

Nghiên cứu nồng độ đường gây hạn và động thái enzym amylaza, proteaza trong quá trình nảy mầm của một số giống đậu tương khi gặp stress hạn

Nguyễn Thị Thao*, Trần Khánh Vân

Khoa Sinh, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định nồng độ đường sacaroza gây hạn nhân tạo và phân nhóm chịu hạn của 5 giống đậu tương DT2008, DT51, DT99, DT26, DT2003 thông qua các chỉ tiêu nghiên cứu: số hạt nảy mầm, chiều dài mầm, hoạt độ enzym amylaza. Kết quả thu được cho thấy chúng tôi đã xác định là nồng độ đường sacaroza 6% có ảnh hưởng rõ ràng đến các chỉ tiêu nghiên cứu khi kéo dài thời gian gây hạn và chọn 3 giống đậu tương DT2008, DT2003, DT99 tương ứng với mức chịu hạn tốt, trung bình, kém để theo dõi động thái hoạt độ enzym amylaza, enzym proteaza trong điều kiện hạn. Kết quả chứng tỏ rằng tăng hoạt độ enzym amylaza có thể là một phản ứng không đặc trưng của đậu tương trong điều kiện hạn. Sự tăng hoạt độ proteaza có thể là một loại phản ứng đặc trưng.

Từ khóa: Đậu tương, nảy mầm, amylaza, proteaza, phản ứng đặc trưng, hạn.

1. Mở đầu

Đậu tương là cây trồng được trồng nhiều thứ ba trên thế giới và là nguồn dầu thực vật quan trọng nhất, nguồn protein cho con người. Tuy nhiên năng suất đậu tương bị hạn chế bởi những ảnh hưởng về môi trường, đặc biệt là hạn hán. Chúng ta đã có nhiều những nghiên cứu sâu tìm hiểu về các cơ chế chống chịu của thực vật nói chung. Riêng với cây đậu tương, có rất nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của hạn đến từng giai đoạn sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây [1-2]. Từ đó tìm ra được những cơ chế giúp cây đậu tương chống

chịu được với stress hạn như vai trò của các enzym (amylaza, proteaza, catalaza, SOD,...) [3-4], các chất làm thay đổi tính thấm của màng tế bào (prolin, glyxinbetalin,...), các hooc môn sinh trưởng (auxin,...) [5], vai trò của hệ rễ [6-7], vai trò của quang hợp,... thậm trí xác định được các gen cụ thể điều khiển các cơ chế chống chịu của cây [8-9]. Nhưng một vấn đề đặt ra là: trong những cơ chế giúp cho thực vật chống chịu được stress môi trường thì những cơ chế nào là phản ứng đặc trưng và những cơ chế nào là phản ứng không đặc trưng. Vì đối với thực vật nói chung, cây đậu tương nói riêng khi chịu tác động của môi trường trong khoảng thời gian ngắn với cường độ lớn thường trả lời bằng các phản ứng không đặc trưng. Còn khi thực vật chịu tác động stress môi trường chậm, kéo dài

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-986983288.

Email: nguyenthao210188@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4597>

dẫn tới hình thành các quá trình thích nghi đặc thù, đảm bảo cho hoạt động ổn định của các quá trình sinh lý bên trong ở điều kiện stress môi trường. Nếu như có sự phối hợp giữa hai kiểu phản ứng không đặc trưng và đặc trưng trong một cơ thể thực vật thì chúng có lợi thế đấu tranh sinh tồn. Đây là một vấn đề cần được đi sâu nghiên cứu và giải quyết cấp bách nhưng lại chưa có nhiều nghiên cứu làm sáng tỏ để tạo cơ sở cho việc chọn giống, tạo giống cây trồng chuyển gen chống chịu stress môi trường đạt được kết quả như mong muốn, đảm bảo an ninh lương thực quốc gia và trên thế giới.

Để giải quyết vấn đề đã đặt ra, chúng tôi tiến hành bố trí thí nghiệm “Nghiên cứu nồng độ đường gây hạn và động thái enzym amylaza, proteaza trong quá trình nảy mầm của một số giống đậu tương khi gặp stress hạn” để làm rõ hơn vai trò của enzym amylaza và enzym proteaza. Vì trong quá trình nảy mầm của hạt đậu tương, các nghiên cứu đã cho thấy rằng enzym amylaza và enzym proteaza có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất giúp cho hạt chuyển từ trạng thái ngủ nghỉ sang trạng thái mới. Đặc biệt trong điều kiện stress môi trường hạn, hoạt động của hai enzym này tạo sản phẩm làm thay đổi tính thấm của màng tế bào, từ đó làm tăng khả năng chống chịu hạn của cây. Kết quả nghiên cứu là cơ sở xác định loại phản ứng không đặc trưng và đặc trưng trong quá trình nảy mầm của hạt.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm và vật liệu nghiên cứu

Thí nghiệm được bố trí và các chỉ tiêu nghiên cứu được xác định tại phòng thí nghiệm bộ môn Sinh lý học Thực vật và Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội.

Các giống đậu tương nghiên cứu: DT2008, DT99, DT2003, DT 26, DT51 do Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Dung dịch đường sacaroza gây hạn được pha ở các nồng độ 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% và đối chứng 0%. Mỗi nồng độ tương ứng với một công thức (CT) thí nghiệm: CT 0%, CT 2%, CT 4%, CT 6%, CT 8%, CT 10%. Chúng tôi gieo hạt vào các khay nhựa (20cm x25cm) có lót giấy thấm gấp nếp thành 10 hàng trong mỗi khay. Mỗi giống đậu tương được gieo trong hai hàng, mỗi hàng 15 hạt cách đều nhau. Mỗi khay tương ứng với một công thức. Mỗi công thức được lặp lại 3 lần. Sau 2, 4, 6 ngày gieo hạt, chúng tôi xác định các chỉ tiêu nghiên cứu:

- Số hạt nảy mầm: Những hạt nảy mầm là những hạt có chiều dài rễ mầm đạt từ 3mm trở lên.

- Chiều dài mầm, dùng thước chia đến mm đo chiều dài của mầm từ chóp rễ đến chồi mầm

- Hoạt độ enzym amylaza [10].

- Hoạt độ enzym proteaza [10].

Sau khi xác định được nồng độ đường gây hạn nhân tạo và phân loại khả năng chịu hạn của các giống đậu tương nghiên cứu, chúng tôi tiến hành bố trí thí nghiệm theo dõi động thái hoạt độ enzym amylaza và enzym proteaza trong vòng 72 giờ gieo hạt, mỗi lần xác định hoạt độ enzym cách nhau 8 giờ đồng hồ.

Chúng tôi chọn 3 giống đậu tương ứng với khả năng chịu hạn tốt, trung bình và kém trong các giống đậu tương nghiên cứu. Các giống đậu tương được gieo trong khay có lót giấy thấm gấp nếp thành 9 hàng, mỗi giống đậu tương gieo 30 hạt/ 3 hàng. Mỗi khay tương ứng với một công thức là công thức đối chứng cung cấp nước (ĐC) và công thức thí nghiệm với nồng độ đường gây hạn đã được chọn (TN). Mỗi công thức được lặp lại 3 lần.

Số liệu nghiên cứu được xử lý trên cơ sở được sử dụng những ứng dụng của phần mềm Microsof Excel, và One - way ANOVA với kiểm định Tukey's- b ở mức ý nghĩa bằng 0,05 của phần mềm SPSS phiên bản 22.0.

Phân nhóm chịu hạn của các giống đậu tương nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Ntedit và NTSYSpc phiên bản 2.0.

3. Kết quả thảo luận

3.1. Xác định nồng độ đường gây hạn và phân nhóm khả năng chịu hạn của các giống đậu tương

3.1.1. Tỷ lệ nảy mầm của các giống đậu tương nghiên cứu

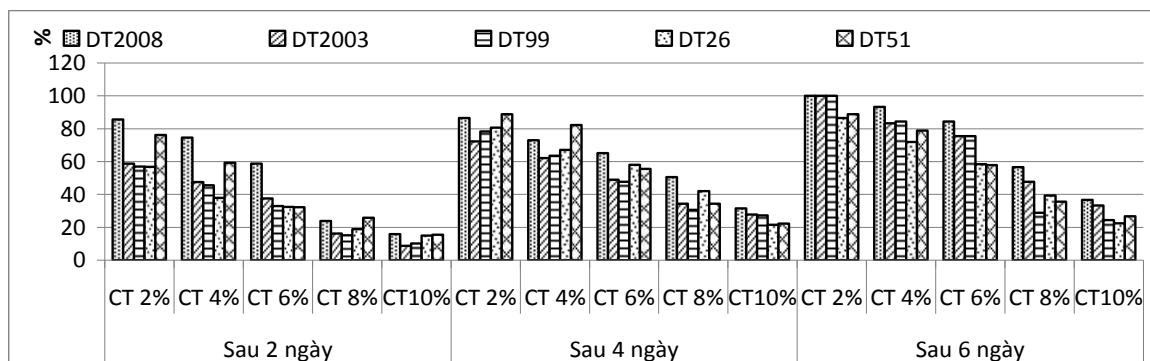
Từ sự sai khác có ý nghĩa thống kê khi theo dõi số hạt nảy mầm trong các công thức thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy: Tất cả các giống đậu tương nghiên cứu khi chịu ảnh hưởng của hạn đều có số hạt nảy mầm thấp hơn so với đối chứng và nồng độ gây hạn càng cao thì số hạt nảy mầm càng ít. Điều này có thể giải thích khi nồng độ đường sacaroza tăng lên thì áp suất thẩm thấu của tế bào càng giảm, quá trình hút

nước của hạt gặp khó khăn. Vì vậy hoạt động của các enzym phân giải chất dự trữ cung cấp năng lượng cho phôi sinh trưởng tách ra khỏi vỏ hạt trở lên khó khăn hơn. Số hạt nảy mầm ở nồng độ gây hạn 2% và 4% có sự sai khác với đối chứng nhưng phần trăm số hạt nảy mầm của các giống đậu tương khá cao (sau 2 ngày gieo hạt 56,83% - 85,71%, sau 4 ngày gieo hạt 72,22% - 88,89%) và thời gian gây hạn kéo dài thì mức độ ảnh hưởng của điều kiện hạn không rõ ràng so với đối chứng (sau 6 ngày gieo hạt 86,52%- 100%). Ngược lại ở nồng độ 8%, 10% số hạt nảy mầm của các giống đậu tương thấp, phần trăm hạt nảy mầm của các giống đậu tương chỉ đạt dưới 40% khi kéo dài thời gian gây hạn. Vì vậy chúng tôi cho rằng nồng độ gây hạn nhân tạo bằng đường sacaroza 6% có ảnh hưởng rõ ràng đến sự nảy mầm của các giống đậu tương khi kéo dài thời gian gây hạn.

Bảng 1. Số hạt nảy mầm của các giống đậu tương nghiên cứu

Sau 2 ngày gieo hạt						
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51	
CT 0%	21,0 ^a ± 1,2	26,6 ^a ± 0,9	26,3 ^a ± 0,8	24,6 ^a ± 0,8	25,8 ^a ± 0,8	
CT 2%	18,0 ^b ± 0,6	15,6 ^b ± 0,7	15,0 ^b ± 1,1	14,0 ^b ± 0,5	19,6 ^b ± 0,8	
CT 4%	15,6 ^b ± 0,3	12,6 ^c ± 0,9	12,0 ^b ± 1,1	9,3 ^c ± 0,6	15,3 ^c ± 0,6	
CT 6%	12,3 ^c ± 0,9	10,0 ^d ± 0,6	8,6 ^c ± 0,3	8,0 ^c ± 0,5	8,3 ^c ± 0,6	
CT 8%	5,0 ^d ± 0,6	4,3 ^e ± 0,3	4,0 ^d ± 0,5	4,6 ^d ± 0,3	6,6 ^d ± 0,5	
CT 10%	3,3 ^d ± 0,3	2,3 ^e ± 0,3	2,6 ^d ± 0,3	3,6 ^d ± 0,3	4,0 ^d ± 0,5	
Sau 4 ngày gieo hạt						
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51	
CT 0%	29,6 ^a ± 0,3	30,0 ^a ± 0,0	29,3 ^a ± 0,6	29,3 ^a ± 0,6	30,0 ^a ± 0,0	
CT 2%	25,6 ^b ± 0,6	21,6 ^b ± 0,8	23,0 ^b ± 0,5	23,6 ^b ± 0,3	26,6 ^b ± 0,8	
CT 4%	21,6 ^c ± 0,8	18,6 ^c ± 0,3	18,6 ^c ± 0,6	19,6 ^c ± 0,6	24,6 ^b ± 0,6	
CT 6%	19,3 ^d ± 0,3	14,6 ^d ± 0,3	14,0 ^d ± 0,6	17,0 ^d ± 1,5	16,6 ^c ± 1,2	
CT 8%	15,0 ^e ± 0,5	10,3 ^e ± 0,3	9,0 ^e ± 0,5	12,3 ^e ± 0,8	10,3 ^d ± 0,8	
CT 10%	9,3 ^f ± 0,3	8,3 ^f ± 0,3	8,0 ^e ± 0,5	6,3 ^e ± 0,3	6,6 ^e ± 0,8	
Sau 6 ngày gieo hạt						
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51	
CT 0%	30,0 ^a ± 0,0	30,0 ^a ± 0,0	30,0 ^a ± 0,0	29,6 ^a ± 0,3	30,0 ^a ± 0,0	
CT 2%	30,0 ^a ± 0,0	30,0 ^a ± 0,0	30,0 ^a ± 0,0	25,6 ^b ± 0,3	26,6 ^b ± 0,8	
CT 4%	28,0 ^b ± 0,5	25,0 ^b ± 0,5	25,3 ^b ± 0,8	21,3 ^c ± 1,2	23,6 ^c ± 0,3	
CT 6%	25,3 ^c ± 0,3	22,7 ^c ± 0,3	22,6 ^c ± 0,3	17,3 ^d ± 1,4	17,3 ^d ± 0,8	
CT 8%	17,0 ^d ± 0,5	14,3 ^d ± 0,6	8,6 ^d ± 0,6	11,6 ^e ± 1,2	10,6 ^e ± 0,6	
CT 10%	11,0 ^e ± 0,5	10,0 ^e ± 0,0	7,3 ^d ± 0,8	6,7 ^f ± 0,5	8,0 ^f ± 0,5	

So sánh giữa công thức đối chứng và thí nghiệm, trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau (a, b, c, d, e, f) thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức α là 0,05 với độ tin cậy 95%.



Hình 1. Phần trăm số hạt nảy mầm so với đối chứng của các giống đậu tương nghiên cứu.

Từ biểu đồ hình 1, chúng tôi nhận thấy rằng: khi nồng độ gây hạn tăng lên nhưng thời gian tác động ngắn (sau 2 ngày gieo hạt) thì giống DT2008 có phần trăm số hạt nảy mầm so với đối chứng là cao nhất, sau đó đến giống đậu tương DT51. Vì vậy, sau 2 ngày gieo hạt, ở nồng độ gây hạn 2%, 4% - phần trăm số hạt nảy mầm đạt trên 60% nhưng đến nồng độ 8%, 10% thì giảm xuống còn dưới 40%. Điều này chứng tỏ thời gian gây hạn và nồng độ gây hạn ảnh hưởng rõ ràng đến sự nảy mầm của hạt. Tuy nhiên khi thời gian gây hạn kéo dài (sau 4 ngày gieo hạt), ở nồng độ gây hạn 2%, 4% giống đậu tương DT51 và DT26 có phần trăm số hạt nảy mầm tăng nhanh thậm chí còn cao hơn cả giống đậu tương DT2008. Sau 6 ngày gieo hạt phần trăm số hạt nảy mầm ở nồng độ 2% và 4% của các giống đậu tương đều đạt trên 80% thậm chí giống DT2008, DT2003, DT99 đạt 100%, nồng độ gây hạn 6% phần trăm số hạt nảy mầm so với đối chứng đạt trên 50%.

Giống đậu tương DT 2008 là giống đậu tương chịu hạn. Vì vậy, khi gieo hạt trong nồng độ gây hạn cao, thời gian gây hạn kéo dài, phần trăm số hạt nảy mầm so với đối chứng cũng cao hơn. Tuy nhiên, nếu nồng độ gây hạn quá cao thì số hạt nảy mầm cũng rất thấp. Vì vậy chúng tôi cho rằng: có lẽ đối với những giống đậu tương chịu hạn, trong cây tồn tại một cơ chế nào đó giúp cho cây phản ứng ngay tức thì khi gặp điều kiện hạn. Vì vậy cây có thể có thời gian để khởi động các cơ chế thích nghi đặc thù. Vai trò của phản ứng ngay tức thì này được khẳng định khi chúng tôi gây hạn ở nồng độ cao. Bởi vì,

đối với các giống đậu tương DT51, DT2003, DT99 khi gieo ở nồng độ gây hạn thấp (2%, 4%) và thời gian hạn kéo dài, có lẽ các giống đậu tương này đã khởi động được cơ chế giúp chúng chống chịu nên sau một khoảng thời gian gieo hạt (4 ngày và 6 ngày) thì phần trăm số hạt nảy mầm tăng lên nhanh. Giống DT26 cũng có cơ chế đó nhưng chậm hơn. Nhưng ở nồng độ gây hạn cao 6%, 8%, 10%, có thể do chịu tác động của stress mạnh nên cây không khởi động được cơ chế chống chịu. Như vậy, thời gian hạn càng kéo dài thì phần trăm số hạt nảy mầm càng thấp so với đối chứng.

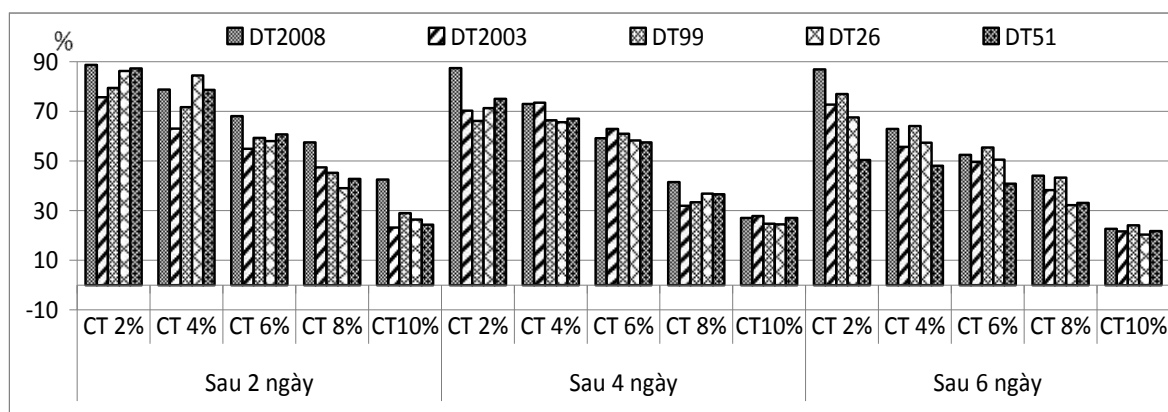
3.1.2. Chiều dài mầm đậu tương

Kết quả thu được khi theo dõi chiều dài mầm các giống đậu tương ở các mức độ gây hạn khác nhau cho thấy: Khi được cung cấp nước đầy đủ (CT 0%), chiều dài mầm của các giống đậu tương tăng nhanh sau 2 ngày, 4 ngày và 6 ngày sau gieo hạt. Khi gặp điều kiện hạn, chiều dài mầm của tất cả các giống đậu tương nghiên cứu đều thấp hơn so với đối chứng. Thời gian hạn càng kéo dài thì phần trăm chiều dài mầm của các giống đậu tương nghiên cứu ở các nồng độ cao càng thấp. Có thể giải thích là do quá trình hút nước của hạt gặp khó khăn dẫn đến thay vì khởi động các cơ chế phân giải chất dự trữ cung cấp năng lượng và nguyên liệu cho quá trình tổng hợp kéo dài mầm thì hạt lại ưu tiên quá trình phân giải chất dự trữ phục vụ cho cơ chế thay đổi tính thấm thấu của màng để chống chịu với điều kiện hạn.

Bảng 2. Chiều dài mầm của các giống đậu tương nghiên cứu (mm)

Sau 2 ngày gieo hạt					
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51
CT 0%	4,7 ^a ± 0,1	5,7 ^a ± 0,1	5,1 ^a ± 0,3	5,80 ^a ± 0,2	5,7 ^a ± 0,1
CT 2%	4,1 ^b ± 0,1	4,3 ^b ± 0,1	4,1 ^b ± 0,1	5,00 ^b ± 0,1	5,0 ^b ± 0,2
CT 4%	3,7 ^{bc} ± 0,2	3,6 ^c ± 0,1	3,7 ^b ± 0,1	4,90 ^b ± 0,2	4,5 ^b ± 0,2
CT 6%	3,2 ^{bc} ± 0,4	3,1 ^d ± 0,1	3,0 ^c ± 0,1	3,37 ^c ± 0,1	3,5 ^c ± 0,2
CT 8%	2,7 ^{cd} ± 0,1	2,7 ^e ± 0,2	2,3 ^d ± 0,1	2,27 ^d ± 0,1	2,4 ^d ± 0,1
Sac 10%	2,0 ^d ± 0,2	1,3 ^f ± 0,1	1,0 ^e ± 0,1	1,53 ^d ± 0,3	1,4 ^e ± 0,1
Sau 4 ngày gieo hạt					
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51
CT 0%	9,2 ^a ± 0,2	10,4 ^a ± 0,2	11,2 ^a ± 0,2	10,9 ^a ± 0,5	10,83 ^a ± 0,83
CT 2%	8,0 ^b ± 0,2	7,3 ^b ± 0,2	7,4 ^b ± 0,1	7,8 ^b ± 0,4	8,13 ^b ± 0,88
CT 4%	6,7 ^c ± 0,4	7,6 ^{bc} ± 0,2	7,4 ^b ± 0,5	7,1 ^{bc} ± 0,2	7,27 ^b ± 0,47
CT 6%	5,4 ^d ± 0,2	6,5 ^c ± 0,3	6,8 ^b ± 0,5	6,8 ^c ± 0,2	6,23 ^b ± 0,15
CT 8%	3,8 ^e ± 0,1	3,3 ^d ± 0,2	3,7 ^c ± 0,2	4,0 ^d ± 0,2	3,97 ^c ± 0,07
CT 10%	2,5 ^f ± 0,1	2,9 ^d ± 0,1	2,7 ^c ± 0,2	2,6 ^e ± 0,1	2,93 ^c ± 0,09
Sau 6 ngày gieo hạt					
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51
CT 0%	20,6 ^a ± 0,4	22,2 ^a ± 0,7	21,3 ^a ± 0,8	24,3 ^a ± 1,8	25,6 ^a ± 0,8
CT 2%	17,9 ^b ± 0,7	16,1 ^b ± 0,8	16,4 ^b ± 0,3	16,4 ^b ± 0,3	12,9 ^b ± 0,8
CT 4%	12,9 ^c ± 0,4	12,3 ^c ± 0,1	13,6 ^c ± 0,8	13,9 ^{bc} ± 0,2	12,3 ^{bc} ± 0,5
CT 6%	10,8 ^d ± 0,1	11,0 ^c ± 0,1	11,8 ^c ± 0,1	12,3 ^c ± 0,1	10,4 ^{cd} ± 0,1
CT 8%	9,0 ^e ± 0,2	8,5 ^d ± 0,2	9,2 ^d ± 0,2	7,8 ^d ± 0,4	8,5 ^d ± 0,2
CT 10%	4,7 ^f ± 0,2	4,8 ^e ± 0,1	5,1 ^e ± 0,1	4,9 ^d ± 0,19	5,5 ^e ± 0,1

So sánh giữa công thức đối chứng và thí nghiệm, trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau (a, b, c, d, e, f) thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức α là 0,05 với độ tin cậy 95%.



Hình 2. Phần trăm chiều dài mầm so với đối chứng của các giống đậu tương nghiên cứu.

Sự sai khác có ý nghĩa thống kê về chiều dài mầm của các giống đậu tương ở các nồng độ khác nhau cho thấy ảnh hưởng rõ ràng của các nồng độ gây hạn khác nhau đến sự sinh trưởng của mầm đậu tương. Chúng tôi nhận thấy nồng độ gây hạn 6%, phần trăm chiều dài mầm so với đối chứng đạt trên 50%. Trong khi đó phần trăm chiều dài mầm của các giống đậu tương ở nồng độ gây hạn 2% và 4% đạt giá trị

cao (trên 60%) so với đối chứng, nồng độ gây hạn 8% và 10% chỉ đạt dưới 50%.

Sau 2 ngày gieo hạt thì sự khác biệt giữa giống đậu tương DT2008 và DT2003, DT99, DT26, DT51 về phần trăm chiều dài mầm so với đối chứng rất rõ ràng khi gây hạn ở nồng độ cao. Tuy nhiên khi thời gian gây hạn kéo dài thì phần trăm chiều dài mầm của các giống đậu tương DT2003, DT99, DT26, DT51 cũng tăng lên.

Bảng 3. Hoạt độ enzym amylaza trong quá trình nảy mầm của các giống đậu tương nghiên cứu (ĐVHĐ/mg)

Sau 2 ngày gieo hạt					
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51
CT 0%	0,81 ^c ± 0,01	0,84 ^b ± 0,01	0,74 ^c ± 0,01	0,97 ^c ± 0,01	0,90 ^c ± 0,01
CT 2%	0,87 ^{bc} ± 0,00	0,82 ^{bc} ± 0,00	0,88 ^a ± 0,01	1,07 ^b ± 0,00	0,98 ^b ± 0,01
CT 4%	0,90 ^b ± 0,01	0,80 ^c ± 0,01	0,81 ^b ± 0,01	1,06 ^b ± 0,01	1,02 ^a ± 0,01
CT 6%	1,01 ^a ± 0,00	1,09 ^a ± 0,01	0,76 ^{bc} ± 0,01	1,15 ^a ± 0,01	0,51 ^d ± 0,01
CT 8%	0,59 ^d ± 0,02	0,59 ^d ± 0,01	0,55 ^d ± 0,00	0,57 ^d ± 0,01	0,48 ^e ± 0,00
CT10%	0,46 ^e ± 0,03	0,56 ^d ± 0,00	0,45 ^e ± 0,01	0,44 ^c ± 0,01	0,36 ^f ± 0,00
Sau 4 ngày gieo hạt					
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51
CT 0%	0,85 ^c ± 0,01	0,73 ^a ± 0,01	0,82 ^a ± 0,00	1,04 ^c ± 0,002	0,97 ^b ± 0,006
CT 2%	0,88 ^{bc} ± 0,01	0,53 ^c ± 0,01	0,81 ^a ± 0,01	1,19 ^a ± 0,001	1,00 ^b ± 0,001
CT 4%	0,95 ^b ± 0,00	0,49 ^c ± 0,01	0,78 ^b ± 0,00	1,13 ^b ± 0,01	1,23 ^a ± 0,01
CT 6%	0,99 ^a ± 0,00	0,62 ^b ± 0,01	0,72 ^b ± 0,00	1,06 ^d ± 0,00	0,61 ^c ± 0,01
CT 8%	0,66 ^d ± 0,02	0,39 ^d ± 0,01	0,52 ^c ± 0,01	0,27 ^f ± 0,00	0,42 ^d ± 0,00
CT10%	0,64 ^d ± 0,01	0,19 ^d ± 0,00	0,42 ^c ± 0,01	0,33 ^e ± 0,00	0,42 ^d ± 0,00
Sau 6 ngày gieo hạt					
Giống	DT2008	DT2003	DT99	DT26	DT51
CT 0%	0,62 ^c ± 0,0	0,64 ^a ± 0,03	0,70 ^a ± 0,00	0,71 ^c ± 0,0	0,84 ^c ± 0,02
CT 2%	0,75 ^a ± 0,01	0,47 ^b ± 0,01	0,55 ^d ± 0,01	0,69 ^c ± 0,01	0,97 ^a ± 0,00
CT 4%	0,64 ^b ± 0,00	0,47 ^b ± 0,01	0,61 ^c ± 0,01	0,92 ^a ± 0,01	0,90 ^b ± 0,00
CT 6%	0,76 ^a ± 0,00	0,53 ^b ± 0,01	0,66 ^b ± 0,01	0,85 ^b ± 0,00	0,43 ^d ± 0,01
CT 8%	0,55 ^d ± 0,01	0,35 ^c ± 0,01	0,43 ^c ± 0,00	0,30 ^c ± 0,01	0,41 ^{dc} ± 0,01
CT10%	0,47 ^c ± 0,00	0,19 ^d ± 0,00	0,38 ^f ± 0,00	0,37 ^d ± 0,01	0,39 ^c ± 0,00

So sánh giữa công thức đối chứng và thí nghiệm, trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau (a, b, c, d, e, f) thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức α là 0,05 với độ tin cậy > 95%.

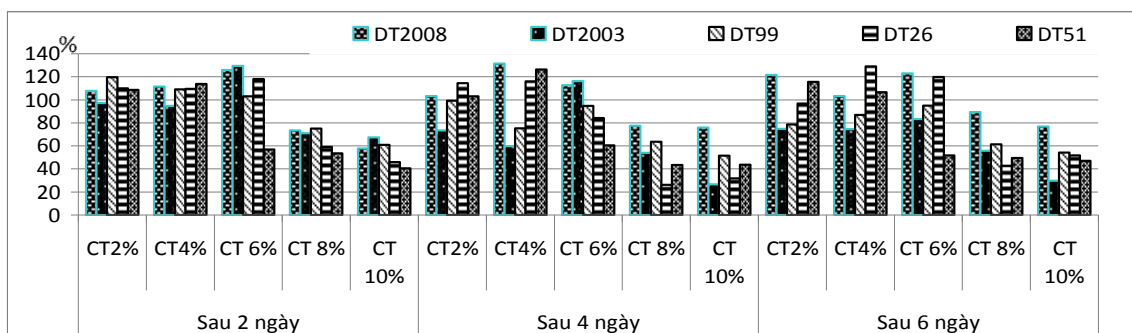
3.1.3. Hoạt độ enzym amylaza

Từ bảng số liệu cho thấy: Các giống đậu tương DT2008, DT99, DT26 và DT51 có xu hướng tăng hoạt độ enzym amylaza sau 2 ngày gieo hạt nhưng sau 4 ngày hoạt độ amylaza lại

giảm. Các giống DT2008, DT26, DT51, ở CT0%, hoạt độ enzym amylaza tăng nhanh sau 4 ngày gieo hạt (trung ứng 0,8066 - 8,534 ĐVHĐ/ mg, 0,9762 - 1,045 ĐVHĐ/mg, 0,903 - 0,97 ĐVHĐ/mg) nhưng sang đến ngày thứ 6 thì hoạt

độ enzym bị giảm (0,6225; 0,718; 0,8453 ĐVHD/mg). Có thể giải thích sau 2 và 4 ngày gieo hạt, đây là khoảng thời gian mầm hạt sinh trưởng mạnh, hạt cần phân giải chất dự trữ là tinh bột để giải phóng năng lượng và nguyên liệu cho quá trình tổng hợp mới của mầm. Vì vậy hoạt độ enzym amylaza của các giống đậu tương cũng tăng lên trừ giống DT2003. Khi gặp điều kiện hạn, ở CT 2%, CT 4 % và CT 6% hoạt độ enzym amylaza của giống DT2008, DT51, DT 26 tăng cao hơn so với đối chứng và đạt cao nhất ở CT 6%. Như vậy, khi chịu ảnh

hưởng của hạn, các giống đậu tương tăng hoạt độ enzym amylaza để tạo sản phẩm làm thay đổi tính thấm của màng tế bào, giúp tế bào hút nước. Khi mức độ gây hạn tăng lên thì hoạt độ enzym amylaza cũng tăng lên. Tuy nhiên sự tăng mức độ ảnh hưởng của hạn cũng có một giới hạn về di truyền vì ở CT8 % và CT10% thì ngay cả hoạt độ amylaza của giống DT2008 cũng thấp. Điều này chứng tỏ khi gây hạn ở mức độ quá cao thì hạt không thể hút được nước gây khó khăn cho việc hoạt hóa các enzym thủy phân.



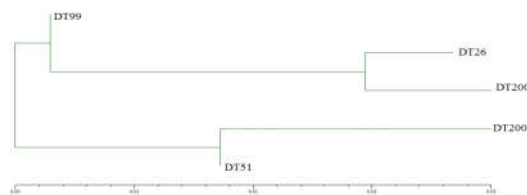
Hình 3. Phần trăm hoạt độ enzym amylaza so với đối chứng của các giống đậu tương nghiên cứu.

Trên biểu đồ hình 3 thể hiện phần trăm hoạt độ enzym amylaza so với đối chứng của các giống đậu tương nghiên cứu. Chúng tôi nhận thấy: Hoạt độ enzym amylaza của các giống đậu tương nghiên cứu đều tăng nhanh sau 2 ngày gieo hạt. Khi thời gian hạn kéo dài thì sự biến động về hoạt độ enzym amylaza ở mỗi giống đậu tương là khác nhau. Có thể sự tăng nhanh hoạt độ enzym amylaza ở 2 ngày gieo hạt là một trong những phản ứng nhanh của cây trước sự tác động của môi trường. Tuy nhiên chúng tôi cũng nhận thấy có sự khác biệt khi kéo dài thời gian gây hạn thì hoạt độ enzym amylaza ở giống DT2008 vẫn tăng so với đối chứng nhưng các giống khác thì lại có xu hướng giảm. Có thể tăng hoạt độ amylaza vẫn là một cơ chế giúp cây chống chịu nhưng ở các giống đậu tương DT2003, DT99, DT26, DT51 thì thời gian 4 và 6 ngày gieo hạt khi được cung cấp đủ nước nên hoạt độ amylaza tăng nhanh để phục vụ cho quá trình sinh trưởng của mầm nên phần trăm so với đối chứng bị giảm. Hoặc cũng có thể ngoài enzym amylaza thì ở giai đoạn này

còn có những cơ chế khác có vai trò lớn hơn giúp cho hạt có thể nảy mầm và mầm sinh trưởng trong điều kiện gây hạn.

- Dựa vào sự sai khác có ý nghĩa thống kê trong các chỉ tiêu nghiên cứu chúng tôi lựa chọn nồng độ đường gây hạn là 6% để tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu động thái hoạt độ enzym amylaza và enzym proteaza.

- Chúng tôi phân loại các nhóm chịu hạn như sau:



Hình 4. Phân nhóm khả năng chịu hạn của các giống đậu tương nghiên cứu.

Các giống đậu tương có khả năng chịu hạn từ cao đến thấp theo thứ tự: DT2008, DT51, DT2003, DT26, DT99.

- Chúng tôi lựa chọn các giống đậu tương DT2008 (chịu hạn tốt), DT2003 (chịu hạn trung bình), DT99 (chịu hạn kém) cho các thí nghiệm tiếp theo.

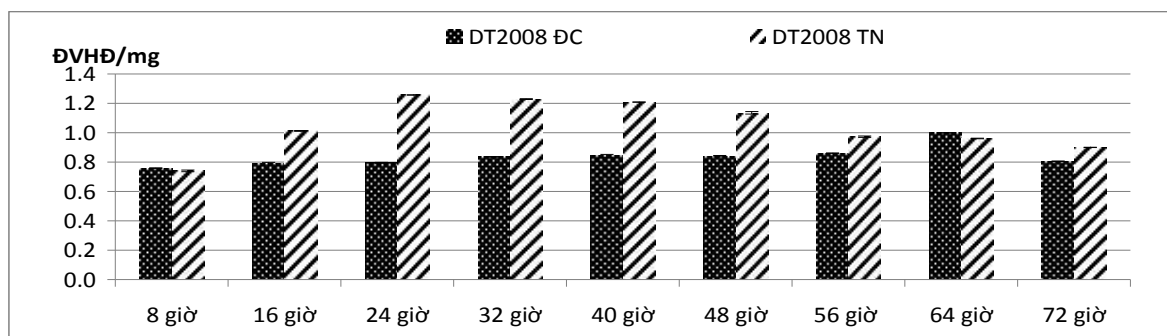
3.2. Động thái hoạt độ enzym amylaza và proteaza trong điều kiện hạn

Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu về động thái hai enzym thủy phân là amylaza và proteaza để thấy được vai trò của

mỗi enzym trong quá trình hạt nảy mầm gặp stress hạn nhân tạo.

3.2.1. Động thái enzym amylaza trong điều kiện hạn

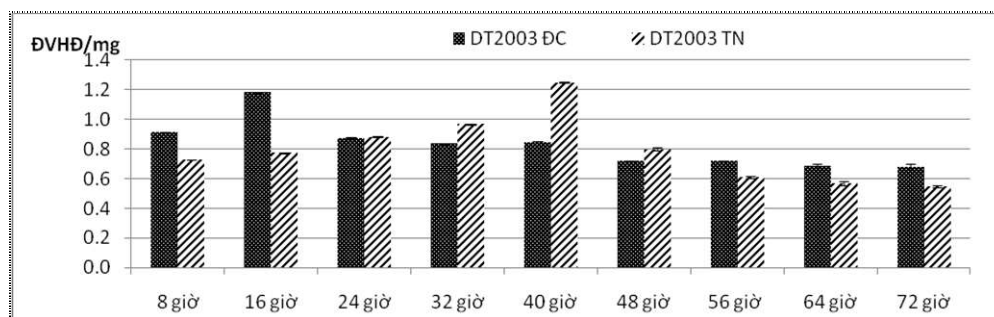
Chúng tôi nhận thấy sự biến động về hoạt độ enzym amylaza của các giống đậu tương nghiên cứu, trong điều kiện được cung cấp đủ nước và điều kiện hạn là có sự khác nhau.



Hình 5. Động thái hoạt độ enzym amylaza của giống đậu tương DT2008 trong điều kiện hạn.

Giống đậu tương DT2008: trong điều kiện cung cấp đủ nước, trong khoảng thời gian: sau 16 giờ (0,7889 ĐVHĐ/mg) và 24 giờ gieo hạt (0,7956 ĐVHĐ/mg) hoặc sau 40 giờ và 48 giờ gieo hạt, không có sự biến động về hoạt độ enzym amylaza. Hoạt độ enzym amylaza đạt giá trị cao nhất sau 64 giờ gieo hạt (0,999 ĐVHĐ/mg) và sau đó có xu hướng giảm. Khi gặp điều kiện hạn, hoạt độ enzym amylaza tăng nhanh sau 16 giờ gieo hạt và đạt giá trị cao nhất

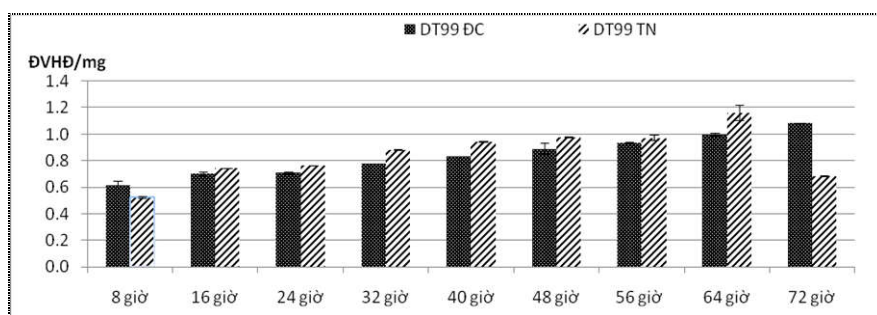
sau 24 giờ gieo hạt (1,25 ĐVHĐ/mg). Sự tăng cao và tăng nhanh hơn so với đối chứng về hoạt độ enzym amylaza có thể đã giúp giống đậu tương DT2008 có phản ứng kịp thời chống chịu trong môi trường hạn. Vì sự tăng hoạt độ enzym amylaza tạo sản phẩm làm tăng áp suất thẩm thấu của màng, giúp cho hạt lấy được nước khởi động các cơ chế chống chịu khác cũng như đảm bảo cho quá trình nảy mầm và sinh trưởng của mầm.



Hình 6. Động thái hoạt độ enzym amylaza của giống đậu tương DT2003 trong điều kiện hạn.

Trong sự phân loại các giống đậu tương nghiên cứu của chúng tôi về khả năng chịu hạn, giống đậu tương DT2003 đại diện cho nhóm có khả năng chịu hạn trung bình. Chúng tôi nhận thấy hoạt độ enzyme amylaza của giống đậu tương DT2003 khi cung cấp đủ nước tăng nhanh và đạt giá trị cao nhất chỉ sau 16 giờ gieo hạt. Chính vì vậy giống đậu tương DT2003 có sự nảy mầm và sinh trưởng về chiều dài mầm tốt hơn 3 giống đậu tương đã chọn. Khi gặp điều kiện hạn, hoạt độ enzyme amylaza của giống đậu tương DT2003 cũng tăng nhưng phải

đến sau 40 giờ gieo hạt mới đạt giá trị cao nhất (1,55 ĐVHĐ/mg) và sau đó có xu hướng giảm xuống. Biểu đồ hình 6 đã chứng tỏ rằng stress hạn có ảnh hưởng làm giảm hoạt độ enzyme amylaza của giống đậu tương DT2003 sau 8 giờ và 16 giờ gieo hạt, đặc biệt khi kéo dài thời gian gây hạn (56 giờ, 64 giờ và 72 giờ gieo hạt). Đồng thời chúng tôi nhận thấy để khởi động cơ chế làm thay đổi tính thấm của màng tế bào nhờ sự hoạt động của enzyme amylaza thì giống đậu tương DT2003 cần phải có thời gian dài hơn so với giống đậu tương DT2008.



Hình 7. Động thái hoạt độ enzyme amylaza của giống đậu tương DT99 trong điều kiện hạn.

Đại diện cho nhóm có khả năng chịu hạn kém trong phạm vi các giống đậu tương nghiên cứu, trên biểu đồ hình 7 cho thấy động thái enzyme amylaza của giống đậu tương DT99 trong vòng 72 giờ gieo hạt. Chúng tôi cũng nhận thấy rằng động thái của enzyme amylaza có cùng xu hướng tăng cao hơn đối chứng khi gặp điều kiện hạn như giống DT2008 nhưng thời gian để hoạt độ enzyme amylaza đạt giá trị cao nhất 64 giờ sau khi gieo hạt. Trong khi đó giống đậu tương DT2003 sau 16 giờ gieo hạt hoạt độ enzyme amylaza thấp hơn so với chúng nhưng chỉ sau 40 giờ gieo hạt đã đạt giá trị hoạt độ enzyme amylaza cao nhất. Như vậy thời gian để các giống đậu tương đưa ra phản ứng trả lời môi trường có vai trò quan trọng khi chịu stress môi trường. Vì vậy giống đậu tương DT2003 được xếp vào nhóm có khả năng chịu hạn tốt hơn giống DT99. Có lẽ giống đậu tương DT2008 kết hợp được giữa thời gian đưa ra phản ứng trả lời môi trường và cơ chế tăng hoạt độ amylaza cao hơn so với đối chứng khi gặp

stress hạn nên giống DT2008 là giống có khả năng chịu hạn tốt nhất.

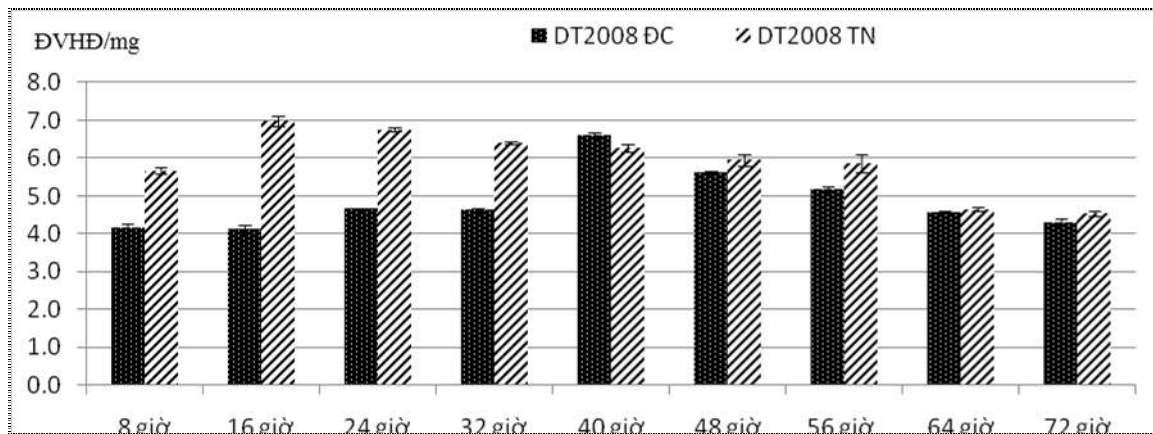
3.2.2. Động thái hoạt độ enzyme proteaza trong điều kiện hạn

Hoạt độ enzyme proteaza của các giống đậu tương DT2008, DT2003 và DT99 được thể hiện trên biểu đồ hình 8, hình 9, hình 10.

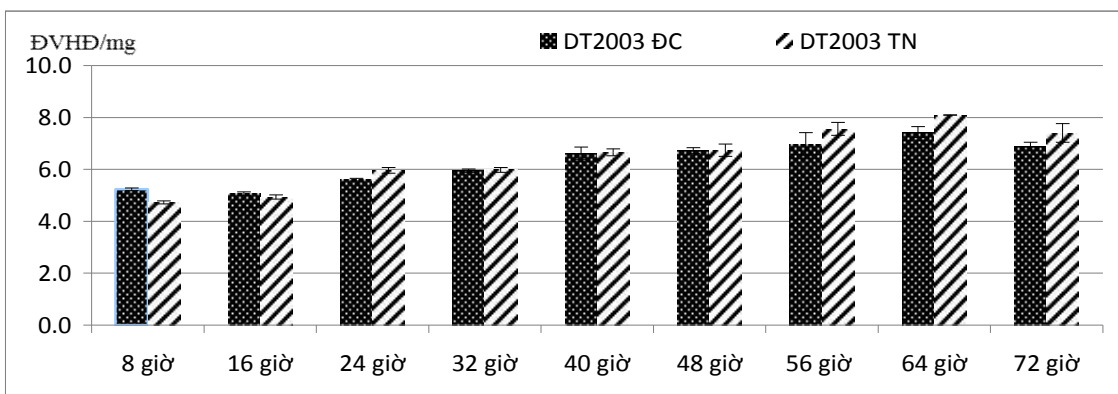
Từ biểu đồ hình 8 có thể nhận thấy rằng: Khi được cung cấp đủ nước, hoạt độ enzyme proteaza của giống DT2008 tăng lên nhanh hơn so với hoạt độ enzyme amylaza của giống DT2008. Chỉ sau 40 giờ gieo hạt, hoạt độ enzyme proteaza đã đạt giá trị cao nhất (6,612 ĐVHĐ/mg). Đồng thời khi gặp điều kiện hạn thì hoạt độ enzyme proteaza cũng tăng nhanh hơn, chỉ sau 16 giờ gieo hạt hoạt độ enzyme proteaza đã đạt giá trị cao nhất trong khi đó hoạt độ enzyme amylaza phải mất 24 giờ. Trên biểu đồ cũng thể hiện rằng hoạt độ enzyme proteaza cũng có xu hướng tăng cao hơn so với đối chứng. Điều này chứng tỏ rằng: đối với đậu tương thì thành phần chất dự trữ chủ yếu là

protein nên khi gặp stress hạn thì sự tăng cường hoạt động của enzym proteaza có thể là một trong những cơ chế được ưu tiên hàng đầu giúp

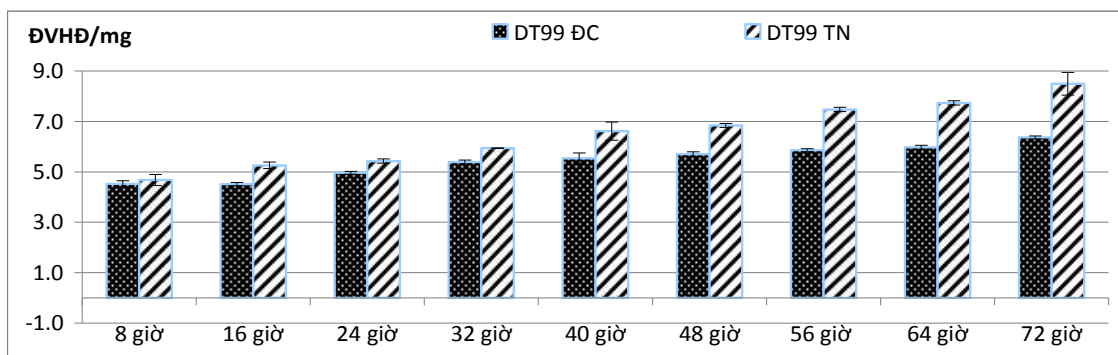
cho các giống đậu tương có thể chống chịu được stress môi trường.



Hình 8. Động thái hoạt độ enzym proteaza của giống đậu tương DT2008 trong điều kiện hạn.



Hình 9. Động thái hoạt độ enzym proteaza của giống đậu tương DT2003 trong điều kiện hạn.



Hình 10. Động thái hoạt độ enzym proteaza của giống đậu tương DT99 trong điều kiện hạn.

Từ biểu đồ 9 cho thấy khoảng thời gian sau 8 giờ và 16 giờ gieo hạt, hoạt độ enzym

proteaza của giống đậu tương DT2003 bị giảm khi chịu tác động của hạn. Tuy nhiên sau 24 giờ

gieo hạt, hoạt độ enzym proteaza đã tăng so với đối chứng và đạt giá trị cao nhất sau 64 giờ gieo hạt, sau đó hoạt độ proteaza giảm xuống. Trên biểu đồ hình 10, hoạt độ enzym proteaza của giống đậu tương DT99 cũng thể hiện xu hướng tăng hoạt độ enzym proteaza cao hơn so với đối chứng khi gặp điều kiện. Tuy nhiên thời gian để hoạt độ enzym proteaza của giống DT2003 đạt giá trị cao nhất vẫn nhanh hơn so với giống DT99.

4. Kết luận

- Nồng độ đường sacaroza gây hạn nhân tạo được chọn là 6%.

- Trong phạm vi nghiên cứu, sự tăng hoạt độ enzym amylaza nhanh sau những giờ đầu gieo hạt có thể là một trong những phản ứng nhanh giúp cho cây đậu tương thích nghi với stress môi trường. Sự tăng hoạt độ enzym proteaza có thể sẽ nằm trong loại phản ứng đặc thù của đậu tương gieo trong điều kiện hạn. Giống đậu tương DT2008 đã thể hiện sự kết hợp của hai dạng phản ứng này để giúp chống lại stress môi trường.

- Trong các giống đậu tương nghiên cứu: DT2008, DT2003, DT26, DT51, DT99 được chia thành 3 nhóm: nhóm chịu hạn tốt DT2008, DT51, nhóm chịu hạn trung bình: DT26, DT2003, nhóm chịu hạn kém DT99.

- Trong phạm vi nghiên cứu, sự tăng hoạt độ enzym amylaza nhanh sau những giờ đầu gieo hạt là một trong những phản ứng nhanh giúp cho cây đậu tương thích nghi với stress môi trường còn sự tăng hoạt độ enzym proteaza có thể sẽ nằm trong loại phản ứng đặc thù của đậu tương gieo trong điều kiện hạn. Giống đậu tương DT2008 đã thể hiện sự kết hợp của hai enzym thủy phân này để chống lại stress môi trường.

- Tuy nhiên để khẳng định điều này chúng tôi kiến nghị cần mở rộng khoảng thời gian nghiên cứu dài hơn và nghiên cứu trong mối tương quan với các cơ chế chống chịu khác của cây.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Tấn Lê, Vũ Đình Ngân, Nghiên cứu đời sống của cây lạc (*Arachis hypogea* L.) trong điều kiện nóng hạn ở vụ hè tại Đà Nẵng, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Số 5 (2010), Tr.117- 124.
- [2] Ku Y.-S., Au-Yeung W.-K., Yung Y.-L., Li M.-W., Wen C.-Q., Liu X., et al. "Drought stress and tolerance in soybean," in A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships ed. Board J. E., editor, New York, NY: InTech, (2013) 209-237.
- [3] Điều Thị Mai Hoa, Nguyễn Phương Thảo, Lê Thị Thanh Hiều, Ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu cao đến sự nảy mầm, hoạt tính enzyme α -amylase và tích lũy prolin của mầm đậu xanh (*Vigna radiata*), *Tạp chí khoa học, Đại học Sư Phạm Hà Nội*, Số 56 (2011), Tr. 106 - 114.
- [4] Vũ Ngọc Thắng, Nguyễn Ngọc Quát, Nguyễn Thu Huyền, Nguyễn Quang Dũng, Nguyễn Văn Thắng, Vũ Đình Chính, Ảnh hưởng của hạn đến khả năng nảy mầm của một số giống đậu xanh triển vọng, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, Tập 9, Số 6 (2011), Tr.912- 919.
- [5] Ha C. V., Le D. T., Nishiyama R., Watanabe Y., Sulieman S., Tran U. T., et al, The auxin response factor transcription factor family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress, *DNA Res*, 20(2013) 511-524.
- [6] Ha C. V., Watanabe Y., Tran U. T., Le D. T., Tanaka M., Nguyen K. H., et al, Comparative analysis of root transcriptomes from two contrasting drought-responsive Williams 82 and DT2008 soybean cultivars under normal and dehydration conditions, *Front. Plant Sci*, 6 (2015) 551.
- [7] Karl J. Kunert, Barend J. Vorster, Berhanu A. Fenta, Tsholofelo Kibido,...et al, Drought Stress Responses in Soybean Roots and Nodules, *Front Plant Sci*, 7 (2016) 1015.
- [8] Alexandersson E., Fraysse L., Sjövall-Larsen S., Gustavsson S., Fellert M., Karlsson M., et al, Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins, *Plant Mol. Biol.* 59 (2005) 469-484.
- [9] Bailey T. L., Williams N., Misleh C., Li W. W, MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, *Nucleic Acids Res*, 34 (2006)W369-W373.
- [10] Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng, Ong Xuân Phong, Phương pháp nghiên cứu Sinh lý học Thực vật, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội (2013).

Study on Concentrations of Drought - Induced Sucrose and Dynamics of Enzyme Amylase, Protease at Germination Stage of Soybean Varieties in Artificial Drought Condition

Nguyen Thi Thao, Tran Khanh Van

*Faculty of Biology, Hanoi National University of Education,
136 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

Abstract: In this study, we determined the concentration of drought-induced sucrose to germination of 5 soybean varieties (DT2008, DT51, DT99, DT26 and DT2003) and then classified them into different groups of drought tolerance through indexes such as the number of sprout grains, length of sprout and activity of amylase. The results showed that sucrose (6% w/v) affected clearly to above physiological indexes when extending the duration of the drought and 3 soybean varieties (DT2008, DT2003 and DT51) were classified as high, medium and weak tolerance variety to drought, respectively, and then selected to carry out in next study on the dynamics of enzyme amylase and protease in drought condition. The results indicated that the increasing of amylase activity may be non-specific reaction while the increasing of protease activity might be specific reaction of soybeans under drought condition.

Keywords: Soybean, germination, amylase, protease, specific reaction, drought.