

Bài báo nghiên cứu

ẢNH HƯỞNG CỦA NaCl LÊN SỰ NẢY MẦM CỦA HẠT GIỐNG CAM SÀNH (*Citrus nobilis* Lour.) TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY *IN VITRO*

Luong Thị Lệ Thơ*, Đỗ Thị Tuyết Hoa

Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Luong Thị Lệ Thơ – Email: tholt@hcmue.edu.vn

Ngày nhận bài: 31-5-2024; ngày nhận bài sửa: 10-7-2024; ngày duyệt đăng: 08-11-2024

TÓM TẮT

Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) là một trong các loại cây ăn quả đem lại giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Quả Cam sành chứa nhiều chất dinh dưỡng và các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học, qua đó giúp cải thiện sức đề kháng của cơ thể chống lại bệnh tật. Hiện nay, hạn mặn diễn ra ngày càng nhiều và phức tạp gây thiệt hại lớn cho việc trồng trọt ở các tỉnh miền Tây trong đó có ảnh hưởng đến việc trồng cây Cam sành. Nghiên cứu này đã khảo sát hiệu quả khử trùng của NaClO, HgCl₂ và ảnh hưởng của NaCl ở các nồng độ khác nhau lên sự nảy mầm của hạt giống Cam sành trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút, cho tỉ lệ mẫu sống cao nhất đạt 96,67%. Bên cạnh đó, sự nảy mầm của hạt Cam sành bị ảnh hưởng xấu bởi các nồng độ muối, nồng độ muối càng cao tỉ lệ nảy mầm càng giảm và thời gian hạt nảy mầm càng tăng so với nghiệm thức đối chứng. Đặc biệt, nồng độ NaCl 9 g/L làm hạt không có dấu hiệu nảy mầm.

Từ khóa: nảy mầm; HgCl₂; *in vitro*; Cam sành; NaCl; NaClO; khử trùng

1. Giới thiệu

Các loài cây trong chi *Citrus* (cây có múi) của họ Rutacea là cây ăn quả phổ biến, được trồng rộng rãi và có giá trị kinh tế quan trọng nhất trên thế giới (FAO, 2021). Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) là cây ăn quả quan trọng trong ngành trồng trọt ở nước ta (Nguyen et al., 2003). Bên cạnh giá trị kinh tế cao, quả Cam sành còn giàu chất dinh dưỡng (Czech et al., 2020), vitamin C (Bozonet & Carr, 2019), hesperidine (Bellavite & Donzelli, 2020), carotenoid, liminoid, các chất chống oxy hóa mạnh... giúp tăng sức đề kháng cho cơ thể chống lại nhiều loại bệnh tật (Carr & Frei, 1999; Luu et al., 2023).

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là vùng sản xuất cam quýt lớn nhất nước ta (Hoang, 2009) đã trải qua các đợt xâm nhập mặn nghiêm trọng, bất thường và được dự báo sẽ diễn biến xấu hơn trong những năm tiếp theo (National Agency for Science and Technology Information, 2016). Nguyên nhân do biến đổi khí hậu như nước biển dâng, tăng

Cite this article as: Luong Thi Le Tho, & Do Thi Tuyet Hoa (2024). Effects of NaCl on the germination of king mandarin seeds (*Citrus nobilis* Lour.) under *in vitro* culture condition. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 21(11), 2114-2125.

hiệt độ, khai thác nước ngầm quá mức để đáp ứng nhu cầu nước cho phát triển (Darnault & Godinez, 2008). Thành phần các ion khoáng gây mặn cho đất thường là Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , Al^{3+} ... trong đó, nguyên nhân gây mặn chủ yếu là muối NaCl (Nguyen, 2005). Xâm nhập mặn gây thiệt hại nặng nề đến năng suất cam quýt vì ion Cl^- đặc biệt độc đối với cây có múi (Khalid et al., 2022). Mặn ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng và quang hợp của thực vật do gây stress thẩm thấu, stress ion (Negrao et al., 2013) và tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) (Tsugane et al., 1999) làm rối loạn các quá trình sinh lí của cây (Fahad et al., 2015), tổn thương các sắc tố quang hợp, giảm tỉ lệ trao đổi khí, hoạt động của enzyme, hệ quả là giảm năng suất và sinh khối của thực vật (Martínez-Cuenca et al., 2021).

Như vậy, cần phát triển các chiến lược phù hợp để cứu mặn cho cây. Các chất bảo vệ ngoại sinh như chất bảo vệ thẩm thấu, phytohormone, phân tử tín hiệu, polyamine, chất chống oxy hóa và các nguyên tố vi lượng khác nhau đã được chứng minh có hiệu quả giảm thiểu thiệt hại do muối gây ra cho thực vật, giúp cải thiện sự tăng trưởng, năng suất và tăng khả năng chống chịu với stress mặn của cây trồng (Hasanuzzaman et al., 2013). Tuy nhiên, khi thiệt hại do nồng độ muối với thực vật cao hơn tác động phục hồi của các chất bảo vệ ngoại sinh, cây trồng cũng không thể sinh trưởng tốt. Sự nảy mầm của hạt có thể xem là bắt đầu của quá trình sinh trưởng, phát triển của cây (Hoang, 2006), quyết định khả năng thành lập cây và năng suất của cây trồng (Hasanuzzaman et al., 2013). Chính vì vậy việc xác định ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sự nảy mầm của hạt trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* là cần thiết.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu cơ bản của công nghệ sinh học thực vật (Gamborg, 2002; Nguyen, 2022). Quá trình khử trùng giúp loại bỏ vi sinh vật khỏi mẫu cây rất quan trọng, vừa phải giúp loại bỏ tất cả các vi sinh vật có thể dễ dàng phát triển trên mô vừa đảm bảo sự tồn tại và khả năng tái tạo của mô (Yildiz & Er, 2002). Vì thế việc khử trùng bề mặt không thành công sẽ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của mẫu vật. Trong đó, NaClO và HgCl_2 là những hợp chất được sử dụng rộng rãi với nồng độ và thời gian cho phép (Ngo, 2009) để khử trùng mẫu.

Nghiên cứu này đã khảo sát ảnh hưởng của NaClO , HgCl_2 đến sự sống của hạt Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trong điều kiện *in vitro* nhằm xác định được công thức khử trùng phù hợp cho hạt Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.). Đồng thời khảo sát ảnh hưởng của NaCl ở các nồng độ khác nhau lên sự nảy mầm của hạt giống Cam sành trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* với mong muốn tìm ra nồng độ NaCl gây ảnh hưởng nặng nề đến sự sinh trưởng của cây Cam sành *in vitro*, từ đó có cơ sở khoa học để áp dụng phương pháp cứu mặn phù hợp cho quy trình trồng cây Cam sành ở những vùng đất bị xâm nhập mặn.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống cây Cam sành *Citrus nobilis* Lour. được cung cấp từ vườn cam của ông Trần Văn Sa, địa chỉ Số nhà 1554, ấp Hóa Thành 1, xã Đông Thành, thị xã Bình Minh, thành phố Vĩnh Long.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thử tính sống của hạt Cam sành

Hạt được đánh thức phôi bằng cách ngâm trong nước 24 giờ. Sau đó, bóc vỏ hạt và ngâm hạt trong dung dịch carmin indigo, đây là loại thuốc nhuộm chi xâm nhập vào các mô chết, không xâm nhập các mô sống (Neljubow, 1925). Sau 2 giờ cắt dọc hạt ngang qua phần phôi, quan sát sự bắt màu của phôi hạt. Đếm số hạt không bắt màu từ đó tính % tính sống của phôi (Rostvtsev & Lyubich, 1978). Thí nghiệm lặp lại 4 lần, mỗi lần 30 hạt.

2.2.2. Phương pháp khử trùng hạt giống Cam sành với NaClO và HgCl₂ ở các nồng độ và thời gian khác nhau

Hạt Cam sành được khử trùng bên ngoài tử cây với quy trình sau: lắc mẫu bằng xà phòng loãng 1% và rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng, sau đó, chuyển mẫu vào cốc và đặt vào bên trong tử cây.

Khử trùng trong tử cây với quy trình sau: lắc mẫu trong dung dịch khử trùng NaClO 25%, NaClO 50%, HgCl₂ 0,1% (thời gian: 1 phút, 3 phút, 5 phút); tiếp tục rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng; sau đó, cấy mẫu vào ống nghiệm có đường kính 22 mm, dài 20 cm, chứa 10 mL môi trường nuôi cấy MS.

Mỗi nghiệm thức tiến hành 10 ống nghiệm, 1 hạt Cam/ống nghiệm, lặp lại 3 lần.

Theo dõi tỉ lệ mẫu nhiễm và mẫu sống của từng nghiệm thức sau 60 ngày.

2.2.3. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của NaCl đến khả năng nảy mầm của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* L.) trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

Hạt giống Cam sành sau khi được khử trùng với nghiệm thức phù hợp được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau: 0 (đối chứng), 1, 3, 5, 7 và 9 g/L. Theo dõi về tỉ lệ nảy mầm sau 7, 14 và 20 ngày nuôi cấy.

Tỉ lệ nảy mầm = (số hạt nảy mầm/ tổng số hạt)*100.

Mỗi nghiệm thức tiến hành 10 ống nghiệm, 1 hạt Cam/ống nghiệm, lặp lại 3 lần.

2.2.4. Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các nghiệm thức nuôi cấy đều được thực hiện ở điều kiện chiếu sáng 2500 ± 500 lux, độ ẩm 60% ± 5% và nhiệt độ 28⁰C ± 2⁰C trong 12 giờ mỗi ngày.

2.2.5. Phương pháp xử lí số liệu

Tất cả số liệu của nghiên cứu sử dụng các thuật toán xác suất thống kê bằng phần mềm phần mềm SPSS phiên bản 26 dùng cho Windows. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất $P \leq 0,05$ (P: probability) của giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau, được kiểm định bằng phân tích phương sai một yếu tố (ONEWAY ANOVA).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tính sống của hạt

Hạt Cam sành sau khi rạch vỏ được ngâm nước để đánh thức phôi, sau đó bóc bỏ hạt và vỏ áo, đặt trên các đĩa petri có chứa dung dịch carmine indigo 0,2%. Sau 2 giờ quan sát

thấy phôi của tất cả các hạt đều không bắt màu với thuốc nhuộm. Chúng tỏ tỉ lệ sống của hạt đạt 100% (Rostvtsev & Lyubich, 1978).

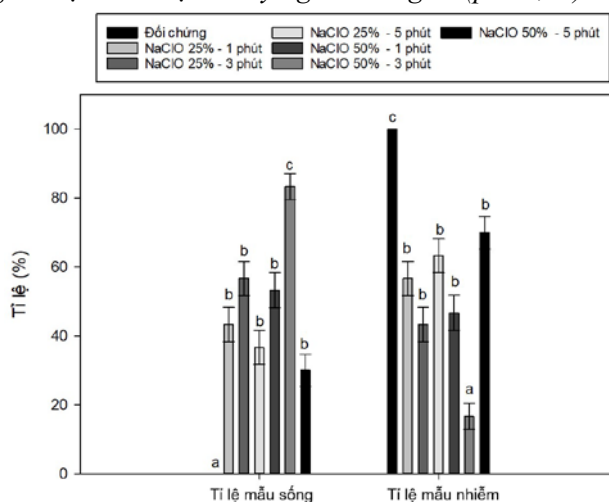
3.2. Kết quả khử trùng hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) với dung dịch NaClO ở các nồng độ và thời gian khác nhau

Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả nghiệm thức khử trùng hạt Cam sành bằng dung dịch NaClO ở các nồng độ và thời gian khác nhau cho thấy tỉ lệ mẫu nhiễm thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng. Đặc biệt, ở nghiệm thức 5 khi khử trùng hạt giống Cam với NaClO nồng độ 50% trong thời gian 3 phút có tỉ lệ mẫu sống cao nhất đạt 83,33% và tỉ lệ mẫu nhiễm thấp nhất đạt 16,67%. Kết quả trên đều có sự khác biệt về thống kê so với nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức còn lại (Bảng 1, Hình 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của NaClO ở các nồng độ và thời gian khác nhau đến sự sống của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trong điều kiện nuôi cấy in vitro

Nghiệm thức	Dung dịch khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Tỉ lệ mẫu sống (%)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)
ĐC	0	0	0	0,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^c
NT1	NaClO	25	1	43,33 ± 0,50 ^b	56,67 ± 0,50 ^b
NT2			3	56,67 ± 0,50 ^b	43,33 ± 0,50 ^b
NT3			5	36,67 ± 0,49 ^b	63,33 ± 0,49 ^b
NT4		50	1	53,33 ± 0,51 ^b	46,67 ± 0,51 ^b
NT5			3	83,33 ± 0,38 ^c	16,67 ± 0,38 ^a
NT6			5	30,00 ± 0,47 ^b	70,00 ± 0,47 ^b

Số liệu trình bày dưới dạng Mean ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái a, b, c, d, e, f trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 1. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của NaClO ở các nồng độ và thời gian khác nhau đến sự sống của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trong điều kiện nuôi cấy in vitro

Các chữ cái a, b, c, d, e, f chỉ sự khác biệt về tỉ lệ này mầm ở các nghiệm thức bổ sung GA₃ ở các nồng độ khác nhau ở mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

NaClO có hiệu quả khử trùng cao đối với tất cả các loại vi khuẩn và nấm vì là hóa chất có đặc tính oxy hóa mạnh với các amino acid, acid nucleic... (Yildiz et al., 2012). Tuy nhiên, với nồng độ cao và thời gian khử trùng kéo dài, dung dịch NaClO có thể xâm nhập vào bên trong và gây độc khiến mẫu bị chết (Yildiz et al., 2012). Ngoài ra, hiệu quả khử trùng của NaClO còn phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tác dụng (Ngo, 2009).

Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu, nghiệm thức khử trùng bằng dung dịch NaClO nồng độ 25% còn thấp và thời gian khử trùng mẫu chưa thích hợp. Nghiệm thức khử trùng bằng dung dịch NaClO nồng độ 50% với thời gian ngắn 1 phút hiệu quả khử trùng cũng không cao, ngược lại thời gian 5 phút là quá dài sẽ gây độc cho hạt nên ở tất cả các nghiệm thức NT1, NT2, NT3, NT4, NT6 tỉ lệ mẫu nhiễm khá cao từ 43% trở lên. Với nghiệm thức 5 hạt Cam sành được khử trùng bằng dung dịch NaClO 50% trong thời gian 3 phút cho hiệu quả khử trùng cao nhất (Bảng 1, Hình 1).

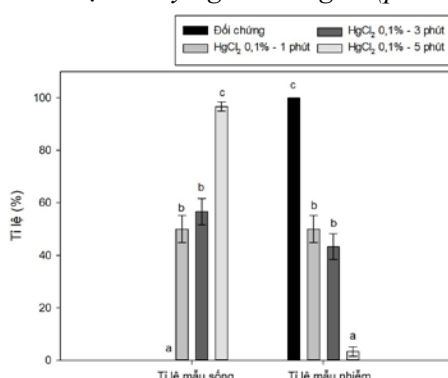
3.3. Kết quả khử trùng hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) với dung dịch HgCl₂ ở các nồng độ và thời gian khác nhau

Sau 60 ngày nuôi cấy, ở các nghiệm thức được khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ cho tỉ lệ mẫu nhiễm thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng, có khác biệt về mặt thống kê so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 2, Hình 2). Đặc biệt, nghiệm thức được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1 % trong 5 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất với tỉ lệ mẫu sống đạt 96, 67%, tỉ lệ mẫu nhiễm đạt 3,33 % (Bảng 2, Hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của HgCl₂ ở các nồng độ và thời gian khác nhau đến sự sống của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trong điều kiện nuôi cấy in vitro

Nghiệm thức	Dung dịch khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Tỉ lệ mẫu sống (%)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)
ĐC	0	0	0	0,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^c
NT7			1	50,00 ± 0,51 ^b	50,00 ± 0,51 ^b
NT8	HgCl ₂	0,1%	3	56,67 ± 0,50 ^b	43,33 ± 0,50 ^b
NT9			5	96,67 ± 0,18 ^c	3,33 ± 0,18 ^a

Số liệu trình bày dưới dạng Mean ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái a, b, c, d, e, f trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt mức ý nghĩa thống kê (p < 0,05).



Hình 2. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của HgCl₂ ở các nồng độ và thời gian khác nhau đến sự sống của hạt Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trong điều kiện nuôi cấy in vitro.

Các chữ cái a, b, c, d, e, f chỉ sự khác biệt về tỉ lệ nảy mầm ở các nghiệm thức bổ sung GA₃ ở các nồng độ khác nhau ở mức ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Ngoài NaClO, HgCl₂ cũng được sử dụng để khảo sát khả năng khử trùng mẫu cây nhờ khả năng khử trùng mạnh, hiệu quả cao, được cho phép sử dụng phổ biến trong nuôi cấy *in vitro*. Tùy thuộc vào loài mà sử dụng dung dịch NaClO hoặc HgCl₂ sẽ cho hiệu quả khử trùng cao hơn. Nghiên cứu của Iqbal và cộng sự cũng cho thấy rằng các mẫu cây *in vitro* của *Citrus jambhiri* Lush được khử trùng bằng HgCl₂ hiệu quả hơn NaClO thể hiện ở tỉ lệ sống sót của mẫu cây cao hơn (Iqbal et al., 2022). Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu, hạt Cam sành *Citrus nobilis* Lour. cho kết quả khử trùng đạt cao nhất ở nghiệm thức NT9 với nồng độ HgCl₂ 0,1%, thời gian khử trùng 5 phút. Đây là thời gian và nồng độ cho phép. Marak và Lask (2010) cũng sử dụng dung dịch HgCl₂ nồng độ 0,1% để khử trùng các mẫu hạt *Citrus indica* Tanaka, *Citrus macroptera* Montr, *Citrus maxima* Merrill, *Citrus aurantifolia* Swingle, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck và *Citrus reticulata* Blanco trong 5 phút (Marak & Lask, 2010).

Từ các kết quả trên cho thấy, hạt Cam sành *Citrus nobilis* Lour. được khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ cho hiệu quả khử trùng tốt hơn khi khử trùng bằng dung dịch NaClO. Chính vì vậy, nồng độ và thời gian khử trùng của NT9 được lựa chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo về ảnh hưởng của NaCl ở các nồng độ khác nhau đến sự nảy mầm của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) *in vitro*.

3.4. Ảnh hưởng của NaCl ở các nồng độ khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) *in vitro*

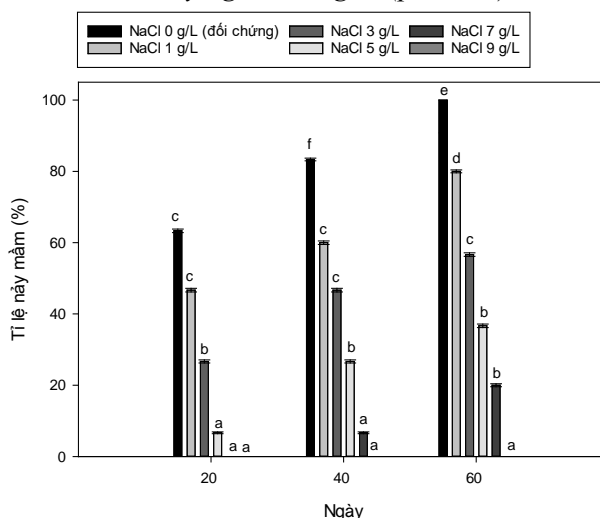
Kết quả sau 20 ngày nuôi cấy cho thấy, sự nảy mầm của hạt Cam sành *in vitro* đều bị kiềm hãm bởi NaCl ở các nồng độ khác nhau, thể hiện qua tỉ lệ nảy mầm cao nhất ở nghiệm thức đối chứng với nồng độ NaCl là 0 g/L và giảm theo chiều tăng nồng độ NaCl từ 1 g/L đến 9 g/L. Ngược lại, thời gian nảy mầm càng kéo dài ở các nghiệm thức có NaCl càng cao (Bảng 3, Hình 3, 4, 5 và 6).

Trong đó, ở nghiệm thức bổ sung NaCl 1 g/L, hạt ít bị ảnh hưởng bởi NaCl nên tỉ lệ nảy mầm khá cao, đạt 46,67% sau 7 ngày nuôi cấy và không có sự khác biệt về mặt thống kê so với nghiệm thức đối chứng, sau đó tỉ lệ nảy mầm tăng dần và đạt 80% sau 20 ngày nuôi cấy, cây con phát triển tốt. Ở nghiệm thức bổ sung NaCl 3 g/L, hạt giống Cam sành bắt đầu bị ảnh hưởng bởi nồng độ NaCl nên sau 7 ngày nuôi cấy, tỉ lệ nảy mầm chỉ đạt 26,67% và sau 20 ngày nuôi cấy chỉ đạt 56,67%. Cây con phát triển yếu, lá có màu xanh nhạt. Ở nghiệm thức bổ sung NaCl 5 g/L, tỉ lệ nảy mầm của hạt giảm mạnh, tỉ lệ nảy mầm chỉ đạt 36,67% sau 20 ngày nuôi cấy do chịu ảnh hưởng của nồng độ muối cao. Hạt nảy mầm chỉ ra rễ. Ở nghiệm thức bổ sung NaCl 7 g/L, sau 7 ngày nuôi cấy, hạt không có dấu hiệu nảy mầm, sau 14 ngày nuôi cấy, tỉ lệ nảy mầm chỉ đạt 6,67% và 20% sau 20 ngày nuôi cấy. Đặc biệt, ở nghiệm thức bổ sung NaCl 9 g/L, hạt không có dấu hiệu nảy mầm sau 20 ngày nuôi cấy do nồng độ NaCl quá cao. Các kết quả đều có sự khác biệt về mặt thống kê so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 3, Hình 3, 4, 5 và 6).

Bảng 3. Ảnh hưởng của NaCl đến khả năng nảy mầm của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* sau 20 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ NaCl (g/L)	Tỉ lệ nảy mầm (%)		
		Ngày 7	Ngày 14	Ngày 20
ĐC _N	0	63,33 ± 0,49 ^{cx}	83,33 ± 0,38 ^{dy}	100,00 ± 0,00 ^{ez}
NT10	1	46,67 ± 0,51 ^{cx}	60,00 ± 0,50 ^{cy}	80,00 ± 0,41 ^{dz}
NT11	3	26,67 ± 0,45 ^{bx}	46,67 ± 0,51 ^{cy}	56,67 ± 0,50 ^{cz}
NT12	5	6,67 ± 0,25 ^{ax}	26,67 ± 0,45 ^{by}	36,67 ± 0,49 ^{bz}
NT13	7	0,00 ± 0,00 ^{ax}	6,67 ± 0,25 ^{ay}	20,00 ± 0,41 ^{bz}
NT14	9	0,00 ± 0,00 ^{ax}	0,00 ± 0,00 ^{ax}	0,00 ± 0,00 ^{ax}

Số liệu trình bày dưới dạng Mean ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái a, b, c, d, e, f trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các chữ cái x, y, z trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt về tỉ lệ nảy mầm theo các giai đoạn của từng nghiệm thức bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau ở mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

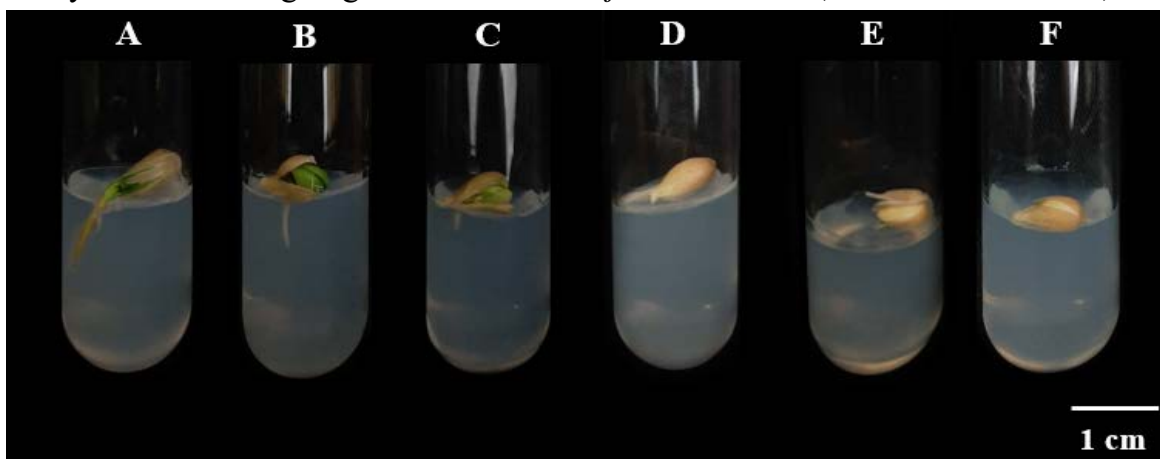


Hình 3. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của NaCl ở các nồng độ khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) *in vitro* 20 ngày nuôi cấy.

Các chữ cái a, b, c, d, e, f chỉ sự khác biệt về tỉ lệ nảy mầm ở các nghiệm thức bổ sung GA_3 ở các nồng độ khác nhau ở mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

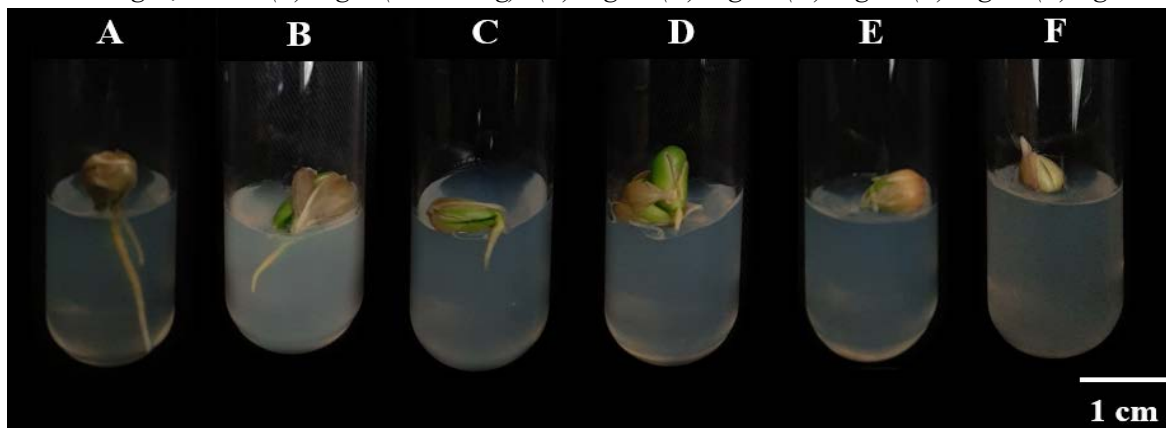
Stress mặn gây rối loạn cân bằng nước trong quá trình sinh trưởng, gây hạn chế sự sinh trưởng của cây (Akita & Cabuslay, 1986). Khả năng chịu mặn ở mỗi loài cây trồng rất khác nhau, thậm chí trong cùng một loài, các giống khác nhau cũng có một ngưỡng chịu mặn riêng biệt (Bui, 2002). Trong quá trình nảy mầm hạt cần hút nước để kích thích enzyme hô hấp hoạt động mạnh, tăng cường quá trình phân giải các chất trong phôi nhũ nhằm tạo đủ năng lượng cho sự phát triển phôi thúc đẩy quá trình nảy mầm (Hoang, 2006). Do đó, khi gặp điều kiện stress mặn làm cho áp suất thẩm thấu của hạt thấp hơn áp suất thẩm thấu của môi trường sẽ cản trở sự trương nước của hạt, gây độc cho hạt, ảnh hưởng đến các quá trình tổng hợp và chuyển hoá các chất trong hạt (Khan & Weber, 2008; Xu et al., 2011). Do đó tỉ lệ và thời gian nảy mầm của hạt bị ảnh hưởng xấu dưới tác động của muối trong môi trường

(Van Zelm et al., 2020). Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu thu được, khi tăng nồng độ NaCl từ 1 g/L đến 9 g/L vào môi trường nuôi cấy đều làm hạt giống Cam sành giảm dần khả năng nảy mầm và kéo dài thời gian nảy mầm. Kết quả tương tự với kết quả nghiên cứu của Azevedo Neto và cộng sự (2006), tỉ lệ nảy mầm, thời gian nảy mầm của hạt và nồng độ muối NaCl tỉ lệ nghịch với nhau (Azevedo Neto et al., 2006). Với sự gia tăng nồng độ muối trong môi trường MS, Kaushal và cộng sự cũng đã quan sát thấy sự giảm đáng kể về tỉ lệ nảy mầm của hạt giống chanh thô *Citrus jambhiri* Lush (Kaushal et al., 2013).



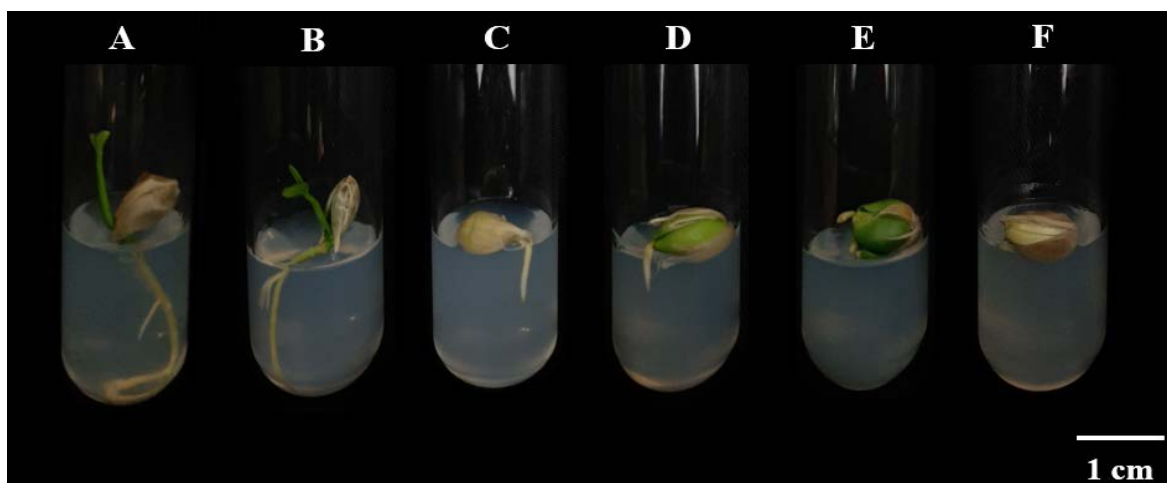
Hình 4. Sự nảy mầm của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trên môi trường MS có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau sau 7 ngày nuôi cấy in vitro.

Nồng độ NaCl: (A) 0 g/L (đối chứng); (B) 1 g/L; (C) 3 g/L; (D) 5 g/L; (E) 7 g/L; (F) 9g/L.



Hình 5. Sự nảy mầm của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trên môi trường MS có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy in vitro.

Nồng độ NaCl: (A) 0 g/L (đối chứng); (B) 1 g/L; (C) 3 g/L; (D) 5 g/L; (E) 7 g/L; (F) 9g/L.



Hình 6. Sự nảy mầm của hạt giống Cam sành (*Citrus nobilis* Lour.) trên môi trường MS có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau sau 20 ngày nuôi cấy *in vitro*.
Nồng độ NaCl: (A) 0 g/L (đối chứng); (B) 1 g/L; (C) 3 g/L; (D) 5 g/L; (E) 7 g/L; (F) 9 g/L.

4. Kết luận

NaClO và HgCl₂ đều có tác dụng khử trùng Hạt Cam sành *Citrus nobilis* Lour. trong nuôi cấy *in vitro* tốt hơn so với nghiệm thức đối chứng.

Hạt giống Cam sành được khử trùng với NaClO nồng độ 50% trong thời gian 3 phút cho tỉ lệ mẫu sống đạt 83,33%.

Hạt giống Cam sành được khử trùng với HgCl₂ nồng độ 0,1% trong thời gian 5 phút cho tỉ lệ mẫu sống đạt 96,67%.

Hạt giống Cam sành *Citrus nobilis* Lour. khi nuôi cấy *in vitro* trong môi trường stress mặn, sự nảy mầm chậm dần theo chiều tăng của nồng độ NaCl. Ở nồng độ NaCl 1 g/L sự nảy mầm của hạt Cam sành *Citrus nobilis* Lour. *in vitro* ít bị ảnh hưởng, ở nồng độ NaCl 3g/L và 5 g/L, hạt nảy mầm ít cùng với thời gian nảy mầm kéo dài, nồng độ NaCl 7g/L, hạt nảy mầm rất ít và nồng độ NaCl 9 g/L hạt Cam không có dấu hiệu nảy mầm.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akita, S., & Cabuslay, G. S. (1990). Physiological basis of differential response to salinity in rice cultivars. *Genetic aspects of plant mineral nutrition*, 42, 431-448.
- Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C. E. B., & Gomes-Filho, E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56(1), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.01.008>

- Bellavite, P., & Donzelli, A. (2020). Hesperidin and SARS-CoV-2: New light on the healthy function of citrus fruits. *Antioxidants*, 9(8), 742. <https://doi.org/10.3390/antiox9080742>
- Bozonet, S. M., & Carr, A. C. (2019). The role of physiological vitamin C concentrations on key functions of neutrophils isolated from healthy individuals. *Nutrients*, 11(6), 1363. <https://doi.org/10.3390/nu11061363>
- Bui, T. V. (2002). Sinh lý thực vật đại cương, phần II: phát triển [Plant physiology, Part II: Development]. *Ho Chi Minh City National University Publishing House*.
- Carr, A. C., & Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 69(6), 1086-1107.
- Czech, A., Zarycka, E., Yanovych, D., Zasadna, Z., Grzegorzcyk, I., & Kłys, S. (2020). Mineral content of the pulp and peel of various citrus fruit cultivars. *Biological Trace Element Research*, 193, 555-563. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01727-1>
- Darnault & Godinez. (2008). "Saltwater intrusion and climate change". http://www.gov.pe.ca/photos/original/cle_WA1.pdf
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M., Khan, M. R., Tarren, A. K., Khan, A., Ullah, A., Ullah, N., & Huang, J. (2015). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant growth regulation*, 75, 391-404. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0013-y>
- FAO. (2021). Citrus fruit fresh and processed statistical bullet in 2020.
- Gamborg, O. L. (2002). Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38, 84-92. doi: 10.1079/IVP2001281
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2013). Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*, 25-87. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4747-4_2
- Hoang, M. T. (2006). Giao trình Sinh lý thực vật [Plant physiology]. *Ho Chi Minh City National University Publishing House*.
- Hoang, N. T. (2009). Kỹ thuật chọn tạo và trồng cây cam quýt phẩm chất tốt, năng suất cao [Techniques for selecting and growing citrus trees of good quality and high yield]. *Agricultural Publishing House*.
- Iqbal, M., Bakshi, P., Iqbal, M., & Iqbal, M. (2022). 8.7 Standardization of Surface Sterilization Chemicals for Leaf, Root, and Epicotyl Explant Cultures of *Citrus jambhiri* Lush. *Sustainable Agricultural Innovations for Resilient Agri-Food Systems*, 388.
- Kaushal, M., Kumar, L., Gill, M. I. S., Choudhary, O. P., & Bali, S. K. (2013). Effect of salinity on survival and growth performance of *in vitro* grown rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) seeds. *Indian Journal of Biotechnology*, 12, 284-286.
- Khalid, M. F., Morillon, R., Anjum, M. A., Ejaz, S., Rao, M. J., Ahmad, S., & Hussain, S. (2022). Volkamer lemon tetraploid rootstock transmits the salt tolerance when grafted with diploid kinnow mandarin by strong antioxidant defense mechanism and efficient osmotic adjustment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(3), 1125-1137. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10367-6>

- Khan, M. A., & Weber, D. J. (Eds.). (2006). Ecophysiology of high salinity tolerant plants (Vol. 40). *Springer Science & Business Media*.
- Luu, M. C., Bui, T. N. B., Thai, D. N. D., Tran, T. A., Nguyen, H. A. T., Doan, T. K. T., Tran, T. G., Tran, B. L., Huynh, X. P., & Nguyen, N. T. (2023). Xác định hàm lượng phenolic, flavonoid và khả năng chống oxy hóa của quả cam sành (*Citrus nobilis*) [Determination of phenolic, flavonoid content and antioxidant capacity of orange fruit (*Citrus nobilis*)]. *TNU Journal of Science and Technology*, 228(13), 374-382. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8474>
- Marak, C. K., & Laskar, M. A. (2010). Analysis of phenetic relationship between *Citrus indica* Tanaka and a few commercially important citrus species by ISSR markers. *Scientia horticulturae*, 124(3), 345-348. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.014>
- Martínez-Cuenca, M. R., Primo-Capella, A., & Forner-Giner, M. A. (2021). Screening of 'King' mandarin (*Citrus nobilis* Lour) × *Poncirus trifoliata* ((L.) Raf.) hybrids as salt stress-tolerant citrus rootstocks. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 62, 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.038>
- National Agency for Science and Technology Information. (2016). Xâm nhập mặn tại đồng bằng sông Cửu Long: Nguyên nhân, tác động và các giải pháp ứng phó [Salinity intrusion in the Mekong Delta: Causes, impacts and response solutions].
- Negrao, S., Courtois, B., Ahmadi, N., Abreu, I., Saibo, N., & Oliveira, M. M. (2011). Recent updates on salinity stress in rice: from physiological to molecular responses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(4), 329-377. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.587725>
- Neljubow, D. (1925). Ueber die Methoden der Bestimmung der Keimfähigkeit ohne Keimprüfung. *Annales d'essais de semences, Leningrad*, 7, 7.
- Ngo, X. B. (2009). Nuôi cấy mô tế bào thực vật. Cơ sở lý luận và ứng dụng [Plant tissue culture. Theoretical basis and applications]. *Science and Technics Publishing House*.
- Nguyen, H. D. (2003). Cây ăn quả có múi (cam, chanh, quýt, bưởi) [*Citrus* fruit trees (oranges, lemons, tangerines, grapefruits)]. *Nghe An Publishing House*.
- Nguyen, K. T. (2005). Giáo trình Sinh lý thực vật [Plant physiology]. *Ha Noi Publishing House*.
- Nguyen, T. K. L. (18/09/2022). Vinh Phuc: Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm bảo tồn và phát triển các nguồn gen thực vật có giá trị [Vinh Phuc: Applying plant tissue culture to preserve and develop valuable plant genetic resources]. Retrieved May 17, 2024, from <https://bom.so/zYF9IT>
- Rostovtsev, S. A., S A, R., & ES, L. (1978). Determination of the viability of tree and shrub seeds by staining with indigocarmine in the USSR. *Seed science and Technology*; nor; da, 6(3), 869-875; abs. Fre/ger; bibl. 11 ref
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., & Kobayashi, H. (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 11(7), 1195-1206. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1195>
- Van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. (2020). Salt tolerance mechanisms of plants. *Annual review of plant biology*, 71, 403-433. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005>

- Xu, S., Hu, B., He, Z., Ma, F., Feng, J., Shen, W., & Yang, J. (2011). Enhancement of salinity tolerance during rice seed germination by presoaking with hemoglobin. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2488-2501. <https://doi.org/10.3390/ijms12042488>
- Yildiz, M., & Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften*, 89, 259-261. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0310-6>
- Yildiz, M., Fatih Ozcan, S., T Kahramanogullari, C., & Tuna, E. (2012). The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and *in vitro* regeneration capacity of the tissue. *The Natural Products Journal*, 2(4), 328-331. <https://doi.org/10.2174/2210315511202040328>

**EFFECTS OF NaCl ON THE GERMINATION OF KING MANDARIN SEEDS
(*Citrus nobilis* Lour.) UNDER IN VITRO CULTURE CONDITION**

Luong Thi Le Tho^{*}, Do Thi Tuyet Hoa

Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam

**Corresponding author: Luong Thi Le Tho – Email: tholt@hcmue.edu.vn*

Received: May 31, 2024; Revised: July 10, 2024; Accepted: November 08, 2024

ABSTRACT

Citrus nobilis Lour. is one of the fruit trees that brings high nutritional and economic value. King mandarin contain many nutrients and biologically active natural compounds, thereby helping to improve the body's resistance against diseases. Currently, drought and saltwater intrusion are becoming more frequent and complicated, causing great damage to cultivation in the Western provinces, including affecting the cultivation of Saffron Orange trees. This study investigated the disinfection effectiveness of NaClO, HgCl₂ and the effect of NaCl at different concentrations on the germination of Saffron Orange seeds under *in vitro* culture conditions. The results showed that 0.1% HgCl₂ for 5 minutes gave the highest survival rate of 96.67%. Besides, the germination of King Mandarin seeds was negatively affected by salt concentrations. The higher the salt concentration, the lower the germination rate and the longer the seed germination time compared to the control treatment. In particular, the NaCl concentration of 9 g/L caused the seeds to show no signs of germination.

Keywords: germination; *in vitro*; king mandarin; Mercuric chloride; NaCl; Natri hypochlorite; sterilize