

SỰ RA HOA *IN VITRO* CỦA CÂY DÈN XANH (*Amaranthus viridis* L.) TRONG ĐIỀU KIỆN KHÔ HẠN DO PEG

Huỳnh Thị Diễm Phúc, Trịnh Cẩm Tú, Phan Ngô Hoang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 01 tháng 06 năm 2011)

TÓM TẮT: Sự thiếu nước là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển ở thực vật. Sự khô hạn gây ra bởi PEG 6000 cản sự tăng trưởng của rễ chính và kích thích sự phát triển rễ phụ. IAA 2mg/l kích thích sự ra hoa sớm thông qua sự cân kéo dài rễ chính và kích thích sự phát triển các rễ phụ. Hoạt tính IAA tăng cao trong khi hoạt tính ABA trong rễ giảm mạnh khi cây chuyển từ giai đoạn dinh dưỡng sang giai đoạn ra hoa. Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong mối tương quan giữa phát triển rễ và ra hoa được thảo luận.

Từ khóa: *Amaranthus viridis*, Polyethylene Glycol, phát triển rễ, sự khô hạn, sự ra hoa

MỞ ĐẦU

Thực vật có nhiều kiểu đáp ứng khác nhau trước những điều kiện khô hạn để duy trì các hoạt động sinh lý cần thiết như: tránh hạn (rễ ăn sâu, đóng khí khổng), chịu hạn (sản xuất những tác nhân làm dịu stress), thoát hạn (hoàn tất chu trình sống trong thời gian ngắn, trước khi chết vì hạn) (Bùi Trang Việt 2002, Xiong và cộng sự 2006). Dền xanh là loài thực vật có khả năng chịu hạn tốt từng được sử dụng trong các nghiên cứu đáp ứng với sự khô hạn (Liu và Stützel 2004). Trong bài báo này, sự phát triển của bộ rễ và sự ra hoa của cây Dền xanh đáp ứng với sự khô hạn nhân tạo do PEG 6000 trong điều kiện *in vitro* được theo dõi. Phân tích sự biến đổi mô phân sinh, mối tương quan giữa phát triển rễ và ra hoa cũng như vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật đã được nghiên cứu.

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây Dền xanh (*Amaranthus viridis* L.) hai ngày tuổi (rễ chính dài khoảng $4,2 \pm 0,5$ mm với hai từ điệp) được nảy mầm trong điều kiện *in vitro* từ hạt trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ (Murashige và Skoog 1962, khoáng đa lượng giảm 50%).

Phương pháp

Khảo sát sự phát triển hoa của cây Dền xanh (*Amaranthus viridis* L.)

Các cây Dền xanh *in vitro* hai ngày tuổi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ được chuyển vào các ống nghiệm có chứa 12ml môi trường MS $\frac{1}{2}$ có hoặc không có bổ sung IAA với nồng độ thay đổi từ 0,5 đến 2 mg/l. Sự phát triển hoa (tỉ lệ ra hoa, thời điểm xuất hiện hoa) được theo dõi theo thời gian.

Khảo sát sự phát triển rễ và ra hoa của cây Dền xanh trong điều kiện khô hạn được tạo bởi PEG

Các cây Dền xanh *in vitro* hai ngày tuổi được đặt cấy trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có hay không có bổ sung PEG 6000 (Polyethylene Glycol) với nồng độ thay đổi từ 0,5 đến 5%. Sự phát triển của bộ rễ (số lượng rễ, chiều dài rễ chính, trọng lượng tươi của bộ rễ) và sự phát triển hoa (tỉ lệ ra hoa, thời điểm xuất hiện hoa) được theo dõi theo thời gian. Tất cả các mẫu cây được đặt trong điều kiện ánh sáng 3.000 ± 500 lux (12/12), nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và ẩm độ $80 \pm 5\%$.

Biến đổi hình thái và giải phẫu học

Hình thái phát triển của bộ rễ cây Dền xanh *in vitro* tăng trưởng trong điều kiện khô hạn được theo dõi và chụp hình qua kính hiển vi soi nổi. Sự biến đổi của mô phân sinh ngọn chồi trong quá trình ra hoa của cây Dền xanh *in vitro* được quan sát bằng cách thực hiện các lát cắt dọc qua mô phân sinh ngọn chồi, nhuộm hai màu (đỏ carmin-xanh iod) và quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật.

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của bộ rễ cây Dền xanh *in vitro* ở giai đoạn trước và sau giai đoạn ra hoa được xác định bằng sinh trắc nghiệm sau sự ly trích và cô lập trên sắc kí bản mỏng Silicagel F₂₅₄, với dung môi di chuyển là chloroform: metanol: acetic acid (80: 15: 5), nhiệt độ 32°C .

Xử lý số liệu

Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 11.5.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Sự biến đổi của mô phân sinh và sự ra hoa của cây Dền xanh trong điều kiện *in vitro*

Trong sự phát triển hoa của cây Dền xanh, mô phân sinh ngọn dinh dưỡng với dạng đỉnh nhọn đặc trưng sẽ tăng mạnh kích thước bề rộng để trở thành mô phân sinh hoa tự với dạng đỉnh bằng phẳng (Hình 1.1; 1.2), thời điểm này kích thước bề rộng của mô phân sinh hoa tự có thể đạt đến $450 \pm 40\mu\text{m}$. Trong khi đó, ở trạng thái dinh dưỡng, kích thước bề rộng của mô phân sinh ngọn chỉ khoảng $200 \pm 30\mu\text{m}$. Cùng với mô phân sinh ngọn, các mô phân sinh dinh dưỡng ở vị trí nách lá ngay bên dưới cũng xảy ra sự biến đổi tương tự để trở thành các mô phân sinh hoa tự ở nách lá.

Khi mới hình thành, mô phân sinh hoa tự ở đỉnh ngọn hoạt động tạo ra các mô phân sinh hoa tự thứ cấp ở vùng ngoại vi trong khi các mô phân sinh hoa tự ở vị trí nách lá hoạt động tạo các mô phân sinh hoa (Hình 1.3, 1.4, 1.5). Mô phân sinh hoa tự ở đỉnh ngọn sau khi tạo một số mô phân sinh hoa tự thứ cấp sẽ tiếp tục tạo các mô phân sinh hoa bên dưới và sau cùng sẽ trở thành mô phân sinh hoa ở đỉnh ngọn. Dường như hoạt động của mô phân sinh hoa tự ở vị trí nách lá gần giống hoạt động của mô phân sinh hoa tự thứ cấp dẫn xuất từ mô phân sinh hoa tự ở đỉnh ngọn. Các mô phân sinh hoa khi được tạo ra sẽ tiếp tục phân hóa tạo các cơ quan hoa để hình thành một nụ hoa hoàn chỉnh (Hình 1.6; 1.7).

Như vậy, khác với *Dendrobium*, mô phân sinh hoa tự luôn duy trì một vùng tế bào gốc đảm bảo cho sự kéo dài và tạo nụ hoa cho phát

hoa (Trịnh Cẩm Tú và Bùi Trang Việt 2006) thì ở Dền xanh, mô phân sinh hoa tự trở thành mô phân sinh hoa trên cùng tương tự như cách phát triển của hoa Tím Phi (Nguyễn Thị Luyến và cộng sự 2008).

IAA kích thích sự ra hoa sớm cũng như gia tăng tỷ lệ ra hoa cây Dền xanh. Môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung IAA với các nồng độ từ 0,5 đến 2mg/l đều tạo được hoa sớm hơn so với các cây trên môi trường đối chứng MS $\frac{1}{2}$. Hơn nữa, sự gia tăng nồng độ IAA từ 0,5 đến 2mg/l dẫn đến sự gia tăng tỉ lệ ra hoa, đặc biệt là tỉ lệ này đạt tỉ lệ 100% ở ngày thứ 67 trên môi trường có bổ sung IAA 2mg/l (Bảng 1). Sự hiện diện của nụ hoa đầu tiên được ghi nhận dưới kính hiển vi soi nổi ở cây Dền xanh 55 ngày tuổi tăng trưởng trên các môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung IAA trong khi ở cây Dền xanh tăng trưởng trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ là 94 ngày tuổi. Ở thời điểm này, các nụ hoa đã có lá đài màu xanh bao ngoài cánh hoa, nhị và nhụy (Hình 8.1).

Ảnh hưởng của sự khô hạn lên sự phát triển rễ và ra hoa cây Dền xanh *in vitro*

Phân tử PEG trơ, có cấu trúc chuỗi không thấm nước, không bị hấp thu bởi thực vật, thường được sử dụng như một tác nhân gây ra sự khô hạn trong các nghiên cứu *in vitro* ở một số cây họ đậu, Nho, Cà chua, Dền (Berg và cộng sự 2006). Ở cây Dền xanh, sự hiện diện của PEG trong môi trường nuôi cấy cản mạnh sự kéo dài của rễ chính đồng thời kích thích sự tạo mới rễ phụ và gia tăng trọng lượng tươi bộ rễ. Các biểu hiện thay đổi này của bộ rễ được ghi nhận rõ nhất ở cây Dền xanh tăng trưởng trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có PEG 1% trong giai

đoạn từ 24 đến 38 ngày tuổi (bảng 3 và 4). Đặc biệt, hoa chỉ xuất hiện trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung PEG 1% với tỷ lệ 33% ở 55 ngày tuổi (Bảng 2). Như vậy, khác với *Arabidopsis thaliana*, sự cản phát triển của rễ chính kích thích sự ra hoa sớm (Trần Nguyễn Ngọc Sa, 2009), ở Dền xanh sự tăng số rễ phụ và trọng lượng tươi cả hệ rễ đã rút ngắn thời gian ra hoa trong điều kiện khô hạn được tạo bởi PEG.

Sự thay đổi hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Hoạt tính IAA trong rễ tăng mạnh khi các cây chuyển từ giai đoạn dinh dưỡng (38 ngày tuổi) sang ra hoa (55 ngày tuổi) ở môi trường có bổ sung IAA 2mg/l hoặc thấp hơn khi được bổ sung PEG 1% và không đổi ở môi trường không có sự tạo hoa (Bảng 5). Sự gia tăng hoạt tính của IAA nội sinh là cần thiết cho quá trình ra hoa ở cây Dền xanh *in vitro*. Mặt khác, IAA được biết đến như một tác nhân gây kích thích tạo sơ khởi rễ nhưng cản tăng trưởng các sơ khởi này (Bùi Trang Việt, 2000). Có lẽ trong trường hợp này, IAA kích thích sự ra hoa sớm thông qua tác động cản sự tăng trưởng dài của rễ chính và kích thích sự tạo nhiều rễ phụ. Ngược với IAA, hoạt tính ABA giảm trước và sau sự ra hoa tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành cơ quan hoa. Sự khô hạn do PEG 1% làm gia tăng hoạt tính ABA trong rễ cây Dền xanh ở thời điểm trước và sau khi ra hoa đã kéo theo sự giảm tỷ lệ ra hoa của các cây tăng trưởng trên môi trường này. Theo Sharp và cộng sự (2009), chính sự gia tăng ABA từ rễ dưới điều kiện khô hạn cản sự cảm ứng của mô phân sinh trong quá trình ra hoa ở cây

Rhododendron. Như vậy, ở cây Dền xanh ABA đóng vai trò cản sự phát triển hoa và chính điều này đã làm giảm tỷ lệ ra hoa của các cây Dền xanh tăng trưởng trong điều kiện khô hạn so với các cây Dền xanh tăng trưởng trên môi trường có bổ sung IAA 2mg/l.

Tóm lại, điều kiện hạn đã thúc đẩy Dền xanh rút ngắn chu trình phát triển với những biểu hiện ở rễ như rễ phụ mới hình thành nhiều nhưng bị cản kéo dài, trọng lượng gia tăng mạnh sau khi rễ chính bị cản, từ đó thúc đẩy hình thành hoa sớm. Hoạt tính IAA cao dường như thích hợp cho giai đoạn ra hoa và ABA được sản xuất nhiều trong điều kiện khô hạn góp phần cản sự phát triển hoa ở cây Dền xanh.

KẾT LUẬN

Trong sự phát triển hoa cây Dền xanh, mô phân sinh hoa tự ở đỉnh ngọn hoạt động tạo mô phân sinh hoa thứ cấp và mô phân sinh hoa. Mô phân sinh hoa tự ở vị trí nách lá chỉ có thể tạo mô phân sinh hoa.

Sự khô hạn gây ra bởi PEG 6000 ở nồng độ 1% hoặc sự bổ sung IAA vào môi trường nuôi cấy kích thích sự ra hoa sớm cũng như gia tăng tỷ lệ ra hoa ở cây Dền xanh tăng trưởng trong điều kiện *in vitro*.

Trên môi trường có sự ra hoa sớm và mạnh (MS½ với IAA 2mg/l), hoạt tính IAA trong rễ tăng và hoạt tính ABA giảm khi cây chuyển từ giai đoạn dinh dưỡng sang ra hoa.

IN VITRO FLOWERING OF AMARANTHUS VIRIDIS L. IN PEG-INDUCED DROUGHT CONDITION

Huynh Thi Diem Phuc, Trinh Cam Tu, Phan Ngo Hoang

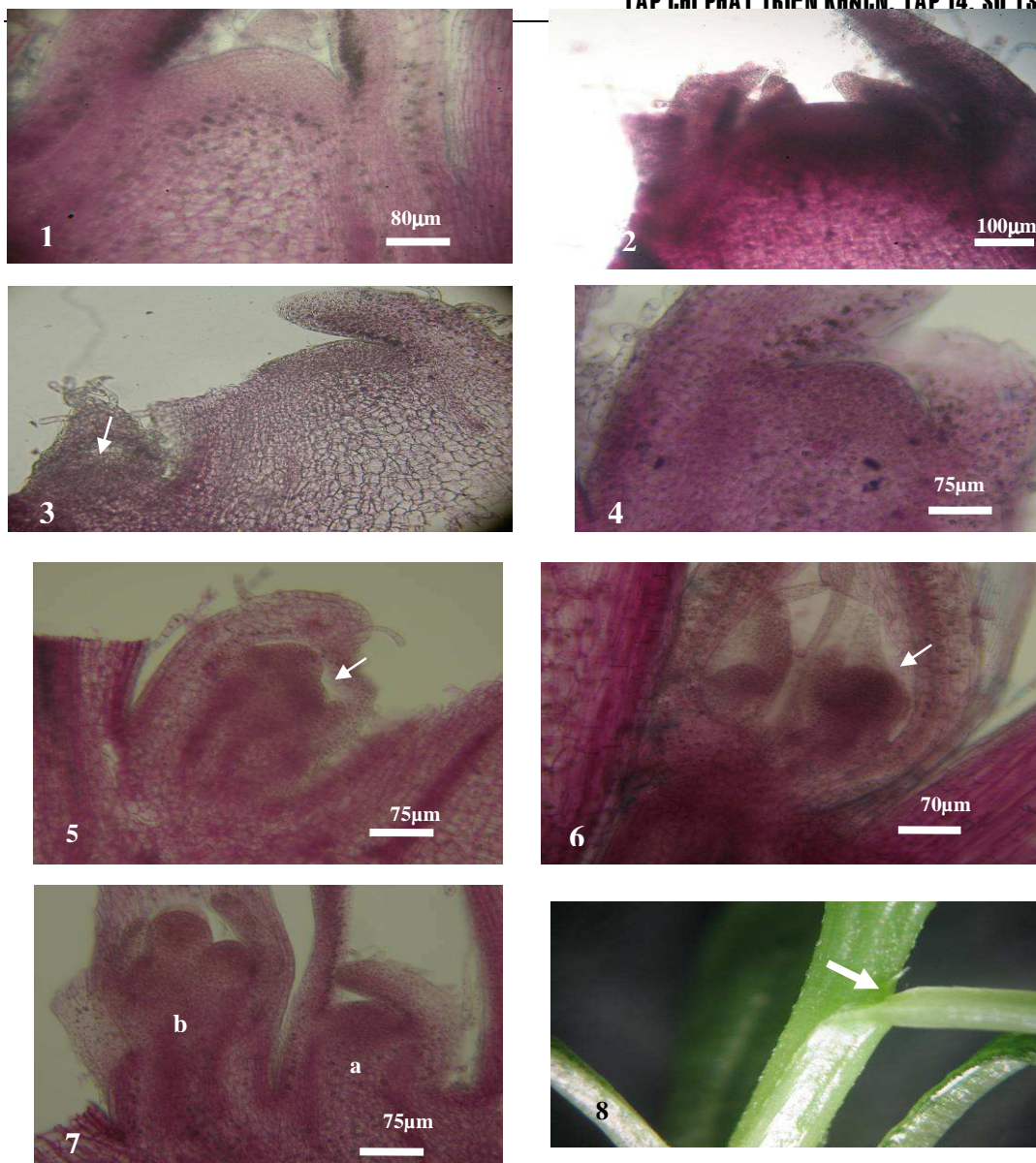
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: *Water deficit is one of the most important factors affecting plant physiology and development. Drought induced by PEG6000 inhibited main root and stimulated lateral root development. 2mg/l IAA supplemented in MS½ media causes early flowering by suppressing main root elongation and stimulating lateral root development. The increasing of IAA and decreasing of ABA in root are necessary in Amaranthus viridis flowering. Roles of plant growth regulators on the relationship between root development and flowering were discussed.*

Key words: *Amaranthus viridis, drought, flowering, Polyethylene Glycol, root development.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Berg L. and Zeng Y.J., Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by PEG 6000. *South African Journal of Botany* (72): 284-286. (2006).
- [2]. Bùi Trang Việt, Sinh lý thực vật – Phát triển. Nxb Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, 333 tr. (2000).
- [3]. Liu F. and Stützel H., Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. *Scientia Horticulturae* (102): 15-27, (2004).
- [4]. Murashige T., and Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473- 497. (1962).
- [5]. Nguyễn Thị Kim Luyên, Nguyễn Thị Hồng Anh, Trịnh Cẩm Tú, Bùi Trang Việt, Bùi Văn Lệ, Sự nuôi cấy mô phân sinh ngọn và nụ hoa Tím phi (*Saintpaulia ionantha* Wendl). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ ĐH. Quốc gia TP. Hồ Chí Minh* Vol. 11 (7): 25-30. (2008).
- [6]. Sharp R.G., Else M.A., Cameron R.W. and Davies W.J., Water deficits promote flowering in *Rhododendron* via regulation of pre and post initiation development. *Scientia Horticulturae* (120): 511-517. (2009).
- [7]. Trần Nguyễn Ngọc Sa, Ảnh hưởng của sự tăng trưởng rễ lên sự ra hoa ở *Arabidopsis thailiana* (L.) Heynh (ecotype Columbia). Khóa luận cử nhân Sinh học, 61 trang. (2009).
- [8]. Trịnh Cẩm Tú và Bùi Trang Việt, Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* để nghiên cứu sự phát triển phát hoa *Dendrobium sonia*. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ ĐH. Quốc gia TP. Hồ Chí Minh* Vol. 9 (9): 83-88. (2006).
- [9]. Xiong L., Wang R.G., Mao G., and Koczan J.M., Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology* (142): 1065-1074. (2006).



Hình 1.1. Mô phân sinh dinh dưỡng ở đỉnh ngọn cây Dền xanh 52 ngày tuổi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ với đỉnh nhọn và hai phác thể lá

Hình 1.2. Mô phân sinh hoa tự ở đỉnh ngọn cây Dền xanh 52 ngày tuổi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có IAA 2mg/l

Hình 1.3. Mô phân sinh hoa tự ở đỉnh ngọn cây Dền xanh với mô phân sinh hoa tự thứ cấp được tạo ra từ vùng ngoại vi.

Hình 1.4. Mô phân sinh hoa tự ở vị trí nách lá (cấu trúc đỉnh nhọn gần giống mô phân sinh dinh dưỡng)

Hình 1.5. Mô phân sinh hoa tự ở vị trí nách lá với mô phân sinh hoa được tạo ra từ vùng ngoại vi

Hình 1.6. Mô phân sinh hoa tự ở vị trí nách lá với một nụ hoa phát triển từ mô phân sinh hoa

Hình 1.7. Mô phân sinh hoa tự (a) và nụ hoa đang kéo dài cuống (b)

Hình 1.8. Các nụ hoa cây Dền xanh 55 ngày tuổi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung PEG 1%

Bảng 1. Tỷ lệ ra hoa cây Dền xanh tăng trưởng trên môi trường MS½ có bổ sung IAA

MS½	Thời gian (ngày tuổi)		
	38	55	67
Đối chứng	0	0	0
IAA 0,5mg/l	0	33,3	50,0
IAA 1mg/l	0	25,0	50,0
IAA 2mg/l	0	55,6	100,0

Bảng 2. Tỷ lệ ra hoa cây Dền xanh tăng trưởng trên môi trường MS½ có bổ sung PEG

MS½	Thời gian (ngày tuổi)			
	38	55	67	73
Đối chứng	0	0	0	0
PEG 0,5%	0	0	0	0
PEG 1%	0	33,3	33,3	50,0
PEG 2,5%	0	0	0	0
PEG 5%	0	0	0	0

Bảng 3. Sự thay đổi chiều dài rễ chính (mm) của bộ rễ cây Dền xanh trên môi trường MS½ có bổ sung PEG

MS½	Thời gian (ngày tuổi)				
	10	17	24	31	38
Đối chứng	31,3±3,0 ^{a,1}	51,0±1,0 ^{b,12}	61,7±3,3 ^{c,1}	78,0±1,2 ^{d,3}	83,0±4,7 ^{d,2}
PEG 0,5%	34,8±2,4 ^{ab,12}	42,5±2,8 ^{b,1}	57,6±6,2 ^{c,1}	73,3±3,3 ^{d,23}	73,7±1,9 ^{d,12}
PEG 1%	35,3±4,4 ^{a,12}	53,3±4,9 ^{b,12}	65,2±2,5 ^{bc,1}	59,3±3,0 ^{b,12}	73,7±6,4 ^{c,12}
PEG 2,5%	46,8±2,7 ^{a,23}	60,0±1,5 ^{b,2}	66,0±4,2 ^{b,2}	64,0±4,9 ^{b,123}	62,6±2,9 ^{b,1}
PEG 5%	52,3±4,5 ^{a,3}	58,0±2,6 ^{ab,2}	61,7±4,8 ^{ab,1}	65,7±3,4 ^{b,123}	64,7±4,4 ^{b,1}

Các mẫu tự kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn biểu hiện sự khác biệt theo dòng ở mức $p = 0,05$

Các chữ số kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn biểu hiện sự khác biệt theo cột ở mức $p = 0,05$

Bảng 4. Sự thay đổi tổng số rễ phụ cây Dền xanh trên môi trường MS½ có bổ sung PEG

MS½	Thời gian (ngày tuổi)				
	10	17	24	31	38
Đối chứng	6,0±1,0 ^{a,1}	5,7±0,3 ^{a,1}	7,0±1,5 ^{a,1}	7,3±0,3 ^{a,1,2}	14,0±0,6 ^{b,1,2}
PEG 0,5%	6,3±1,8 ^{a,1}	6,0±0,6 ^{a,1}	6,3±0,3 ^{a,1}	6,7±0,7 ^{a,1}	10,3±0,9 ^{b,1}
PEG 1%	8,7±1,2 ^{a,1}	9,3±0,3 ^{a,1,2}	10,3±0,9 ^{a,1,2}	13,7±2,3 ^{a,2,3}	32,0±2,5 ^{b,3}
PEG 2,5%	11,0±1,5 ^{a,1,2}	16,0±2,5 ^{ab,3}	14,7±2,0 ^{ab,2}	15,0±2,5 ^{ab,3}	17,3±1,2 ^{b,2}
PEG 5%	14,0±1,5 ^{a,2}	12,8±1,8 ^{a,2,3}	12,0±1,5 ^{a,2}	15,0±2,9 ^{a,3}	17,7±1,2 ^{a,2}

Các mẫu tự kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn biểu hiện sự khác biệt theo dòng ở mức $p = 0,05$

Các chữ số kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn biểu hiện sự khác biệt theo cột ở mức $p = 0,05$

Bảng 5. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật ở bộ rễ Dền xanh trên môi trường MS ½ có bổ sung IAA 2mg/l hay PEG 1%

Môi trường	Ngày tuổi	Hoạt tính tương đương (mg/l/g trọng lượng tươi)			
		IAA	ABA	Zeatin	GA ₃
MS ½	38	0,7±0,0 ¹	8,3±0,5 ³	1,7±0,2 ²	4,7±0,4 ^{3,4}
	55	0,4±0,0 ¹	7,7±0,4 ³	1,5±0,3 ^{2,2}	5,6±0,4 ⁴
MS ½, IAA 2mg/l	38	0,3±0,1 ¹	2,9±0,0 ²	0,4±0,0 ¹	2,3±0,1 ¹
	55	1,5±0,4 ²	0,7±0,2 ¹	0,5±0,1 ¹	1,9±0,2 ¹
MS ½, PEG 1%	38	0,5±0,2 ¹	6,4±0,5 ³	0,8±0,2 ¹	3,4±0,2 ²
	55	1,0±0,2 ^{1,2}	19,4±1,3 ⁴	1,7±0,1 ²	3,8±0,3 ^{2,3}

Các chữ số kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn biểu hiện sự khác biệt theo cột ở mức $p = 0,05$