

## **ẢNH HƯỞNG CỦA CANXI VÀ AXIT SALICYLIC ĐẾN CÂY ĐẬU Đũa TRONG ĐIỀU KIỆN MẶN NHÂN TẠO**

Nguyễn Thị Phương Dung\*, Trần Anh Tuấn

*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Email\*: ntpdung@vnua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 20.02.2017

Ngày chấp nhận: 19.06.2017

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung calcium ngoại sinh ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  50 mM) và axit salicylic (SA 0,25 mM) riêng rẽ hoặc kết hợp đến cây đậu đũa trong điều kiện tưới mặn (0,3% NaCl). Kết quả cho thấy, khi bổ sung thêm  $\text{Ca}^{2+}$  hoặc SA riêng rẽ vào công thức đối chứng đã làm giảm tác động của mặn và được thể hiện qua các chỉ tiêu về sinh trưởng, sinh lý sinh hóa đặc trưng trong điều kiện stress (chỉ thị stress). Khi bổ sung  $\text{Ca}^{2+}$  và SA cho cây đậu đũa trong điều kiện mặn đã làm tăng chiều cao cây, số lá, tỉ lệ chl<sub>a</sub>/chl<sub>b</sub>, chl (a+b)/carotenoids, chỉ số huỳnh quang hữu hiệu Fv/Fm, cũng như sự tích lũy chất khô, chiều dài, chiều rộng của quả và số quả/cây nhưng ngược lại, làm giảm sự gia tăng của hàm lượng proline, mức độ rò rỉ ion qua màng, độ thiếu hụt bão hòa hơi nước, hàm lượng hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) và hàm lượng malondialdehyde (MDA). Trong nghiên cứu này, công thức kết hợp giữa  $\text{Ca}^{2+}$  và SA cho kết quả tốt nhất với đa số các chỉ tiêu theo dõi, trừ khối lượng khô tích lũy và mức độ rò rỉ ion qua màng. Có thể cho rằng,  $\text{Ca}^{2+}$  và SA có vai trò tác động riêng rẽ trong việc làm giảm tác động của mặn trên cây đậu đũa, đồng thời có thể tương tác cho hiệu quả tốt hơn.

Từ khóa: Đậu đũa,  $\text{Ca}^{2+}$ , SA, hydrogen peroxide, malondialdehyde, proline.

### **Effect of Calcium and Salicylic Acid on Growth of Yardlong Bean under Salt Stress Condition**

#### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of exogenous application of salicylic acid (SA 0.25 mM) and calcium nitrate ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  50 mM), singly or in combination, on plant growth, photosynthetic capacity, and some stress markers of yardlong bean plants exposed to salt stress (0.3% NaCl). Application of 0.3% NaCl reduced plant growth, total chlorophyll and carotenoid content, and chlorophyll fluorescent (Fv/Fm). Exogenous application of SA or  $\text{Ca}^{2+}$  alone alleviated the level of proline content, saturation of water shortage, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ion leakage and malondialdehyde (MDA) in the presence of NaCl. Nevertheless, the best results in growth of stems and leaves, photosynthetic pigment concentrations, and some stress markers were observed in response to the combined SA +  $\text{Ca}^{2+}$  treatment, except accumulation of dry matter and ion leakage. Our results suggested that  $\text{Ca}^{2+}$  and SA may interact to reduce the stress experienced by the plants in the presence of NaCl.

Keywords: Cowpea,  $\text{Ca}^{2+}$ , SA, hydrogen peroxide, malondialdehyde, proline.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đất mặn là một vấn đề toàn cầu có ảnh hưởng đến khoảng 20% diện tích đất được tưới tiêu và làm giảm năng suất cây trồng đáng kể (Qadir *et al.*, 2014). Người ta ước tính rằng, trên 800 triệu hecta đất và 32 triệu hecta đất nông

NGHIỆP CHỊU ẢNH HƯỞNG CỦA MUỐI (FAO, 2015). Ở Việt Nam, mùa khô 2015 - 2016, đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) phải hứng chịu một đợt hạn - mặn lịch sử chưa từng có, gây thiệt hại nặng nề cho 9/13 tỉnh ven biển, với độ mặn đã đạt đỉnh cao nhất 4 g/l. Hơn nữa, ranh giới mặn lấn sâu vào đất liền, có nơi trên 30 km.

Để nâng cao tiềm năng năng suất và cải thiện khả năng chịu mặn của cây trồng thì một điều quan trọng là hiểu được cơ chế sinh lý, sinh hóa và phân tử của thực vật khi đối phó với mặn. Đất nhiễm mặn ức chế sự hấp thu nước ở thực vật, gây ra sự mất cân bằng ion dẫn đến ngộ độc ion và stress thẩm thấu (Munns and Tester, 2008). Để chịu được mặn, thực vật tích tụ các chất tan tương thích như proline, làm giảm khả năng thẩm thấu của tế bào chất, tạo điều kiện cho sự hấp thụ nước và dọn sạch các ROS (Reactive Oxygen Species) phân tử (Pottosin *et al.*, 2014).

Có nhiều con đường truyền tín hiệu dẫn đến sự biểu hiện của gen, lần lượt cho phép kích hoạt các protein xác định kiểu hình cây dưới tác động của mặn. Các nghiên cứu liên quan đến con đường tín hiệu không ngừng tăng lên trong những năm gần đây, trong đó có vai trò của chất truyền tín hiệu thứ cấp, các phytohormones và các phosphoprotein cascades. Canxi ( $\text{Ca}^{2+}$ ) là một thành phần trong mạng lưới các chất truyền tín hiệu thứ cấp có vai trò giúp thực vật thích ứng với môi trường stress (Tuteja and Mahajan, 2007).  $\text{Ca}^{2+}$  hoạt động ở chỗ giao cắt của các con đường truyền tín hiệu khác nhau (Gill and Tuteja, 2010; Shakara *et al.*, 2016).

Mức stress muối cao sẽ khởi động mạng lưới tín hiệu  $\text{Ca}^{2+}$ , bao gồm: khử cực của màng (membrane depolarization), hoạt hóa các kênh vận chuyển  $\text{Ca}^{2+}$ , sinh ra một dấu hiệu  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  Signature) (Tester and Davenport, 2003; Zhu, 2003). Tăng nồng độ  $\text{Ca}^{2+}$ , tăng cường kích thích độ nhạy của  $\text{Ca}^{2+}$  chức năng là tín hiệu hiệu quả, được điều chỉnh bởi protein liên kết với  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium-binding-proteins) và do đó thực hiện việc truyền dẫn trong con đường truyền tín hiệu (Uozumi and Schroeder, 2010).

Các phytohormones như axit abscisic (ABA), axit salicylic (SA), ethylene (ET) và axit jasmonic (JA)... kích hoạt các con đường truyền tín hiệu. Chúng có thể hoạt động độc lập hoặc kết hợp với các yếu tố khác nhằm đáp ứng với điều kiện stress như: thiết lập lại cân bằng nội tế bào, bảo vệ và sửa chữa các protein và màng bị hư hỏng. Như vậy, các phân tử tín hiệu trong phản ứng đáp ứng của tế bào, mô và toàn cây

với stress đóng vai trò rất quan trọng trong khả năng chống chịu stress của thực vật (Saxena *et al.*, 2016). Các nghiên cứu gần đây (Hayat *et al.*, 2010) cho thấy SA đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh cơ chế kháng stress sinh học và stress phi sinh học ở thực vật thông qua sự ức chế của catalase và enzym phân hủy  $\text{H}_2\text{O}_2$ , do đó làm tăng nồng độ  $\text{H}_2\text{O}_2$  trong tế bào và từ đó  $\text{H}_2\text{O}_2$  hoạt động như phân tử tín hiệu thứ cấp kích hoạt gen liên quan đến quá trình chống chịu. Ở Việt Nam, Nguyễn Thị Phương Dung và cs. (2016) cũng cho thấy vai trò tích cực của SA trong phản ứng với stress hạn ở cây dưa chuột và stress mặn ở cây đậu đũa. Ở cây đậu đũa, sau 40 ngày gieo trồng, chiều cao cây, số lá, sự tích lũy chất khô, diện tích tế bào khí khổng, chiều dài, chiều rộng vi khẩu đều tăng nhưng mật độ tế bào khí khổng lại giảm trong điều kiện mặn có SA so với điều kiện mặn không có SA. Xử lý SA 0,25 mM cho các công thức gây mặn làm giảm mức độ tăng sự tích lũy proline bằng 62%, đồng thời làm tăng năng suất thực thu lên 1,42 lần so với công thức mặn. Trong 2 nồng độ SA sử dụng, nồng độ 0,25 mM SA có hiệu quả tốt hơn so với nồng độ 0,5 mM SA. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Nguyễn Văn Bo và cs. (2011) lại cho thấy, sử dụng canxi dạng  $\text{CaSO}_4$  và  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  với lượng tương ứng 1,795 g và 1,743 g cho mỗi chậu thí nghiệm 1 kg đất đã cải thiện chiều cao cây lúa so với tưới mặn không bón canxi. Dạng  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  bổ sung được ghi nhận đã làm tăng phần trăm hạt chắc, trọng lượng 1.000 hạt và năng suất hạt trong điều kiện stress mặn. Điều đó mở ra triển vọng to lớn cho việc nghiên cứu về vai trò của SA và  $\text{Ca}^{2+}$  đối với khả năng chống chịu của thực vật, để ứng dụng trong việc cải thiện khả năng chống chịu của cây trồng.

Mặc dù vậy, những nghiên cứu về vai trò và ứng dụng kết hợp của SA và  $\text{Ca}^{2+}$  đối với khả năng chịu mặn của cây trồng ở Việt Nam còn chưa được chú ý. Vì thế, mục tiêu của nghiên cứu là góp phần làm sáng tỏ hơn vai trò, cơ chế tác động của  $\text{Ca}^{2+}$  và SA trong phản ứng của cây trồng với điều kiện mặn. Những kết quả của nghiên cứu này sẽ là cơ sở khoa học cho việc bổ sung thêm các biện pháp kỹ thuật làm tăng khả năng chịu mặn ở cây trồng.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện trên giống đậu đũa cao sản số 4 do Công ty TNHH giống rau Kim Hà cung cấp.

Hóa chất sử dụng cho thí nghiệm là canxi ở các dạng muối vô cơ  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , axit salicylic, NaOH, ethanol, axit lactic, axit sulfosalicylic, axit acetic, axit phosphoric, ninhydrin, toluene...

Thí nghiệm được bố trí trong nhà lưới có mái che và trong phòng thí nghiệm của Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam trong thời gian từ tháng 1 - 12 năm 2016.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm thực hiện trong 2 thời vụ liên tiếp là Xuân Hè (21/1-3/5) và Thu Đông (19/8-5/12), các công thức được sắp xếp theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh RCB, 10 cây/công thức, 3 lần nhắc lại, gồm 4 công thức: CT1 (Đối chứng (ĐC) - không xử lý SA và  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), CT2 (0,25 mM SA), CT3 (50 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), CT4 (0,25 mM SA + 50 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ )

Tiến hành trồng trên chậu kích thước 30 x 30 x 40 cm, sử dụng 6 kg đất/chậu, mỗi chậu 2 cây, mật độ trung bình 12 cây/m<sup>2</sup>. Đất được phơi khô, sau đó xử lý mặn nhân tạo bằng NaCl, độ mặn nước tưới là 0,3%. Tưới một lượng dung dịch muối 0,3% như nhau cho tất cả các công thức và tưới liên tục 7 ngày vào từng thời kì của cây: nảy mầm, giai đoạn ra hoa tạo quả lần 1, giai đoạn ra hoa tạo quả lần 2, sau đó tưới phục hồi trở lại. Đo EC của đất trước khi gieo và đo lại EC của đất sau khi thu hoạch.

Phun SA với các nồng độ khác nhau ở 3 giai đoạn: giai đoạn 3 lá thật, giai đoạn ra hoa tạo quả lần 1, giai đoạn ra hoa tạo quả lần 2, phun ướt bề mặt lá: Lần 1 phun 400 lít/ha, lần 2 phun 600 lít/ha, lần 3 phun 800 lít/ha. Tiến hành phun khi trời mát, không nắng. Sau khi phun 7 ngày tiến hành lấy mẫu phân tích.

Thí nghiệm được tiến hành với cây đậu đũa trồng trong chậu, với nền phân bón chung, tính cho 1 ha: 300 kg vôi bột + 30 kg N + 90 kg  $\text{P}_2\text{O}_5$  + 60 kg  $\text{K}_2\text{O}$ , chăm sóc và theo dõi trong nhà lưới.

#### 2.2.2. Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp phân tích

Chiều cao cây, số lá, tốc độ tăng trưởng chiều cao, số lá được xác định mỗi tuần một lần.

Hàm lượng diệp lục (chlorophyll a, b, chlorophyll tổng số) được xác định bằng cách sử dụng máy đo SPAD 502 và sau đó quy đổi ra hàm lượng sắc tố trong lá (Richardson *et al.*, 2002; Uddling *et al.* 2007) theo công thức sau:

$$\text{Chla (mg/cm}^2\text{)} = 1.56\text{e-}06 + 3.33\text{e-}04x + 9.03\text{e-}06x^2$$

$$\text{Chlb (mg/cm}^2\text{)} = 5.46\text{e-}04 + 6.89\text{e-}05x + 3.37\text{e-}06x^2$$

$$\text{Chl (a+b) (mg/cm}^2\text{)} = 5.52 \text{e-}04 + 4.04 \text{e-}04x + 1.25\text{e-}05x^2$$

Hàm lượng carotenoids được xác định theo phương pháp của Arnon (1949). Lấy 10 mẫu lá tổng khối lượng 1 g, nghiền nhỏ với 10 ml 80% acetone. Hỗn hợp được ly tâm ở 6.000 g trong 10 phút. Đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 470 nm. Hàm carotenoids tính theo công thức:

$$\text{Carotenoid (g/lít)} = (\text{A}_{470} - 0,00182 \text{ Chla} - 0,08502 \text{ Chlb})/198.$$

Hàm lượng các sắc tố quang hợp sau đó đều được quy đổi ra mg/g

Độ thiếu bão hòa nước của lá (%): được xác định bằng tỷ lệ giữa lượng nước hấp thu thêm để đạt trạng thái bão hòa/lượng nước bão hòa.

Khối lượng tươi/khô của thân lá, rễ (lấy mỗi lần nhắc lại ở mỗi công thức 3 cây, cân khối lượng tươi của thân lá và rễ riêng biệt, sau đó sấy ở 80°C trong 24 h để xác định khối lượng khô). Khả năng quang hợp dựa trên mức độ huỳnh quang của diệp lục Fv/Fm, sử dụng máy Chlorophyll fluorescence cầm tay OS-30 (ADC, Anh).

Mức độ phân hủy phospholipid được xác định thông qua phân tích hàm lượng malondialdehyde (MDA) theo phương pháp của Heath và Packe (1968).

Độ rò rỉ ion (electrolyte leakage levels) được xác định theo phương pháp của Dionisio-Sese và Tobita (1998). Lấy 15 mảnh lá (đường kính  $d = 1$  cm) được đặt trong ống nhựa có nắp kín, chứa nước cất khử ion, để trong tối và lắc liên tục trong 6 giờ. Sau đó đo độ dẫn (sử dụng máy CyberScan PC300 pH/Conductivity /TDS Meter, Eutech Instruments Pte Ltd), giá trị đo được là ( $EC_0$ ). Tiếp tục, đun nóng các ống đến  $50^\circ\text{C}$  trong 25 phút và đo độ dẫn lần 2 ( $EC_1$ ). Cuối cùng, các ống được đun nóng đến  $100^\circ\text{C}$  trong 10 phút đo độ dẫn lần 3 ( $EC_2$ ). Độ rò rỉ ion (%) =  $(EC_1 - EC_0) / (EC_2 - EC_0) \times 100$

Hàm lượng peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) được xác định theo phương pháp của Jessup *et al.* (1994). Hàm lượng proline theo phương pháp của Bates *et al.* (1973).

Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm Irristat 5.0. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình của các thông số được đánh giá theo phân tích ANOVA ở mức  $p < 0,05$ .

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của $\text{Ca}^{2+}$ và SA đến sự sinh trưởng thân lá của đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn

Ở công thức có bổ sung thêm Ca vào đất trước khi trồng và phun SA ở 3 giai đoạn (cây con, ra hoa và hình thành quả) đã cho sự phát

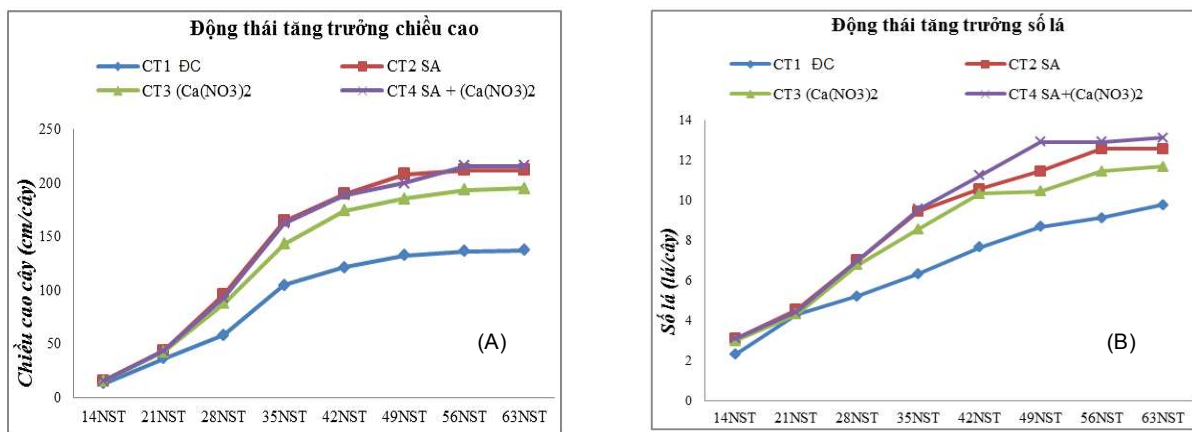
triển thân lá tốt hơn so công thức đối chứng, đồng thời tốt hơn các công thức chỉ xử lý riêng rẽ Ca hoặc SA (Hình 1A và Hình 1B).

Giai đoạn 14 - 21 ngày sau trồng (NST), chưa có sự khác biệt nhiều về cả chiều cao và số lá. Tuy nhiên khi theo dõi đến ngày thứ 10 gây mặn (14 NST), tất các công thức đều đã xuất hiện lá trừ công thức chỉ có NaCl. Bên cạnh đó, một số cây có biểu hiện héo rũ và chết.

Đến giai đoạn từ 28 NST trở đi, chiều cao cây giữa các công thức khác nhau rõ ràng. Công thức đối chứng chiều cao luôn dao động ở mức bằng 64,74 - 60,49% so với công thức xử lý SA, bằng 73,43 - 64,99% so với công thức bổ sung  $\text{Ca}^{2+}$  và chỉ đạt 64,39 - 62,15% so với công thức phối hợp giữa  $\text{Ca}^{2+}$  và SA.

Tương tự như vậy với số lá, công thức đối chứng bằng 77,87 - 67,06% so với công thức xử lý SA, bằng 83,80 - 74,25% so với công thức bổ sung  $\text{Ca}^{2+}$  và chỉ đạt 74,60 - 67,26% so với công thức phối hợp giữa Ca và SA.

Các ion khoáng hấp thu từ đất được vận chuyển cùng với nước theo mạch xylem lên phía trên, sau đó tập trung ở lá. Sự có mặt của NaCl trong đất đã làm tăng áp suất thẩm thấu, hạn chế sự hấp thu nước, do đó làm chậm tốc độ sinh trưởng chiều cao và số lá của cây đậu đũa. Do vậy, stress muối xảy ra mạnh nhất ở mô lá. Dễ dàng nhận thấy biểu hiện héo rũ bằng mắt thường ở một số cây đậu đũa 10 ngày sau xử lý mặn.



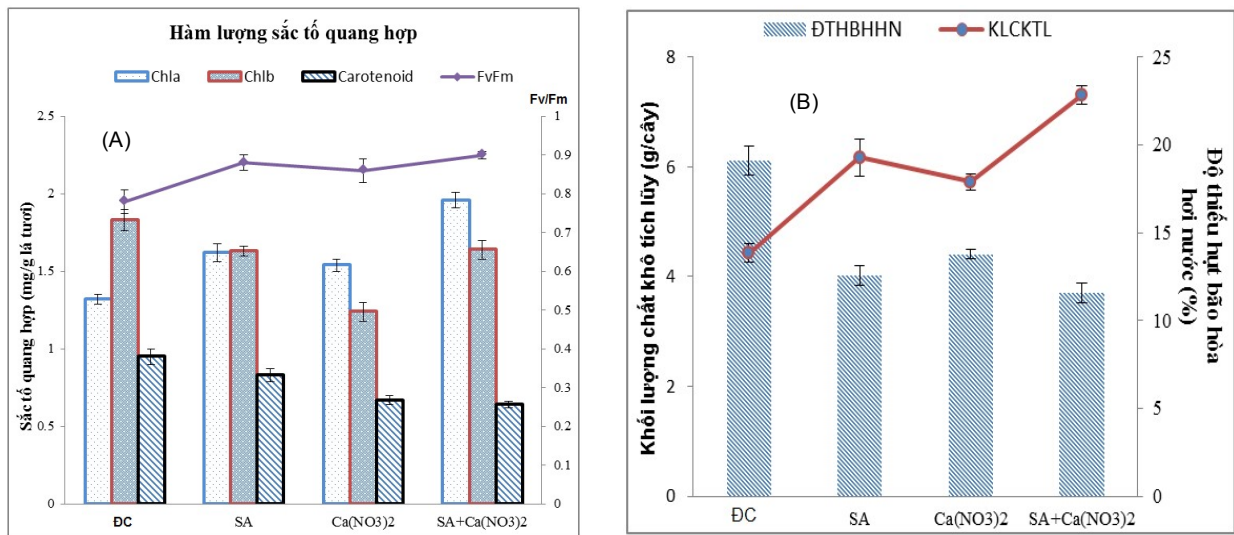
Hình 1. Ảnh hưởng của  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  và SA đến động thái tăng trưởng chiều cao thân chính (A) và động thái ra lá (B) của giống đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn nhân tạo

Việc bổ sung  $\text{Ca}^{2+}$  vào môi trường đất nhằm mặn giúp giảm đáng kể việc hấp thu  $\text{Na}^+$  ở rễ và sự di chuyển chúng tới chồi, duy trì sinh trưởng. Mức  $\text{Ca}^{2+}$  bên ngoài cao làm tăng khả năng sinh trưởng trong điều kiện mặn do có khả năng loại trừ  $\text{Na}^+$  của rễ cây tiếp xúc với stress mặn, duy trì nồng độ  $\text{K}^+$  của chúng, duy trì tính chọn lọc và tính nguyên vẹn của màng tế bào (Kaya *et al.*, 2002). Do đó duy trì khả năng hấp thu nước, cải thiện sự phát triển thân lá trong điều kiện mặn.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với những nghiên cứu trước đây về vai trò của SA và  $\text{Ca}^{2+}$  đối với khả năng chịu mặn của cây trồng, như nghiên cứu của Rady và Mohamed (2015) về ảnh hưởng của SA kết hợp với dịch chiết của lá cây chùm ngây, nghiên cứu của Murillo-Amador *et al.* (2006) về ảnh hưởng của  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , nghiên cứu của Nguyễn Thị Phương Dung (2016) về ảnh hưởng của SA đã làm tăng chiều cao cây, số lá cũng như diện tích lá ở cây đậu đũa trong điều kiện mặn, hoặc nghiên cứu của Manaa *et al.* (2014) về ảnh hưởng phối hợp của  $\text{CaSO}_4$  và SA đến cây cà chua.

### 3.2. Ảnh hưởng của $\text{Ca}^{2+}$ và SA đến khả năng quang hợp của giống đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn nhân tạo

**Hàm lượng sắc tố quang hợp:** Hạn muối làm giảm hàm lượng chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub> và chl tổng số cũng như tỉ lệ chl<sub>a</sub>/chl<sub>b</sub>. Ngược lại, sự tổng hợp carotenoids lại tăng lên (Hình 2A). Ở công thức đối chứng, hàm lượng Chl<sub>a</sub> thấp nhất nhưng Chl<sub>b</sub> và carotenoids lại cao nhất. Hơn nữa, hàm lượng Chl<sub>a</sub> ít hơn hẳn hàm lượng Chl<sub>b</sub> ở công thức đối chứng so với các công thức còn lại. Trong khi đó, ở công thức xử lý SA hàm lượng Chl<sub>a</sub> và Chl<sub>b</sub> gần bằng nhau. Còn ở công thức xử lý  $\text{Ca}^{2+}$  và công thức xử lý kết hợp giữa SA và  $\text{Ca}^{2+}$ , hàm lượng Chl<sub>a</sub> lại lớn hơn Chl<sub>b</sub>. Mặt khác, Chl<sub>a</sub> giữ vai trò quan trọng nhất trong việc hấp thu và vận chuyển ánh sáng mặt trời, vì thế có ý nghĩa quyết định đến hiệu quả của quá trình quang hợp. Những nghiên cứu về ảnh hưởng của SA đến sắc tố quang hợp đã được báo cáo trong các nghiên cứu của Wasti *et al.* (2012), Manaa *et al.* (2014). Tuy nhiên với kết quả của nghiên cứu này, có thể cho rằng ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng Chl<sub>a</sub> cũng như tỉ lệ chl tổng số được tăng lên khi bổ sung đồng thời  $\text{Ca}^{2+}$  và SA.



**Hình 2. Ảnh hưởng của  $\text{Ca}^{2+}$  và SA đến hàm lượng sắc tố quang hợp, chỉ số hiệu lực quang của diệp lục ở lá 20 NST (A) và độ thiếu hụt bão hòa hơi nước, khả năng tích lũy chất khô 25 NST (B) của giống đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn nhân tạo**

Ghi chú: Chl a: hàm lượng diệp lục a; Chl b: hàm lượng diệp lục b; Car: hàm lượng carotenoids.

Lượng  $\text{Ca}^{2+}$  đầy đủ được yêu cầu cho tất cả các giai đoạn phát triển của cây trồng và đóng vai trò cơ bản trong việc điều chỉnh tăng trưởng của tế bào, của mô và tham gia vào sự thích nghi của cây trồng đối với các yếu tố bất thuận (Manaa *et al.*, 2014). Bổ sung  $\text{Ca}^{2+}$  ngoại sinh làm tăng khả năng chịu hạn, ức chế sự tổng hợp các dạng oxy hoạt hóa, bảo vệ cấu trúc của màng sinh chất và duy trì hoạt động quang hợp bình thường. Nghiên cứu của Manaa *et al.* (2014) đã chỉ ra rằng, bổ sung SA và  $\text{Ca}^{2+}$  riêng rẽ không có tác dụng đáng kể làm tăng hàm lượng chl cho cả hai kiểu gen cây cà chua tham gia thí nghiệm. Tuy nhiên, sự phối hợp giữa  $\text{Ca}^{2+}$  và SA có hiệu quả rõ ràng trong việc giảm thiểu các tác dụng bất lợi của mặn đối với hàm lượng các sắc tố quang hợp trên cây cà chua.

**Chỉ số huỳnh quang hữu hiệu:** Tỷ lệ Fv/Fm thấp nhất ở công thức đối chứng là 0,78 và cao nhất ở công thức 4 (SA +  $\text{Ca}^{2+}$ ) bằng 0,9. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Shi *et al.* (2006) khi nghiên cứu ảnh hưởng của SA đến cây dưa chuột trong điều kiện nóng. Kết quả cho thấy, chỉ số Fv/Fm chlorophyll a là huỳnh quang thông số cảm ứng đặc trưng cho hiệu suất lượng tử tối đa của hệ thống quang hóa II (PS II). Với những cây diễn ra hoạt động quang hợp bình thường thông số này luôn duy trì ở mức lớn hơn 0,8 và nhỏ hơn 1. Trong trường hợp stress, có bổ sung thêm SA đã làm tăng số lượng tử tối đa trong các phản ứng hóa sinh của hệ thống quang hóa II cũng như quá trình vận chuyển điện tử của hệ thống này (photosystem II electron transport -ÖPSII).

### **3.3. Ảnh hưởng của $\text{Ca}^{2+}$ và SA đến độ thiếu hụt bảo hòa nước ở lá và khả năng tích lũy chất khô của giống đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn nhân tạo**

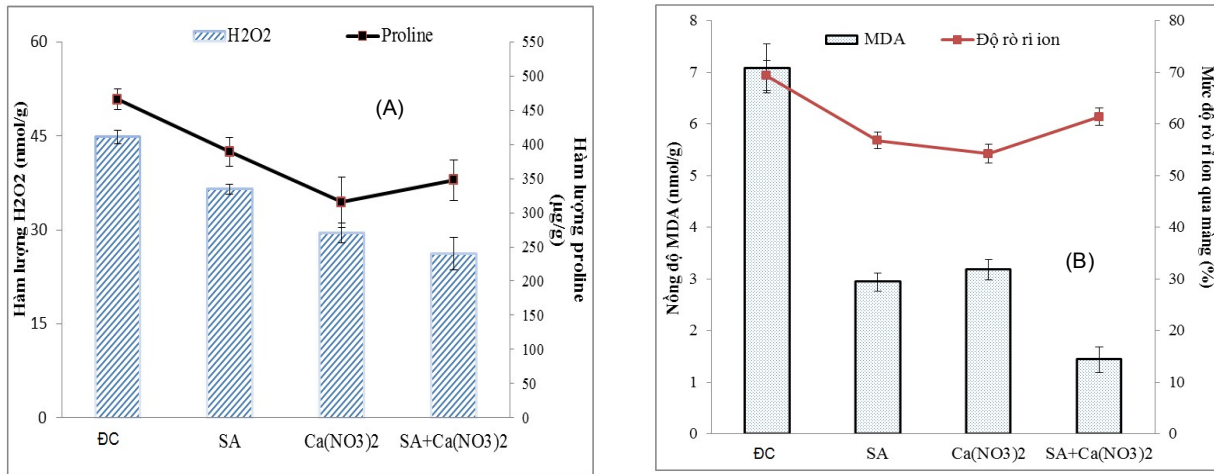
CT1 khi chịu sự ảnh hưởng của muối mà không được xử lý  $\text{Ca}^{2+}$  cũng như SA thì độ thiếu hụt bảo hòa gần đạt đến 20%. Đây là mức thiếu hụt bảo hòa nước lớn có khả năng cao cây không thể khôi phục được trạng thái bình thường. Trong khi đó, ở các công thức được xử lý hoặc SA hoặc cả SA và  $\text{Ca}^{2+}$  độ thiếu hụt bảo hòa hơi nước chỉ khoảng 12 - 13% và đạt thấp nhất khi xử lý

kết hợp cả  $\text{Ca}^{2+}$  và SA là 11,58%. Trường hợp này, cây có khả năng hút nước để đạt trạng thái bão hòa hoàn toàn, duy trì hoạt động sinh lý bình thường nếu được bổ sung nước kịp thời. Như vậy, rõ ràng SA và  $\text{Ca}^{2+}$  đã đóng một vai trò trong việc làm giảm thiểu hụt bảo hòa hơi nước của lá, ngược lại làm tăng khả năng tích lũy chất khô của cây. Trong đó, sự tích lũy chất khô cao nhất ở CT4 (SA +  $\text{Ca}^{2+}$ ), cao gấp 1,65 lần CT1 (NaCl) và gấp 1,2 đến 1,3 lần so với CT2 và CT3.

Nghiên cứu trước đây của Manaa *et al.* (2014) cũng đã chỉ ra rằng, xử lý (NaCl + SA), (NaCl +  $\text{Ca}^{2+}$ ) và (NaCl + SA +  $\text{Ca}^{2+}$ ) đã làm tăng khối lượng chất khô tương ứng 51, 40 và 39% so với điều kiện mặn (NaCl). Đồng thời, tác động này thể hiện rõ hơn ở rễ so với ở lá. Trong nghiên cứu này, ứng dụng đồng thời của SA và  $\text{Ca}^{2+}$  đã cho kết quả tốt hơn trên một số chỉ tiêu sinh lý của cây trồng. Điều này phù hợp với giả thuyết trước đây cho rằng SA và  $\text{Ca}^{2+}$  hoạt động như các hợp chất tín hiệu trong “chất phụ gia” hoặc có thể tác động “cộng gộp” nhằm làm giảm tác động của mặn.

### **3.4. Ảnh hưởng của $\text{Ca}^{2+}$ và SA đến các chỉ thị stress của giống đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn nhân tạo**

**Hàm lượng proline:** Kết quả nghiên cứu trên cây đậu đũa sau 25 ngày gieo trồng (Hình 3A) đã cho thấy sự tích lũy proline giảm còn 83,63% ở công thức bổ sung thêm SA, 67,7% ở công thức có  $\text{Ca}^{2+}$  và bằng 74,63% ở công thức kết hợp giữa  $\text{Ca}^{2+}$  và SA. Sự sai khác ở đây có ý nghĩa thống kê ở mức ý độ tin cậy 95%. Sự tổng hợp proline khi có mặt của muối và SA được điều chỉnh bởi hoạt động của pyrroline-5-carboxylate reductase (P-5-CR) và  $\gamma$ -glutamyl kinase và ức chế của proline oxidase và proline dehydrogenase (Misra and Saxena, 2009). Dù vậy, proline được coi như “phản ứng stress” điển hình và sự giảm hàm lượng proline ở lá khi có tác động riêng rẽ hay đồng thời của SA và  $\text{Ca}^{2+}$  có thể cho rằng đã làm giảm cường độ stress của cây đậu đũa trong điều kiện mặn. Và thực tế, sự giảm hàm lượng proline này không gây ra bất kỳ sự giảm hàm lượng nước nào.



**Hình 3.** Ảnh hưởng của Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> và SA đến hàm lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hàm lượng proline (A) và hàm lượng MDA, mức độ rò rỉ ion qua màng (B) của giống đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn nhân tạo 25 NST

**Hàm lượng hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nội sinh:** Hàm lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giảm còn 81,45% ở công thức bổ sung thêm SA, 70,86% ở công thức có Ca<sup>2+</sup> và bằng 65,72% ở công thức kết hợp giữa Ca<sup>2+</sup> và SA (Hình 3A).

**Hàm lượng malondialdehyde (MDA):** Hàm lượng MDA giảm chỉ còn 41,53% ở công thức bổ sung thêm SA, 44,92% ở công thức có Ca<sup>2+</sup> và bằng 20,34% ở công thức kết hợp giữa Ca<sup>2+</sup> và SA (Hình 3B).

**Ion leakage:** Mức độ rò rỉ ion qua màng cao nhất ở công thức đối chứng (66,45%), thấp nhất ở công thức khi bổ sung thêm Ca<sup>2+</sup> (52,46%), giảm đáng kể ở công thức bổ sung thêm SA (Hình 3B). Tuy nhiên đã không tìm thấy tác động tổng hợp giữa Ca<sup>2+</sup> và SA trong việc làm giảm mức độ rò rỉ ion qua màng.

Cùng với sự tăng của hàm lượng proline trong điều kiện stress muối, các kết quả nghiên cứu trước đây cũng cho thấy, trong cơ thể thực vật, ở điều kiện bình thường, dưới sự kiểm soát chặt chẽ của các enzyme chống oxy hóa, các gốc tự do chứa oxy như: superoxide (O<sup>2-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) và hydroxyl (OH<sup>-</sup>), những dạng oxy hoạt hóa là sản phẩm chuyển hóa của oxy, tham gia điều khiển sinh trưởng, phát triển của các cơ quan lá, hoa, quả,... Khi cơ thể gặp điều kiện sống bất lợi như hạn hán, lạnh, nóng... hàm

lượng các gốc này sẽ tăng đột biến, gây nên hiện tượng “stress oxy hóa” (Mai Văn Chung, 2013).

Có nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng mức độ bền của màng tế bào, cản trở sự rò rỉ các ion qua màng, duy trì hoạt động quang hợp bình thường được điều hòa bởi hormone. Trong số đó, đã có nhiều báo cáo cho thấy, Na<sup>+</sup> cạnh tranh với Ca<sup>2+</sup> về vị trí liên kết và Ca<sup>2+</sup> ở thành vách tế bào trực tiếp làm giảm bớt các triệu chứng gây ra bởi độc kim loại. Tác dụng cải hóa của việc bổ sung Ca<sup>2+</sup> ngoại sinh trong điều kiện mặn có thể kết hợp với sự duy trì tỉ lệ tối ưu K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> và cân bằng nội tế bào, liên quan đến việc ức chế dòng Na<sup>+</sup> đi vào và K<sup>+</sup> đi ra hoặc thúc đẩy dòng Na<sup>+</sup> đi ra và K<sup>+</sup> đi vào qua màng sinh chất (Shabala *et al.*, 2006).

Peroxide hóa lipid được xem như là chỉ số về sự tổn thương của màng, dẫn đến sự rò rỉ ion qua màng dưới điều kiện mặn (Katsuhara *et al.*, 2005). Định lượng MDA - sản phẩm peroxide hóa lipid, hình thành khi phân hủy các axit béo bậc cao không bão hòa của màng sinh chất cho phép đánh giá khả năng chống chịu của cây trồng trong các điều kiện stress khác nhau. Xử lý SA và Ca<sup>2+</sup> đã làm giảm đáng kể hàm lượng MDA trong điều kiện hạn muối. Có thể cho rằng, SA và Ca<sup>2+</sup> có vai trò trong việc cảm ứng hoạt động của enzyme chống oxy hóa dẫn đến giảm ROS và peroxide hóa lipid màng tế bào

trong các điều kiện stress phi sinh học (Jiang and Huang, 2001; Khan *et al.*, 2003).

**3.5. Ảnh hưởng của Ca<sup>2+</sup> và SA đến yếu tố cấu thành năng suất của giống đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn nhân tạo**

Khi xử lý muối đã tác động tiêu cực đến các yếu tố cấu thành năng suất. Phun SA qua lá và xử lý đất bằng Ca<sup>2+</sup> đã làm tăng các yếu tố cấu thành năng suất trong điều kiện mặn. Số quả/cây ở các công thức phối hợp giữa SA và Ca cao gấp 1,48 lần công thức đối chứng. Còn công thức bổ sung riêng rẽ hoặc SA hoặc Ca cao hơn tương ứng là 1,38 và 1,21 lần. Chiều dài quả, chiều rộng quả và khối lượng quả đều cao hơn ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Trong đó khối lượng quả ở công thức phối hợp cao hơn 1,28 lần và hai công thức riêng rẽ cao hơn là 1,23 và 1,25 lần. Tuy nhiên, độ Brix của quả cao nhất lại ở công thức khi bổ sung thêm SA gấp 1,45 lần, sau đó là công thức kết hợp Ca và SA cao hơn là 1,29 lần và xử lý Ca là 1,22 lần so với công thức đối chứng (Bảng 1).

Kết quả nghiên cứu của Feagley và Fenn (1998) cho thấy, bổ sung thêm Ca<sup>2+</sup> hòa tan cho lúa làm khối lượng hạt lúa tăng 14% so với trường hợp không bổ sung Ca<sup>2+</sup>. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, có thể dự đoán về vai trò tích cực của SA và Ca<sup>2+</sup> trong việc giảm bớt tác động của mặn ở cây đậu đũa và nâng cao năng suất cây trồng. Các nghiên cứu trước đây đã khẳng định sự hình thành cơ quan mới của cây chậm hơn trong điều kiện mặn, đồng thời kích thích chúng cũng nhỏ hơn, điều này xảy ra ở cả cơ quan sinh trưởng và cơ quan sinh sản, thậm chí đã không thể

hình thành hoa được trong điều kiện mặn. Nguyên nhân được cho là do mặn đã làm phá vỡ mô phân sinh đỉnh sinh trưởng, nơi được coi là cảm ứng cho sự phân hóa mầm hoa. Xử lý Ca<sup>2+</sup> và SA ngoại sinh đã có tác dụng kích thích sự hình thành mầm hoa, cũng như số lượng hoa, thúc đẩy quá trình thụ phấn, thụ tinh cũng như tạo quả, do đó số quả cũng như kích thước quả đã tăng lên.

Ngoài ra, xử lý SA ngoại sinh đã làm tăng hàm lượng đường hòa tan, đặc biệt là đường khử ở rễ cây, trong đó có disaccharides và oligosaccharides đóng vai trò quan trọng trong việc đảm bảo cấu trúc của màng cũng như cường độ trao đổi chất (Dong *et al.*, 2011). Mặt khác, hàm lượng đường hòa tan tổng số được coi là chất điều hòa thẩm thấu. Do đó, xử lý SA cho cây đậu đũa có thể đã làm hàm lượng Brix trong quả, tăng khả năng hút nước, thúc đẩy sự phát triển của thân lá, duy trì và tăng khả năng chống chịu với hạn muối.

**4. KẾT LUẬN**

Việc bổ sung thêm SA hoặc Ca<sup>2+</sup> riêng rẽ vào công thức đối chứng đã làm giảm tác động của mặn, làm tăng chiều cao cây, số lá, tỉ lệ chla/chlb, chỉ số huỳnh quang hữu hiệu, sự tích lũy chất khô, chiều dài, chiều rộng của quả cũng như số quả trên cây. Ngược lại làm giảm sự gia tăng của hàm lượng proline, mức độ rò rỉ ion qua màng, độ thiếu hụt bão hòa hơi nước, hàm lượng hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) và hàm lượng malondialdehyde (MDA). Công thức phối hợp giữa Ca<sup>2+</sup> và SA cho hiệu quả cao nhất ở đa số các chỉ tiêu nghiên cứu.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> và SA đến yếu tố cấu thành năng suất của giống đậu đũa cao sản số 4 trong điều kiện mặn nhân tạo**

Công thức	Số quả/cây	Chiều dài quả (cm)	Chiều rộng quả (mm)	Khối lượng quả (g)	Độ Brix
CT1 (NaCl)	5,40	51,13	4,41	9,32	4,82
CT2 (SA)	6,53	50,27	5,34	11,44	7,00
CT3 (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	7,47	56,50	6,90	11,63	5,90
CT4 (SA + (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ))	8,00	57,63	6,33	11,92	6,25
CV%	8,40	1,90	7,10	5,30	9,40
LSD 5%	1,15	2,06	0,82	1,39	1,25



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Mai Văn Chung (2013). Sử dụng chất kích kháng nguồn gốc hormon trong phòng trừ sâu hại cây trồng. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Nghệ An, 8: 25-27.
- Nguyễn Văn Bo, Nguyễn Thanh Tường, Nguyễn Bảo Vệ và Ngô Ngọc Hưng (2011). Ảnh hưởng của canxi đến khả năng sản sinh proline và sinh trưởng của cây lúa trên đất nhiễm mặn. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 18b: 203-211.
- Nguyễn Thị Phương Dung, Đào Thị Thủy, Trần Thị Thanh Huyền, Trần Anh Tuấn (2016). Một số chỉ tiêu sinh trưởng và giải phẫu của cây đậu đũa dưới tác động của salicylic acid trong điều kiện mặn. Báo cáo Khoa học về nghiên cứu và giảng dạy sinh học ở Việt Nam, Hội nghị Khoa học Toàn quốc lần thứ hai, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, tr. 170-180.
- Nguyễn Thị Phương Dung, Trần Anh Tuấn (2016). Ảnh hưởng của salicylic acid đến sinh trưởng của cây con dưa chuột trong điều kiện hạn. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 14(8): 1162-1170.
- Arnon. D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 24(1): 1-15.
- Bates L. B., Waldren R. P., Teare I. D (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Dong, C.J., X.L. Wang, Q.M. Shang (2011). Salicylic acid regulates sugar metabolism that confers tolerance to salinity stress in cucumber seedlings. *Scientia horticulturae*, 129(4): 629-636.
- Dionisio-Sese M.L., Tobita S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Scie.*, 135: 1-9.
- Feagley, S. E., L. B. Fenn. (1998). Using Soluble Calcium to Stimulate Plant Growth. Texas Agricultural Extension Service. The Texas A&M University System.
- Gill, S. S. and N. Tuteja (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Journal Plant signal and behavior*, 1: 26-33.
- Hayat Q., S.Hayat , M. Irfan , A. Ahmad (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 68: 14-25.
- Heath R.L. and Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125: 189-198.
- Jessup, W., R. T. Dean, J. M. Gebick (1994). Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. *Methods in Enzymology*, 233: 289-303.
- Jiang Y., B Huang (2001). Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *Journal of Experimental Botany*, 52(355): 341-349.
- Katsuhara, M., T. Otsuka, B. Ezaki (2005). Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 169(2): 369-373.
- Kaya, C., B. E. Ak, D. Higgs and B. Murillo-Amador (2002). Influence of foliar-applied calcium nitrate on strawberry plants grown under salt-stressed conditions. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(5): 631-636.
- Khan W., Prjirithivira B., Smith A. (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology*, 160(5): 485-492.
- Manaa, A., E. Gharbi, H. Mimounia, S. Wastia, S. Aschi-Smitia, S. Luttsb, H. B. Ahmeda (2014). Simultaneous application of salicylic acid and calcium improves salt tolerance in two contrasting tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar. *South African Journal of Botany*, 95: 32-39.
- Misra, N., P. Saxena (2009). Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Science*, 177(3): 18 -189.
- Munns, R. and M. Tester (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 1-812.
- Murillo-Amadora, B., H. G. Jonesb, C.Kayac, R. L. Aguilara, J.L.García-Hernández, E. T. Diéguez, N.Y. Á. Serranod, E. R.Puentee (2006). Effects of foliar application of calcium nitrate on growth and physiological attributes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 188-196.
- Pottosin, I., A. M. Velarde-Buendía, J. Bose, I. Zepeda-Jazo, S. Shabala, O. Dobrovinskaya (2014). Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses. *Journal of Experimental Botany*, 65(5): 1271-1283.
- Qadir, M., E. Quilléro, V. Nangia, G. Murtaza, M. Singh, R.J. Thomas, P. Drechsel and A.D. Noble (2014). Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Nat Resour Forum*, 38: 282-295.
- Rady, M. M. and G.F. Mohamed (2015). Modulation of salt stress effects on the growth, physiochemical

- attributes and yields of *Phaseolus vulgaris* L. plants by the combined application of salicylic acid and *Moringa oleifera* leaf extract. *Scientia Horticulturae*, 193: 105-113.
- Richardson A. D., Shane P. Duigan and Graeme P. Berlyn (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153: 185-194.
- Saxena, I., S. Srikanth and Z. Chen (2016). Cross Talk between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 7: 57.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T.A., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M., Newman, I.A. (2006). Extracellular Ca<sup>2+</sup> ameliorates NaCl-induced K<sup>+</sup> loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K<sup>+</sup> permeable channels. *Plant Physiology*, 141: 1653-1665.
- Shakara, M., M. Yaseena, R. Mahmoodb, I. Ahmad (2016). Calcium carbide induced ethylene modulate biochemical profile of *Cucumis sativus* at seed germination stage to alleviate salt stress. *Scientia Horticulturae*, 213: 179-185.
- Shi, Q., Z. Bao, Z. Zhu, Q. Ying, Q. Qian (2006). Effects of Different Treatments of Salicylic Acid on Heat Tolerance, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidant Enzyme Activity in Seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regulation*, 48(2): 127- 135.
- Tester, M. and R. Davenport (2003). Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Annals of Botany*, 91(5): 503-527.
- Tuteja, N. and S. Mahajan (2007). Calcium Signaling Network in Plants. *Plant Signaling & Behavior, Review*, 2: 79-85.
- Uddling, J., J. Gelang-Alfredsson, K. Piikki and H. Pleijel (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research*, 91(1): 37-46.
- Uozumi, N. and Julian I. Schroeder (2010). *Ion Channels and Plant Stress: Past, Present, and Future*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wasti, S., H. Mimouni, S. Smiti, E. Zid, and H. B. Ahmed (2012). Enhanced Salt Tolerance of Tomatoes by Exogenous Salicylic Acid Applied Through Rooting Medium. *A Journal of Integrative Biology*, 16(4): 200-207.
- Zhu J.K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biolog*, 6(5): 441-445.