

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA HẠT NANO COBAN DẠNG ĐƠN LÊ VÀ HỖN HỢP LÊN SỰ THAY ĐỔI CÁC THÔNG SỐ QUANG HỢP VÀ HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME CHỐNG ÔXY HÓA Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG *Glycine max* Merr. (DT26)

Phan Hoàng Tuấn^{1,3}, Lưu Thị Tâm¹, Hoàng Thị Lan Anh¹,
Ngô Thị Hoài Thu¹, Nguyễn Hoài Châu², Đặng Diễm Hồng^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

²Viện Công nghệ Môi trường, VAST, Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, Việt Nam

TÓM TẮT: Đậu tương (*Glycine max* (L) Merr.) là một cây trồng quan trọng được trồng phổ biến trên thế giới như là nguồn thực phẩm của con người, động vật nuôi. Công nghệ nano là một trong các giải pháp tiềm năng trong nông nghiệp hiện đại nhằm tăng năng suất cây trồng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày ảnh hưởng của hạt nano coban dạng đơn lẻ và hỗn hợp hạt lên hoạt tính quang hợp và các enzyme chống oxy hóa của cây đậu tương DT26 ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau ở điều kiện pilot. Kết quả thu được cho thấy việc xử lý hạt nano coban ở cả 2 dạng đã làm tăng quang hợp của cây đậu tương thông qua tăng hàm lượng chlorophyll a, tốc độ quang hợp thực và tỷ lệ Fv/Fm. Các giá trị này có xu hướng tăng dần và đạt giá trị cực đại tại giai đoạn lá kép thứ 5, sau đó giảm dần ở giai đoạn bắt đầu ra hoa. Xử lý hạt nano coban đơn lẻ của Mỹ ở nồng độ 0,17 và 16,67 mg/kg hạt làm tăng hoạt độ của catalase, superoxide dismutase và peroxidase gấp 1,60; 2,11 và 1,85 so với giá trị tương ứng ở công thức đối chứng. Trong khi đó, ascorbate peroxidase lại tăng cao nhất (2,73 lần) tại lô xử lý hạt coban đơn lẻ của Việt Nam ở nồng độ 0,17 mg/kg hạt. Điều này đã cho thấy hạt nano coban đã tạo ra các stress “oxy hóa” và giúp cho cây đậu tương kích hoạt cơ chế tự bảo vệ của mình thông qua tăng hoạt độ của các enzyme nêu trên nhằm làm giảm hàm lượng H₂O₂ và O₂⁻ tích tụ trong tế bào lá.

Từ khóa: APX (ascorbate peroxidase), CAT (catalase), Chlorophyll a, *Glycine max*, hạt nano coban, SOD (superoxide dismutase), Tốc độ quang hợp thực.

MỞ ĐẦU

Trong nông nghiệp hiện đại, công nghệ nano được xem là một giải pháp quan trọng và hiệu quả cho việc nâng cao năng suất và tính chống chịu của cây trồng với điều kiện môi trường bất lợi và giúp cho nền nông nghiệp phát triển bền vững. Các hạt nano kim loại được biết đến như một chất kích thích sinh trưởng thực vật và có khả năng kích hoạt các quá trình trao đổi chất trong cơ thể thực vật và động vật. Nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu tác động sinh học của hạt nano cũng như những mặt có lợi và có hại trên các loài thực vật khác nhau trong đó có cây đậu tương. Thông thường các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc đánh giá khả năng sinh trưởng của thực vật thông qua quang hợp, sự phát triển của bộ rễ. Coban được xem là một nguyên tố vi lượng có nhiều ích lợi đối với thực vật bậc cao mặc dù cho đến nay chưa có được những bằng chứng xác thực về vai

trò trực tiếp hay cơ chế tác dụng của chúng trên cơ thể thực vật. Đối với cây họ đậu, coban là một yếu tố cần thiết cho một số loại vi sinh vật đặc biệt là vi sinh vật cố định nitơ trong khí quyển, sự thiếu hụt chúng dường như làm giảm hiệu quả cố định nitơ (Evans & Kliwer, 1964). Công bố của Riley & Dilworth (1986) đã cho thấy tầm quan trọng của coban đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây họ đậu chủ yếu là do ảnh hưởng của coban trên hoạt động và quần thể vi sinh vật cố định nitơ khí quyển thuộc hai chi *Azotobacter* và *Nitrobacter*.

Sự tiếp xúc của thực vật đối với môi trường bất lợi (như hạn hán, mặn, lạnh, nóng, nấm bệnh hay có mặt các kim loại nặng với hàm lượng cao) là điều kiện làm tăng sản sinh các gốc tự do (ROS, Reactive oxygen species) như oxy đơn (1O₂), superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), và gốc hydroxyl (OH^{*}), đây là sản phẩm chuyển hóa của oxy, có khả năng oxy

hóa mạnh, tham gia điều khiển sự sinh trưởng, phát triển của các cơ quan lá, hoa, quả, thông qua điều tiết các quá trình chuyển hóa nội bào. Nồng độ cao của các gốc tự do gây nên hiện tượng “stress oxy hóa” (Wojtaszek, 1997; Malecka et al., 2001; Bhattacharjee, 2005). Thực vật có cơ chế hình thành hệ thống chống oxy hóa (bao gồm các enzyme chống oxy hóa và phi enzyme) để điều chỉnh mức độ sản sinh ROS, giúp thực vật bảo vệ các tế bào và các cơ quan của chúng khỏi tác động xấu của các ROS (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004; Scandalios, 2005). Các enzyme chống oxy hóa chủ yếu bao gồm superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) catalase (CAT) và các chất chống oxy hóa phi enzyme gồm glutathione peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX), proline (Pro) và peroxiredoxin (PrxR) (Ramakrishna & Rao, 2015; Wang et al., 2015). Các enzyme này có mặt trong tất cả các khoang nhỏ trong tế bào. Thông thường, một cơ quan có thể có nhiều hơn một enzyme tham gia đào thải một ROS đơn lẻ (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004; Scandalios, 2005). Các enzyme chống lại ROS trong thực vật đã được nghiên cứu rộng rãi và cho thấy để đáp ứng lại các điều kiện môi trường sống bất lợi, hoạt độ APX thường tăng lên cùng với các hoạt độ của các enzym khác như CAT, SOD (Shigeoka et al., 2002).

Quang hợp là một quá trình sinh lý quan trọng trong thực vật, là cơ sở của sự tăng trưởng và phát triển của cây trồng (Chia & He, 1999). Ở cây đậu tương, năng suất của cây chủ yếu được tạo nên bởi lượng sản phẩm quang hợp trong thời kỳ phát triển thân, lá. Hoạt động quang hợp lại phụ thuộc vào khả năng thu giữ ánh sáng và hiệu suất chuyển đổi năng lượng ánh sáng mặt trời vào sinh khối cây trồng. Chlorophyll là sắc tố chính và thiết yếu trong quang hợp, giúp thực vật thu nhận ánh sáng. Hàm lượng chlorophyll cũng như huỳnh quang chlorophyll a tại bước sóng 680 nm (Chlorophyll a 680 nm) thuộc tâm phản ứng của hệ quang hóa II (PSII) hiện nay đang được sử dụng như là một công cụ hữu hiệu để xác định nhanh trạng thái sinh lý của cây trồng dưới điều kiện sinh lý tối ưu và bất lợi (Guo et al., 2005; Hussain & Reigosa, 2011).

Cho đến nay chưa có nhiều công bố về tác động của các hạt nano coban đối với sự thay đổi các thông số quang hợp cũng như thay đổi hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa ở cây đậu

tương. Do đó, việc đánh giá, bổ sung những dẫn liệu mới về cơ chế bảo vệ của cây trồng này dưới điều kiện có và không có mặt hạt nano coban (đơn lẻ hoặc hỗn hợp hạt) là thực sự cần thiết. Giống đậu tương DT26 do Trung tâm nghiên cứu và Phát triển đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam lai tạo là một giống triển vọng cho hiệu quả kinh tế cao. Ảnh hưởng của hạt nano coban đơn lẻ và dạng hỗn hợp lên sự thay đổi các thông số quang hợp và hoạt độ của enzyme chống oxy hóa ở giống đậu tương DT26 đã được tiến hành nghiên cứu nhằm góp phần lý giải tác động của hạt nano coban lên việc tăng năng suất của cây đậu tương.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hạt nano coban đơn lẻ và hỗn hợp hạt

Hạt nano coban dạng đơn lẻ (nano coban hóa trị 0) có kích thước < 50 nm gồm hạt coban do Mỹ sản xuất (US Research Nanomaterials, Texas, USA) và do Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam chế tạo (Ngo et al., 2014). Các hạt này được phân tán trong nước RO bằng máy siêu âm Sonic & Materials (USA) với công suất 375 W, tần số 20 KHz trong 3 phút 30 giây, sử dụng chất bảo vệ CMC và tác nhân khử NaBH₄ để khử ion Co²⁺ thành Co⁰. Nano hỗn hợp xử lý hạt giống là dạng hỗn hợp hạt bao gồm hạt nano coban được phối trộn với các thành phần khác bao gồm N, P₂O₅, K₂O, Mg, S, Fe, Cu, Co, Zn, Mn, B, Mo, Se, NAA-axit Naphthaleneacetic, GA3-axit Gibberellic, amino axit, humic, chế phẩm diệt nấm Cruiser do Viện Công nghệ Môi trường chế tạo.

Hạt giống đậu tương DT26

Hạt đậu tương giống DT26 do Trung tâm nghiên cứu và Phát triển đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Xử lý hạt đậu tương

Pha dung dịch nano coban đơn lẻ của Việt Nam (VN) và Mỹ (USA) bằng nước RO, siêu âm dung dịch trong 3 phút 30 s để bảo đảm hạt nano phân tán hoàn toàn trong nước để đạt nồng độ là 6,67 mg/l và 667 mg/l, tương ứng. Dung dịch nano coban hỗn hợp hạt gồm 2 nồng độ sử dụng là 1X và 5X (có nồng độ là 20 mg/L và 100 mg/L, tương ứng trong đó hàm lượng hạt nano coban trong dung dịch này lần lượt là 0,4 và 2,0 mg/l). Lượng thể tích dịch nano nêu trên

cho xử lý hạt đậu tương là 25 ml dung dịch nano/kg hạt. Hạt giống đậu tương có kích thích đồng đều được lựa chọn cho thí nghiệm. Cân 50 g hạt đã được lựa chọn vào trong đĩa petri. Bổ sung 1,25 mL dung dịch nano đơn lẻ hoặc hỗn hợp vào các lô thí nghiệm để đạt nồng độ 0,17; 16,67 mg/kg hạt (đối với nano coban đơn) và nồng độ 0,5 và 2,5 mg/kg hạt giống (đối với nano coban hỗn hợp hạt, tương ứng với hạt nano coban có nồng độ là 0,01 mg/kg và 0,05 mg/kg hạt) hoặc xử lý bằng nước RO (nước qua quá trình lọc thẩm thấu ngược) cho lô đối chứng, sau đó lắc đảo cho hạt thấm đều dung dịch nano coban. Ủ hạt với dung dịch nano coban trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, vớt hạt ra và dàn đều trên giấy thấm ở nhiệt độ phòng tới khi vỏ hạt khô thì tiến hành gieo. Hạt đậu tương được gieo trong khay nhựa kích thước 50 × 20 × 15 cm với mật độ 6 hạt/khay trên nền đất thích hợp. Các khay được để trong nhà lưới có mái che với ánh sáng tự nhiên.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành với 7 công thức: đối chứng (ký hiệu ĐC)-xử lý bằng nước RO (nước qua quá trình lọc thẩm thấu ngược); thí nghiệm 1 và 2: xử lý với hạt nano coban do Việt Nam chế tạo với 2 liều là 0,17 và 16,7 mg/kg hạt tương ứng với nồng độ kích thích và ức chế (ký hiệu là KTVN và ÚCVN); thí nghiệm 3 và 4: xử lý với hạt nano coban do Mỹ chế tạo với 2 liều là 0,17 (liều kích thích) và 16,7 mg/kg hạt (liều ức chế) được ký hiệu KTUSA và ÚCUSA; thí nghiệm 5 và 6: xử lý hạt giống bằng nano hỗn hợp với nồng độ 0,5 và 2,5 mg/kg hạt giống tương ứng với liều kích thích (ký hiệu Mix 1X) và liều ức chế (Mix 5X). Mỗi công thức lặp lại 5 lần.

Xác định hàm lượng chlorophyll a ở lá đậu tương

Lá đậu tương non hoàn chỉnh nhất được thu ở các thời điểm lá kép 1 (V1), lá kép 3 (V3), lá kép 5 (V5) và thời điểm bắt đầu ra hoa (R1) của cây. Lá đậu tương (0,2 g) được cắt nhỏ, nghiền đồng thể trong tối và lạnh với acetone 80 % có bổ sung thêm ít cát thủy tinh. Ly tâm hỗn hợp ở 12.000 rpm/5 min. Hút phần dịch trong phía trên và định mức lên 10 mL và đo OD ở các bước sóng 663 nm (A_{663}) và 646 nm (A_{646}). Hàm lượng chlorophyll a (C_a) được tính theo

công thức (Lichtenthal, 1994; Wellburn, 1994):

$$C_a = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{646} (\mu\text{g/mL})$$

Xác định tốc độ quang hợp thực của cây đậu tương

P_n (tốc độ quang hợp thực) là thông số đặc trưng nhất và phản ánh khả năng quang hợp của thực vật. Thông số này có mối liên hệ chặt chẽ với hàm lượng chlorophyll a và được xác định bằng công thức $Y = 5,134 X - 2,094$ (trong đó X là hàm lượng chlorophyll a và hệ số tương quan r là 0,939) (Qiu et al., 2013).

Đo huỳnh quang chlorophyll a hấp thụ ở bước sóng 680 nm

Huỳnh quang chlorophyll a được xác định tại bước sóng 680 nm thuộc tâm phản ứng của hệ PSII (P680 nm) bằng máy chlorophyll fluorometer OS-30 (do hãng ADC (Anh) cung cấp) theo mô tả của Nguyễn Văn Mã và nnk. (2013).

Xác định hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa

Chuẩn bị dịch chiết enzyme lá đậu tương: Lá đậu tương được chiết với 5 ml đệm phosphate (gồm 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7,0), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0,2 mM EDTA, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP) và 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP)). Ly tâm hỗn hợp ở 4°C trong 15 phút. Chuyển dịch trên lên ống falcon mới, định mức lên 5 ml và giữ ở tủ lạnh sâu (-) 20°C để đo hoạt độ của các enzyme APX, SOD, CAT, POX và xác định hàm lượng protein.

Hàm lượng protein của lá đậu tương được tách chiết theo phương pháp Bradford (1976). Hoạt độ superoxide dismutase (SOD) được phân tích bằng phương pháp của Scobbia et al. (1999); Catalase (CAT) được xác định theo phương pháp của Chen et al. (2000) cải tiến; Ascorbate peroxidase (APX) được phân tích theo phương pháp của Asada (1982); Hoạt độ peroxidases (POX) xác định theo phương pháp của Amako (1994).

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel. Sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm được đánh giá bằng phân tích ANOVA một yếu tố

với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hàm lượng chlorophyll a của lá đậu tương ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau dưới tác động của hạt nano coban hóa trị 0

Hoạt tính quang hợp của thực vật phụ thuộc

vào khả năng hấp thụ năng lượng ánh sáng của các sắc tố quang hợp và chuyển hóa năng lượng ánh sáng thành các hợp chất hữu cơ tích lũy tạo ra sinh khối của chúng (Confalone et al., 2010). Kết quả về sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a của cây đậu tương ở các giai đoạn khác nhau dưới tác động của hạt nano coban được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Thay đổi hàm lượng chlorophyll a của cây đậu tương ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau dưới tác động của hạt nano coban

Công thức	Giai đoạn sinh trưởng			
	V1	V3	V5	R1
ĐC	1,09 ± 0,27 ^a	1,43 ± 0,26 ^a	1,75 ± 0,18 ^a	1,10 ± 0,01 ^a
KTVN	1,03 ± 0,08 ^a	1,58 ± 0,19 ^a	2,03 ± 0,20 ^b	1,14 ± 0,31 ^a
KTUSA	1,18 ± 0,20 ^a	1,59 ± 0,03 ^a	2,02 ± 0,16 ^b	1,64 ± 0,08 ^b
ÚCVN	1,06 ± 0,16 ^a	1,54 ± 0,23 ^a	1,84 ± 0,11 ^a	1,28 ± 0,10 ^a
ÚCUSA	1,17 ± 0,48 ^a	1,54 ± 0,13 ^a	1,83 ± 0,12 ^a	1,45 ± 0,63 ^b
Mix 1X	1,11 ± 0,05 ^a	1,50 ± 0,25 ^a	1,93 ± 0,09 ^b	0,91 ± 0,06 ^a
Mix 5X	1,14 ± 0,13 ^a	1,65 ± 0,02 ^b	2,09 ± 0,10 ^b	1,06 ± 0,16 ^a

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các số mũ khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học so với đối chứng ($p < 0,05$)

Kết quả chỉ ra ở bảng 1 cho thấy việc xử lý hạt đậu tương với dung dịch hạt nano coban đã làm tăng hàm lượng chlorophyll a so với công thức đối chứng. Xử lý hạt nano coban ở nồng độ 0,17 mg/kg hạt cho hiệu quả cao hơn so với nồng độ 16,67 mg/kg hạt. Hàm lượng chlorophyll a có xu hướng tăng dần và đạt cực đại ở thời điểm V5. Sau đó, hàm lượng này giảm mạnh khi cây đậu tương bắt đầu ra hoa (giai đoạn R1). Không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học về hàm lượng chlorophyll a giữa công thức đối chứng và thí nghiệm ở giai đoạn V1 ($p > 0,05$). Tuy nhiên, khi cây phát triển đến giai đoạn V3 (lá kép 3), sự khác biệt về hàm lượng chlorophyll a giữa các lô xử lý với hạt nano coban đơn lẻ (KTVN, ÚCVN, ÚCUSA) cũng như hỗn hợp nano coban (Mix 1X và Mix 5X) so với công thức đối chứng (ĐC) được thể hiện rõ rệt ($p < 0,05$). Hiệu quả tác động của hạt nano coban có xuất xứ từ Hoa Kỳ và Việt Nam lên hàm lượng chlorophyll a của cây đậu tương DT26 chưa có sự khác biệt đáng kể ($p > 0,05$). Hơn nữa, trong thí nghiệm này, việc xử lý hạt đậu tương bằng dung dịch nano coban (đơn lẻ hay hỗn hợp) cho hiệu quả tương đương nhau. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy hạt coban hỗ trợ quá trình tổng hợp chlorophyll và hạn chế sự phân hủy của nó trong tối. Kết quả thu được của chúng tôi cũng

tương đồng với công bố của Abdul Jaleel et al., (1999) khi xử lý hạt coban ở nồng độ 50 mg/kg hạt đã làm tăng hàm lượng chlorophyll a, b và chlorophyll tổng số ở cây đậu xanh *Vigna radiata*. Theo công bố của Ngo et al. (2014), hàm lượng chlorophyll của cây đậu tương tăng khoảng 10 % so với đối chứng khi hạt được xử lý với dung dịch hạt nano coban hóa trị 0.

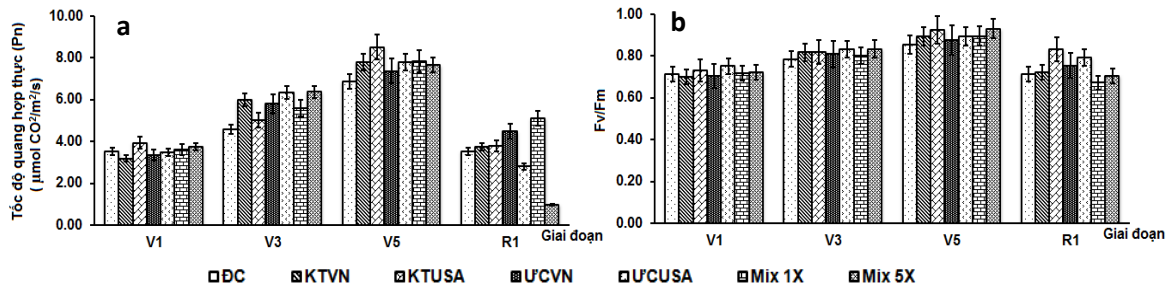
Tốc độ quang hợp thực (Pn) của lá đậu tương ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau dưới tác động của hạt nano coban dạng đơn lẻ và hỗn hợp hạt

Sự thay đổi tốc độ quang hợp thực (Pn - thông số đặc trưng và phản ánh khả năng quang hợp của thực vật) ở cây đậu tương DT26 dưới tác động của hạt nano coban dạng đơn lẻ và hỗn hợp hạt được chỉ ra ở hình 1A. Động thái tăng giảm của Pn có mối quan hệ chặt với sự thay đổi của hàm lượng chlorophyll a. Giá trị Pn cũng có xu hướng tăng dần và đạt giá trị cực đại tại thời điểm V5, đây là thời điểm cây đậu tương sinh trưởng mạnh nhất, sau đó, giá trị này giảm dần ở giai đoạn R1. So với lô đối chứng, các lô được xử lý với hạt nano coban giúp cho cây đậu tương sinh trưởng tốt hơn nên tốc độ quang hợp thực cũng đạt được giá trị cao hơn. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa lô ĐC và lô KTVN và KTUSA ($p < 0,05$)

tại thời điểm V5. Khi cây đậu tương vào giai đoạn bắt đầu ra hoa, giá trị Pn của cây giảm đáng kể. Việc giảm giá trị Pn có thể là do ở giai đoạn này cây đậu tương ngừng sinh trưởng sinh dưỡng và tập trung cho việc sinh trưởng sinh thực (ra hoa và kết quả) của cây.

Sự thay đổi tỷ lệ Fv/Fm của lá cây đậu tương ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau dưới tác động của hạt nano coban được chỉ ra ở hình 1B. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy Fv/Fm tăng ở tất cả các lô cho tới giai đoạn V5, sau đó tỷ lệ này giảm khi cây đậu tương ở giai đoạn R1. Trong đó, lô thí nghiệm được xử lý với hạt nano

coban đơn lẻ và hỗn hợp luôn cao hơn so với đối chứng trong cùng thời điểm nghiên cứu. Kết quả này cho thấy hạt nano coban đã giúp việc sử dụng năng lượng ánh sáng trong phản ứng quang hóa ở PSII đạt hiệu quả cao hơn dẫn tới tăng hiệu suất quang hợp. Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa lô ĐC và lô KTVN, KTUSA ($p < 0,05$) tại thời điểm V5. Tuy nhiên, không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học giữa các nồng độ xử lý hạt nano coban (liều kích thích và ức chế) với công thức ĐC cũng như giữa các dạng hạt coban đơn lẻ và hỗn hợp ở giai đoạn V1, V3 và R1 ($p > 0,05$).



Hình 1. Thay đổi tốc độ quang hợp thực Pn - (a) và tỷ lệ Fv/Fm - (b) của lá cây đậu tương ở các giai đoạn khác nhau dưới tác động của hạt nano coban

Ảnh hưởng của hạt nano coban lên hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa trong lá đậu tương DT26

Khi gặp các điều kiện sống bất lợi cho sinh trưởng, thực vật hình thành các cơ chế kiểm soát bằng cách điều chỉnh hoạt động của các enzyme chống oxy hóa như SOD, CAT, POX và APX như một cơ chế phòng vệ của cây trồng, đồng thời hạn chế tác động độc tính của chúng đối với tế bào (Maffei et al., 2007; Ahmad et al., 2008). Sự thay đổi hoạt độ các enzyme chống oxy hóa nêu trên dưới tác động của hạt nano coban cũng được nghiên cứu (hình 2). Kết quả chỉ ra trên hình 2 đã cho thấy ở lô thí nghiệm xử lý hạt đậu tương với dung dịch nano coban, hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa ở lá cây đậu tương đều có xu hướng tăng so với công thức ĐC không xử lý hạt nano coban. Hoạt độ của các enzyme này tăng chậm ở giai đoạn V1 đến V3, sau đó tăng mạnh ở giai đoạn V5 đến R1.

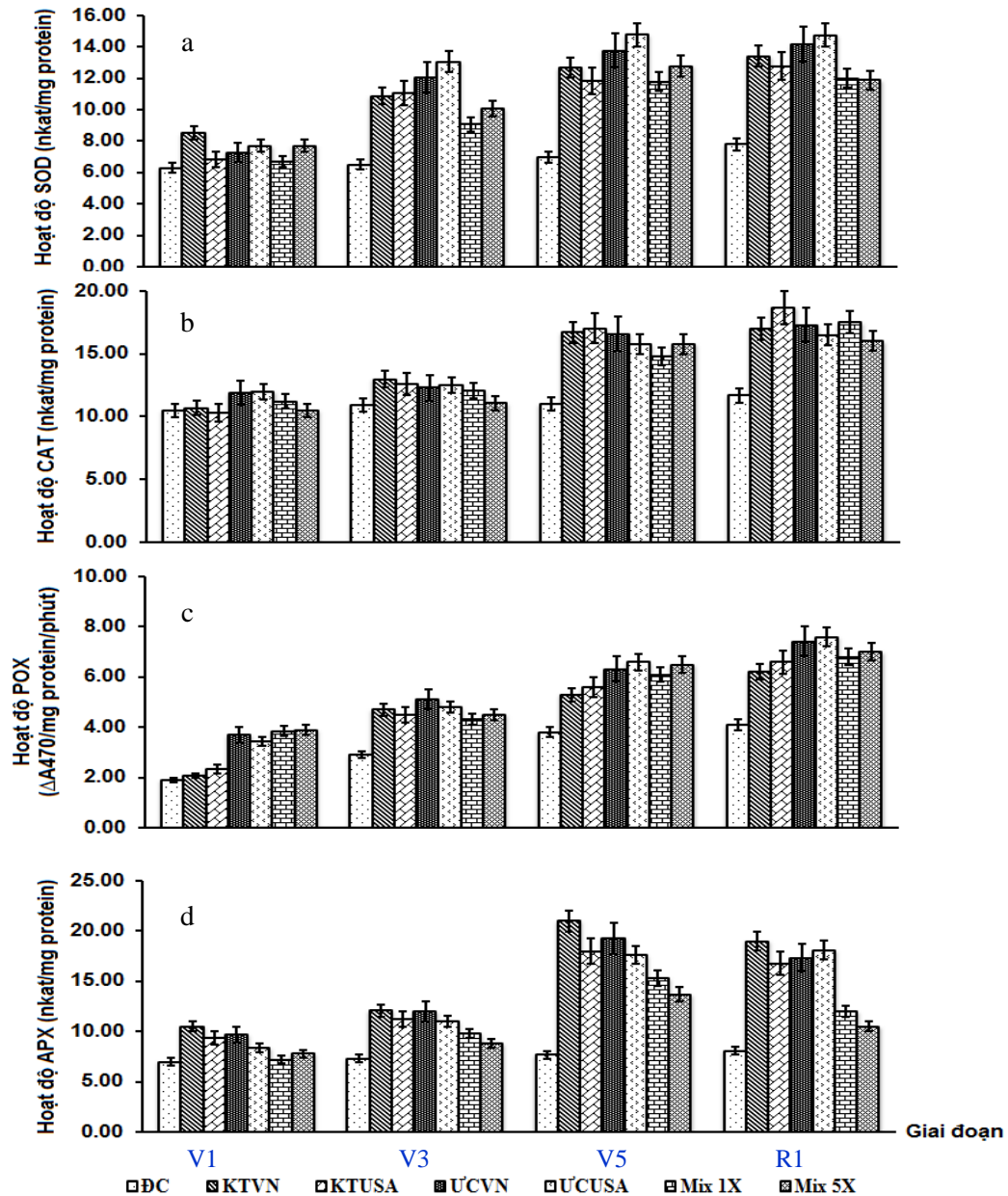
Đối với SOD: Ở công thức đối chứng, hoạt độ SOD có xu hướng tăng nhẹ trong suốt quá

trình sinh trưởng của cây đậu tương. Trong khi đó, dưới tác động của hạt nano coban dạng đơn lẻ của Hoa Kỳ với nồng độ là 16,67 mg/kg hạt (U'CUSA), hoạt độ enzyme này tăng mạnh ở giai đoạn V5-R1 và đạt giá trị cao nhất là 14,79 nkat/mg protein ở giai đoạn V5, cao hơn 2,11 lần so với công thức đối chứng tại cùng thời điểm tương ứng (hình 2a). Có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học về hoạt độ SOD giữa công thức thí nghiệm có xử lý hạt nano coban so với công thức ĐC và giữa dạng hạt nano coban đơn lẻ và hỗn hợp hạt ($p < 0,05$). Tuy nhiên, không có sự sai khác nhiều về hoạt độ enzyme này giữa các nồng độ nano coban đơn lẻ hoặc hỗn hợp hạt xử lý khác nhau ($p > 0,05$).

Do SOD là enzyme chuyển hóa O_2^- thành H_2O_2 và O_2 nên việc tăng hoạt độ của enzyme này giúp giảm lượng O_2^- nội sinh ở trong lá đậu tương. Sự biến thiên về hoạt độ SOD ở lá đậu tương DT26 dưới tác động của hạt nano coban cũng tương đồng với sự biến thiên về hoạt độ enzyme này dưới tác động của stress Pb^{2+} của cây đậu tương DT84 (Mai Văn Chung & Trần

Ngọc Toàn, 2015) hay dưới tác động của stress Molybdenum (Mo) và Boron (B) có mặt ở trong đất của 3 giống đậu tương *Glycine max* (L.)

Merrill là Zhechun III, Zhechun II và 3811 ở các giai đoạn sinh trưởng V5, R1 và R4 (Liu et al., 2005).



Hình 2. Thay đổi của hoạt độ các enzyme chống ôxy hóa ở lá cây đậu tương ở các giai đoạn khác nhau dưới tác động của hạt nano coban
 a- Superoxide dismutase (SOD); b- Catalase (CAT); c- Peroxydase (POX) và d- Ascorbate peroxidase (APX)

Đối với catalase (CAT): Với chức năng phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 , sự gia tăng mạnh mẽ và liên tục về hoạt độ của CAT sẽ góp

phần làm giảm hàm lượng H_2O_2 trong lá. Các kết quả nghiên cứu trình bày trên hình 2b đã cho thấy hoạt độ của catalase có xu hướng tăng nhẹ

ở các công thức được xử lý với hạt nano coban. Hoạt độ này đạt giá trị cao nhất ở giai đoạn R1, đạt 18,7 nkat/mg protein ở liều xử lý hạt coban đơn lẻ của Hoa Kỳ với nồng độ 0,17 mg/kg hạt (KTUSA), tăng gấp 1,60 lần so với công thức ĐC tại cùng thời điểm. Điều này cho thấy nhu cầu tổng hợp catalase để khử độc trong tế bào của cây đậu tương là khá cao. Trong khi đó, ở công thức đối chứng hoạt độ của enzyme này không tăng nhiều giữa các giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Hoạt độ CAT không có sự khác biệt nhiều giữa các nồng độ hạt nano coban xử lý khác nhau cũng như giữa hạt coban đơn lẻ và hỗn hợp hạt nano kim loại ($p > 0,05$).

Đối với peroxidases (POX): Sự thay đổi của hoạt độ POX cũng diễn ra tương tự như catalase (hình 2c). Sự có mặt của hạt nano coban đã làm tăng hoạt độ của POX so với công thức ĐC. Trong cả 4 giai đoạn sinh trưởng V1, V3, V5 và R1 của cây đậu tương DT26, hoạt độ enzyme này không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ($p > 0,05$) giữa các dạng và nồng độ hạt nano coban sử dụng. Tuy nhiên, hoạt độ POX có sự sai khác đáng kể giữa công thức thí nghiệm xử lý hạt nano coban so với công thức đối chứng ($p < 0,05$). Hoạt độ POX đạt giá trị cao nhất (7,6 Δ A470/mg protein/phút), cao hơn 1,85 lần so với công thức đối chứng khi cây đậu tương ở giai đoạn R1 dưới tác dụng của nồng độ nano coban đơn lẻ của Mỹ ở nồng độ là 16,67 mg/kg hạt (UCUSA).

Đối với ascorbate peroxidase (APX): Sự thay đổi hoạt độ của ascorbate peroxidase ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của lá cây đậu tương DT26 khi có mặt hoặc không có mặt của hạt nano coban được trình bày ở hình 2d. Việc xử lý hạt đậu tương với hạt nano coban đã cảm ứng thúc đẩy hoạt độ của APX trong lá đậu tương DT26 tăng liên tục theo thời gian. Trong đó, hoạt độ APX ở công thức KTVN, KTUSA luôn cao hơn ĐC và UCVN, UCUSA cũng như hỗn Mix 1X và Mix 5X. Hoạt độ APX ở lá đậu tương khi xử lý với hạt nano tăng nhanh ở giai đoạn V1- V3 và có xu hướng giảm ở giai đoạn R1. Hoạt độ của enzyme này ở công thức xử lý hạt nano coban luôn cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng ($p < 0,05$). Hoạt độ cao nhất của APX là $22,47 \pm 1,06$ nkat/mg protein (tăng 2,73 lần so với công thức đối chứng) đạt được trong lá cây đậu tương ở công thức KTVN ở thời điểm V5. APX là enzyme xúc tác cho quá trình khử độc của các hợp chất peroxide (ví dụ, H_2O_2)

trong tế bào chất. Do đó, thay đổi hoạt độ của APX có ảnh hưởng trực tiếp đến sự biến đổi H_2O_2 nội sinh. Mối quan hệ này đã biểu hiện rõ ở cây đậu tương chịu tác động của hạt nano coban: khi APX duy trì hoạt độ cao trong các giai đoạn V3 và V5, hàm lượng H_2O_2 trong lá được duy trì ở mức thấp.

Việc tăng hoạt tính của APX, SOD, POX, và CAT giúp làm giảm sự tổn hại gây ra bởi quá trình oxy hóa trong lục lạp của rau chân vịt cũng được Lei et al. (2008) công bố. Farghaly & Nafady (2015) cũng đã thông báo rằng có sự khác biệt rất lớn về hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa ở các loại thực vật khác nhau khi được xử lý bằng hạt nano bạc. Hạt nano bạc cảm ứng làm tăng không đáng kể hoạt tính CAT của cây cà chua, trong khi đó trên cây lúa mì lại cho thấy xu hướng ngược lại chúng lại làm giảm hoạt động của enzyme này. Nghiên cứu của Krishnaraj et al. (2012) cũng cho thấy hoạt tính cao của CAT và POX ở các mẫu lá cây khi được xử lý bằng hạt nano bạc. Điều này gián tiếp cho phép hiểu rằng ROS được hình thành ít và do vậy, chúng ít gây độc tính đối với cây trồng. Các tác giả cũng thông báo CAT và POX là các enzyme đóng một vai trò quan trọng trong việc đảm bảo sự bảo vệ của cơ thể thực vật chống lại những tổn hại của quá trình oxy hóa ở thực vật khi chúng được xử lý bằng hạt nano bạc.

Theo nghiên cứu của Tewari et al. (2002) khi xử lý cây đậu xanh (*Phaseolus aureus* Roxb. Cv. T-44) bằng $CoSO_4$ có nồng độ 50 μ M đã kích thích sinh trưởng của cây thông qua tăng hàm lượng chlorophyll và sinh khối khô của ngọn và rễ cây. Đồng thời, hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa như CAT, POX, APX và SOD cũng tăng so với công thức đối chứng. Hơn nữa, tác giả Rizwan et al. (2017) công bố ảnh hưởng của hạt nano kim loại và oxit kim loại khác nhau lên sinh trưởng và sinh lý của một số cây trồng quan trọng đã cho thấy các hạt nano đã gây ra stress oxy hoá bằng việc tạo ra các gốc tự do (ROS). Ở nồng độ xử lý hạt nano thấp, hệ thống tự bảo vệ ở thực vật đã được kích hoạt để loại bỏ việc hình thành ROS. Nhưng ở nồng độ xử lý cao hơn gây ra điều kiện bất lợi cao, thực vật không thể chống lại sự bùng phát của ROS dẫn tới chúng bị oxy hoá nghiêm trọng. Hơn nữa, hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa liên quan đến tác động của hạt nano có

thể tăng hoặc giảm khác nhau không chỉ do sự khác nhau giữa các loại thực vật, loại và kích thước hạt nano đã được sử dụng, thời gian xử lý mà còn do các điều kiện thực nghiệm. Như vậy, cây trồng có thể chịu được hạt nano có nồng độ thấp bằng cách tăng cường hoạt động của các chất chống oxy hóa để loại bỏ các gốc tự do, từ đó đạt được một sự cân bằng nào đó giữa việc hình thành ROS và dọn sạch hoặc làm mất đi các gốc tự do đã được hình thành này. Tuy nhiên, ở nồng độ hạt nano cao lại gây độc và gây stress oxy hóa ở thực vật dẫn đến giảm hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa. Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi thu được là tương tự với các công bố nêu trên của thế giới. Trong bài báo này, chúng tôi mới trình bày các kết quả liên quan đến ảnh hưởng của hạt nano dạng đơn lẻ và hỗn hợp lên hoạt tính quang hợp và hoạt tính của một số enzyme chống oxy hóa ở cây đậu tương DT26. Tuy nhiên, đề hiểu rõ hơn cơ chế tác động của hạt nano coban dạng đơn lẻ và hỗn hợp lên quang hợp, năng suất và sự thay đổi của các enzyme chống oxy hóa ở cây đậu tương DT 26 cần phải có những nghiên cứu sâu hơn.

KẾT LUẬN

Hiệu quả quang hợp của cây đậu tương DT26 tăng khi hạt được xử lý với dung dịch nano coban (dạng đơn lẻ với nồng độ 0,17 và 16,67 mg/kg hạt; dạng hỗn hợp hạt ở nồng độ 0,5 và 2,5 mg/kg hạt) thông qua tăng giá trị của các thông số quang hợp như hàm lượng chlorophyll a, tốc độ quang hợp thực Pn và tỷ lệ Fv/Fm. Hiệu quả tác động lên quang hợp của hạt nano coban đơn lẻ do Việt Nam và Mỹ sản xuất không có sự khác biệt. Vì vậy, để chủ động nguồn nguyên liệu hạt nano, tiết kiệm chi phí sản xuất và tăng hiệu quả kinh tế nên sử dụng hạt nano coban dạng đơn lẻ do Việt Nam chế tạo ở nồng độ 0,17 mg/kg hạt giống.

Hạt nano coban đơn lẻ của Việt Nam và Hoa Kỳ đã gây “stress oxy hóa” nhẹ ở cây đậu tương DT26 và làm tăng hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa. Xử lý hạt đậu tương với hạt nano coban đơn lẻ của Hoa Kỳ ở nồng độ 16,67 mg/kg hạt (ÚCUSA) đã làm hoạt độ của superoxide dismutase và peroxidase tăng gấp 2,11 và 1,85 lần so với đối chứng. Hoạt độ cao nhất của ascorbate peroxidase và catalase đạt được ở công thức xử lý hạt nano coban đơn lẻ của Việt Nam (KTVN) và Mỹ (KTUSA) ở nồng

độ 0,17 mg/kg hạt, tăng gấp 2,73 và 1,60 lần so với giá trị tương ứng ở công thức đối chứng. Hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa tăng được xem như là một cơ chế bảo vệ của cơ thể nhằm giảm thiểu những tác động có hại của các stress này gây ra.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Hợp phần IV “Nghiên cứu cơ chế tác động và đánh giá an toàn sinh học của các chế phẩm nano được nghiên cứu trong dự án” có Mã số: VAST.TĐ.NANO.04/15-18, thuộc Dự án KHCN trọng điểm cấp Viện Hàn lâm KH&CNVN “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp” do PGS.TS. Nguyễn Hoài Châu làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdul Jaleel C., Jayakumar K., Chang-Xing Z., Iqbal M., 2009. Low concentration of cobalt increases growth, biochemical constituents, mineral status and yield in *Zea mays*. J. Sci. Res., 1(1): 128–137.
- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S., 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. J. Plant Biol., 51: 167–173.
- Amako K., Chen G. X., Asade K., 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. Plant and Cell Physiol., 35: 497–504.
- Apel K., Hirt H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol., 55: 373–399.
- Asada K., 1992. Ascorbate peroxidase - A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol. Plantarum., 85: 235–241.
- Bhattacharjee S., 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. Curr., Sci., 89: 1113–1121.
- Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem, 72 (1–2): 248–254.
- Chen Y., Cao X. D., Lu Y., Wang X. P., 2000. Effects of rare earth ions and their EDTA complexes on antioxidant enzymes of fish

- liver. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 65: 357–365.
- Chia T. F., He J., 1999. Photosynthetic capacity in oncidium (Orchidaceae) plants after virus eradication. Environ. Exp. Bot., 42: 11–16.
- Confalone A., Lizaso J. I., Ruiz-Nogueira B., Lopez-Cedron F.X., Sau F., 2010. Growth, PAR use efficiency and yield components of field-grown *Vicia faba* L. under different temperature and photoperiod regimes. Field Crops Res., 115: 140–148.
- Evans H.J, Kliwer M., 1964. Vitamin B compounds in relation to the requirements of cobalt for higher plants and nitrogen fixing organisms. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2: 732–755.
- Farghaly F. A., Nafady N. A., 2015. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Rosmarinus officinalis* and its effect on tomato and wheat plants. J. Agric. Sci., 2(11): 277–287.
- Guo D. P., Guo Y. P., Zhao J. P., Liu H., Peng Y., Wang Q. M., Chen J. S., Rao G. Z., 2005. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. Plant Sci., 168: 57–63.
- Hussain M. I., Reigosa M. J., 2011. A chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic efficiency, quantum yield and photon energy dissipation in PSII antennae of *Lactuca sativa* L. leaves exposed to cinnamic acid. Plant Physiol. Biochem., 49: 1290–1298.
- Krishnaraj C., Jagan E. G., Ramachandran R., Abirami S. M., Mohan N., Kalaichelvan P. T., 2012. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. Plant growth metabolism. Process Biochem., 47: 651–658.
- Lei Z., Mingyu S., Xiao W., Chao L., Chunxiang Q., Liang C., Hao H., Xiaoqing L., Fashui H., 2008. Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. Biol. Trace Elem. Res., 121: 69–79.
- Lichtenthale H. K., 1994. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic. Methods Enzymol., 148: 350–382.
- Liu P., Yang Y. S., Xu G. D., Fang Y. H., Yang Y. A., 2005. The response of antioxidant enzymes of three soybean varieties to molybdenum and boron in soil with a connection to plant quality. Plant Soil Environ., 51(8): 351–359.
- Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng, Ong Xuân Phong, 2013. Phương pháp nghiên cứu sinh lý học thực vật. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội. ISBN: 978–604–62.
- Maffei M. E., Mithöfer A., Boland W., 2007. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. Phytochemistry, 68: 2946–2959.
- Mai Văn Chung, Trần Ngọc Toàn, 2015. Stress "ôxy hóa" và phản ứng bảo vệ của cây đậu tương DT84 đối với Chì. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 13(5): 783–789.
- Malecka A., Jarmuszkiewicz W., Tomaszewska B., 2001. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. Acta. Biochim. Pol., 48(3): 687–698.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci., 7: 405–410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci., 9: 490–498.
- Ngo Q. B., Dao T. H., Nguyen H. C., Tran X. T., Nguyen T. V., Khuu T. D., Huynh T. H., 2014. Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51). Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol, 5: 015–016 (7pp).
- Qiu Z., Wang L., Zhou Q., 2013. Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings. Chemosphere, 90: 1274–1280.
- Ramakrishna B., Rao S. S. R., 2015. Foliar application of brassinosteroids alleviates adverse effects of zinc toxicity in radish (*Raphanus sativus* L.) plants. Protoplasma, 252: 665–677.

- Riley I. T., Dilworth M. J., 1986. Cobalt in soil and plant. *Micronutrients News and Information*, 2: 4–9.
- Rizwana M., Alia S., Qayyumb M. F., Okc Y. S., Adreesa M., Ibrahima M., Rehmand M. Z., Faride M., Abbas F., 2017. Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *J. Hazard. Mater.*, 322: 2–16.
- Scandalios J. G., 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:995–1014.
- Scebba F., Sebastiani L., Vitagliano C., 1999. Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: Responses to cold acclimation. *J. Plant Physiol.*, 155: 762–768.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.*, 53: 1305–1319.
- Tewari R. K., Kumar P., Sharma P. N., Bisht S. S., 2002. Modulation of oxidative stress-responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Sci.*, 162: 381–388.
- Wang Z., et al., 2015. The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Sci. Hortic-Amsterdam.*, 18: 113–120.
- Wellburn A. R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 144: 307–313.
- Wojtaszek P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense response. *Acta Physiol. Plant.*, 19: 581–589.

STUDY ON THE EFFECT OF SINGLE AND MIXTURED OF COBALT NANOPARTICLES ON THE CHANGE OF PHOTOSYNTHESIS PARAMETERS AND ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY OF SOYBEAN SEEDLINGS *Glycine max* (L.) Merr. (DT26)

Phan Hoang Tuan^{1,3}, Luu Thi Tam¹, Hoang Thi Lan Anh¹,
Ngo Thi Hoai Thu¹, Nguyen Hoai Chau², Dang Diem Hong^{1*}

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Institute of Environmental Technology, VAST

³Thai Nguyen University of Sciences

SUMMARY

Soybean (*Glycine max* (L) Merr.) is one of the major crops grown worldwide for human food and animal feed. Nanotechnology is one of the most potent tools in modern agriculture to improve crop productivity. In this paper, we investigated the effect of single and mixture cobalt nanoparticles on the change of photosynthesis-related parameters and antioxidant enzyme activity of soybean *Glycine max* (L) Merr “DT26” at different growth stages under pilot scale. The results showed that all form of cobalt nanoparticles treatment enhanced the photosynthesis of soybean by increasing the content of chlorophyll a, Pn and the ratio of Fv/Fm. These values tended to increase and reached the maximum value at fifth trifoliolate stage and then decreased at the beginning bloom stage. The activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and peroxidase (when seeds were treated with USA single cobalt nanoparticles at concentration of 16.67 mg/kg) and catalase (with USA single cobalt nanoparticles at concentration of 0.17 mg/kg) were increased in 2.11, 1.85 and 1.60 times respectively compared to the control group (without the treatment of cobalt nanoparticles) while ascorbate peroxidase was reached highest value (increased in 2.73 times) under the condition of Vietnam single cobalt nanoparticles at the dose of 0.17 mg/kg seeds. This suggests that cobalt nanoparticles treatment has generated oxidative stresses and soybean DT26 has the self-protection mechanism by increasing the

activity of antioxidant enzymes in order to reduce the amount of H₂O₂ and O₂ which accumulates in the leaf cells.

Keywords: APX (ascorbate peroxidase), CAT (catalase), Chlorophyll a, Cobalt nanoparticles, *Glycine max*, net photosynthetic rate, SOD (superoxide dismutase).

Citation: Phan Hoang Tuan, Luu Thi Tam, Hoang Thi Lan Anh, Ngo Thi Hoai Thu, Nguyen Hoai Chau, Dang Diem Hong, 2018. Study on the effect of single and mixtured of cobalt nanoparticles on the change of photosynthesis parameters and antioxidant enzymes activity of soybean seedlings *Glycine max* (L.) Merr. (DT26). Tap chi Sinh hoc, 40(2): 233–243. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.11071>.

**Corresponding author email:* ddhong60vn@yahoo.com

Received 11 January 2018, accepted 30 September 2018