) [6]. Trong môi trường stress do muối đã có tương quan ở nhiều loài với thích ứng với stress thẩm thấu. Tuy nhiên, vai trò của nó trong truyền đạt khả năng chống lại điều kiện stress do muối được coi là một triệu chứng của tổn thương do stress chứ không phải là một chỉ số về khả năng chịu đựng stress mặn. Do đó, sự tích tụ proline trong stress mặn phải được khảo sát chính xác hơn.

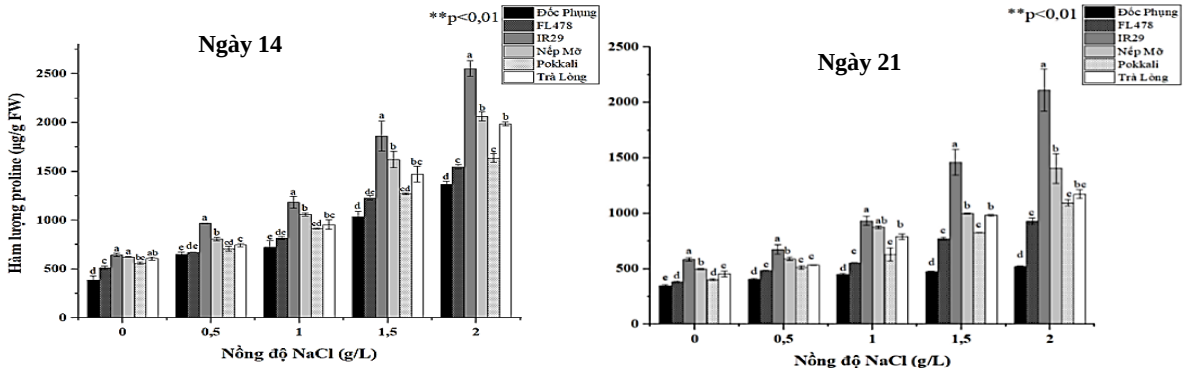


Hình 4. Hàm lượng proline trong callus tại thời điểm trước khi xử lý mặn của 6 giống lúa
(a, b, c, d: các trung bình thì khác biệt không ý nghĩa qua kiểm định Tukey HSD (p>0,01))

Tại thời điểm chưa xử lý mặn trong môi trường đã cho thấy sự hiện diện của proline ở các giống có sự khác biệt nhau, đối với giống chuẩn nhiễm là giống IR29 có khả năng tích lũy một lượng proline khá cao tại thời điểm trước khi xử lý mặn. Giống có khả năng tích lũy proline thấp nhất là giống Đốc Phụng. Đây có thể được xem làm một trong những biểu hiện của khả năng mẫn cảm với điều kiện stress mặn của môi trường.

3.1.4.2 Hàm lượng proline trước sau xử lý mặn

Sau thời điểm 14 ngày xử lý mặn, đối với giống Đốc Phụng hàm lượng proline trong callus có hàm lượng proline được tổng hợp ra để ứng phó với stress mặn là một trong những yếu tố chính giúp callus có khả năng phát triển và chống chịu với stress mặn. Đối với giống IR29 là giống có hàm lượng sản sinh ra proline cao nhất và khi gia tăng nồng độ Na^+ thì hàm lượng sản sinh proline trong callus cũng sẽ tăng.



Hình 5. Hàm lượng proline trong callus tại thời điểm sau khi xử lý mặn của 6 giống lúa

(a, b, c, d: các trung bình thì khác biệt không ý nghĩa qua kiểm định Tukey HSD (p>0,01))

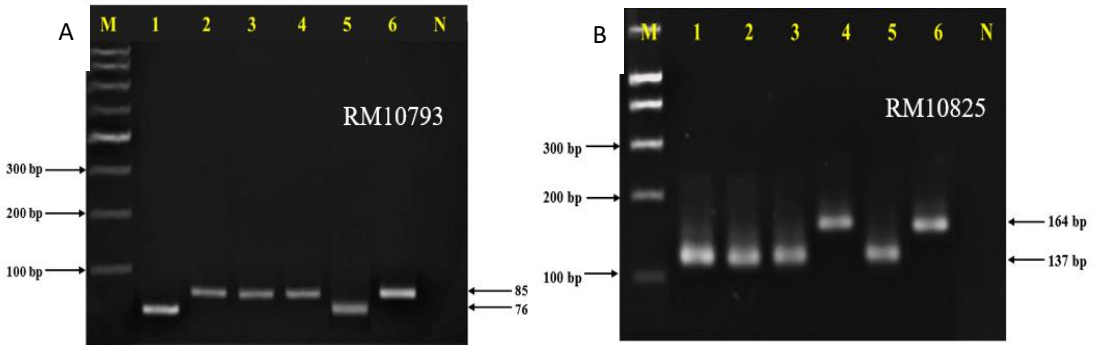
Sự cộng hưởng của nồng độ muối và thời gian sẽ đánh giá chính sát được sự sản sinh proline để đánh giá khả năng chiu mặn ở các giống lúa trong điều kiện stress mặn trên môi trường nuôi cấy mô. Sau 21 ngày hàm lượng proline ở giống IR29 vẫn duy trì ở mức cao nhất khác biệt hoàn toàn so với những giống khác.

Ở giai đoạn 14 ngày sau khi cho muối nhận thấy hàm lượng proline sản sinh tăng dần từ nồng độ muối thấp đến nồng độ muối cao ở các giống. Giống Đốc Phụng có proline sản sinh thấp hơn hơn các giống khác, với proline sản sinh là 384,43 (μg/g FW) ở nghiệm thức không cho muối và 520,14 (μg/g FW) ở nghiệm thức 2,0 g/L muối, tiếp theo giống FL478 là với hàm lượng proline sản sinh là 384,28 (μg/g FW) ở nghiệm thức không cho muối và 931,36 (μg/g FW) ở nghiệm thức 2,0 g/L muối. Pokkali giống có khả năng proline sản sinh ở nghiệm thức không cho muối là 403,22 (μg/g FW) và 1095,51 (μg/g FW) với nghiệm thức 2,0 g/L NaCl. Giống có hàm lượng proline sản sinh cao nhất là giống IR29 với với hàm lượng proline sản sinh là 584,23 (μg/g FW) ở nghiệm thức không cho muối và 2110,61 (μg/g FW) ở nghiệm thức 2,0 g/L NaCl.

Sau 21 ngày sau khi cho muối nhận thấy hàm lượng proline sản sinh tăng từ nồng độ muối thấp đến nồng độ muối cao ở các giống và thời gian ở trong môi trường có muối giữa thời gian 14 ngày xử lý mặn và 21 ngày xử lý mặn không có sự khác biết quá lớn. Giống Đốc Phụng có proline sản sinh thấp hơn hơn các giống khác, với proline sản sinh là 386,24 (μg/g FW) ở nghiệm thức không cho muối và 1367,79 (μg/g FW) ở nghiệm thức 2,0 g/L muối, tiếp theo giống FL478 là với hàm lượng proline sản sinh là 511,04 (μg/g FW) ở nghiệm thức không cho muối và 1548,04 (μg/g FW) ở nghiệm thức 2,0 g/L muối. Pokkali giống có khả năng proline sản sinh ở nghiệm thức không cho muối là 560,59 (μg/g FW) và 1638,03 μg/g FW) với nghiệm thức 2,0 g/L NaCl. Giống có hàm lượng proline sản sinh cao nhất là giống IR29 với với hàm lượng proline sản sinh là 643,02 (μg/g FW) ở nghiệm thức không cho muối và 2553,17 (μg/g FW) ở nghiệm thức 2,0 g/L NaCl. Kết quả nghiên cứu proline ở hầu hết các giống đều phù hợp với kết quả nghiên cứu [18].

3.2. Nhận diện kiểu gen chịu mặn bằng sinh học phân tử

Trong nghiên cứu đã sử dụng 140 dòng F8 của tổ hợp lai giữa IR29/Pokkali để khảo sát mối liên kết giữa 100 dấu phân tử SSR với các QTL thì trong đó đã chọn 2 cặp mồi RM10793 và RM10825 liên kết với QTL qSKC1, qSNK, qRNK1 [19]. Kết quả cho thấy sự phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đó khi chọn Pokkali làm đối chứng và đã xác định được các giống Đốc Phụng, Trà Lòng, FL478 có thể mang các QTL liên kết K^+/Na^+ trong callus (qSKC1, qSNK, qRNK1).



Hình 6. Sản phẩm PCR của cặp vồi RM10793 và RM10825 trên 6 giống lúa nghiên cứu bằng gel polyacrylamide 8% (w/v)

(A) Kết quả PCR của 6 giống lúa được khuếch đại cặp mồi RM10793; (B) Kết quả PCR của 6 giống lúa được khuếch đại cặp mồi RM10825; M: thang chuẩn 1kb plus (NEB, UK); 1.IR29, 2. Đốc Phụng, 3.Trà Lòng, 4.Pokkali, 5.Nếp Mỡ, 6. FL478

Cặp mồi RM10793 cho thấy được sự khác biệt giữa hai băng hình là 85 bp đối với các giống có khả năng chống chịu giống với Pokkali và 76 bp đối với giống Nếp Mỡ tương đồng với giống IR29. Và đối với cặp mồi RM10825 lại xuất hiện hai băng băng hình khác nhau là 164 bp và 137 bp, sự xuất hiện này đối với hai giống là giống FL478 và Pokkali. Để giải thích cho việc xuất hiện băng hình giống nhau của FL478 là con lai của Pokkali và mang kiểu gen có liên kết với QTL giống với Pokkali. Nồng độ K^+ trong chồi (SKC) là một thông số sinh lý đánh giá khả năng chịu mặn ở giai đoạn cây con dựa trên tổ hợp lai "Pokkali" và "IR29". Dựa vào cơ chế vận chuyển hai ion Na^+ và K^+ trong thế bào giúp cân bằng tỷ lệ K^+/Na^+ ổn định [1]. Kết quả đánh giá ở primer RM10793, giống IR29 và Nếp mở không mang qSKC. Nhưng khi sử dụng primer RM10825, giống Pokkali và giống FL478 lại mang qRNK mà các giống còn lại không có.

4. KẾT LUẬN

Tóm lại, kỹ thuật nuôi cấy mô đã thành công trong việc sàng lọc khả năng tái sinh ở callus của các giống khác nhau giống Đốc Phụng có khả năng tái sinh cao nhất và thấp nhất là giống Nếp Mỡ đánh giá sau 21 ngày xử lý mặn. Kết quả cho thấy giống Đốc Phụng có tỷ lệ Na^+/K^+ thấp nhất là 0,26 và giống IR29 là giống mẫn cảm duy trì được tỷ lệ Na^+/K^+ ở mức cao nhất là 4,91. Tuy nhiên, sự sản sinh hàm lượng proline đã không liên quan đến khả năng chịu mặn trong việc thử nghiệm mặn ở giai đoạn callus. Kết quả đánh giá kiểu gen bằng chỉ thị phân tử SSR (RM10793) có thể sử dụng cho việc nhận diện kiểu gen chịu mặn ở giống Đốc Phụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. M. Thomson, D. Ocampo, M. Egdane, J. Rahman, M. Sajise, A. Adorada, & M. Ismail. (2010). Characterizing the Saltol quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. Rice. 3: 148-160.

[2]. C. Hu, L. Gu, Z. Luan, J. Song, & K. Zhu (2012). Effects of montmorillonite–zinc oxide hybrid on performance, diarrhea, intestinal permeability and morphology of weanling pigs. Animal Feed Science and Technology. 177(1-2): 108-115.

[3]. J. Shavindra & M. Amitabh (2005). Advanced in rice biotechnology in the new millennium, Plant Biotechnology Journal. 3: 275-307.

[4]. E. Blumwald, G. S. Aharon, & M. P. Apse (2000). Sodium transport in plant cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1465(1-2): 140-151.

[5]. M. Nabors & T. Dykes (1985). Tissue culture of cereal cultivars with increased salt, drought and acid tolerance. Biotechnology in international agricultural research. 121-138.

[6]. C. Sahi, A. Singh, K. Kumar, E. Blumwald & A. Grover (2006). Salt stress response in rice: genetics, molecular biology, and comparative genomics. Functional & integrative genomics, vol. 6, pp. 263-284.

[7]. A. Priya, S. Pandian & M. Ramesh (2011). Effect of NaCl on in vitro plant regeneration from embryogenic callus cultures of'cv IR 64'indica rice (Oryza sativa L.). African Journal of Biotechnology. 10(36): 6947-6953.

[8]. D. Galson & S. Mueller (1986). An introduction to the European Geotraverse Project: first results and present plans. Tectonophysics. 126(1): 1-30.

[9]. F. Hauser & T. Horie (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K+/Na+ ratio in leaves during salinity stress. Plant, cell & environment. 33(4): 552-565.

[10]. L. Zeng & M. C. Shannon (2000). Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. Crop science. 40(4): 996-1003.

[11]. T. Murashige (1974). Plant propagation through tissue cultures. Annual review of plant physiology. 25(1): 135-166.

[12]. R. Pushpam & S. Rangasamy (2000). Variations in chlorophyll contents of rice in relation to salinity. Crop Research. 20: 197-200

[13]. K. Iseki, Y. Takahashi, C. Muto, K. Naito, & N. Tomooka (2018). Diversity of drought tolerance in the genus Vigna. Frontiers in Plant Science. 9: 729.

[14]. J. J. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.

[15]. K. Mullis, F. Ferre & R. Gibb (1998). Rapid Cycle DNA Amplification In, The polymerase chain reaction. Springer.

[16]. S. Muhammad, T. Müller & R. G. Joergensen (2007). Compost and P amendments for stimulating microorganisms and maize growth in a saline soil from Pakistan in comparison with a nonsaline soil from Germany. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 170(6): 745-752.

[17]. P. Shanthi, S. Jebaraj & S. Geetha (2010). In vitro screening for salt tolerance in Rice (Oryza sativa). Electronic Journal of plant breeding. 1(4): 1208-1212.

[18]. S. Revathi & M. A. Pillai (2015). Novel approach in screening rice genotype for tolerance to salt stress under hydroponic culturE. Agricultural Science Digest-A Research Journal. 35(4): 308-310.

[19]. R. Tyagi, A. Yusuf, P. Dua & A. Agrawal (2004). In vitro plant regeneration and genotype conservation of eight wild species of Curcuma. Biologia Plantarum. 48: 129-132.