

THE IMPACT OF ZEROVALENT COBALT NANOPARTICLE ON PHOTOSYNTHESIS - RELATED GENES EXPRESSION IN SOYBEAN LEAVES *Glycine max* (L.) Merr. (DT26)

Luu Thi Tam¹, Hoang Thi Minh Hien¹, Hoang Thi Lan Anh¹,
Phan Hoang Tuan², Dang Diem Hong^{1,3,*}

¹Institute of Biotechnology, VAST, Vietnam

²University of Science, University of Thai Nguyen, Thai Nguyen, Vietnam

³Graduate University of Science and Technology, VAST, Vietnam

Received 8 January, accepted 20 March 2019

ABSTRACT

Photosynthesis is an important physiological process in plants. It plays a crucial role in plant growth and development. In this study, we investigated the impact of zerovalent cobalt nanoparticles on the photosynthesis and expressing of gene involving in this process in leave of soybean *Glycine max* (L.) Merr “DT26” at different growth stages. The results showed that treatment of zerovalent cobalt nanoparticles made in Vietnam and USA (with two doses of 0.17 and 16.67 mg/kg of soybean seed) enhanced the photosynthesis of soybean by increasing the content of chlorophyll a and the ratio of Fv/Fm compared with the control (without treatment of zerovalent cobalt nanoparticles). These values tended to increase and reached the maximum value at 40 days and then decreased in at 70 days. The expression level of photosynthesis-related genes of soybean leaves also changed depending on the soybean’s growth stage and concentration of zerovalent cobalt nanoparticles being treated. The genes *psaA*, *Lhca*, *psaB*, *Cytb6f* (belonging to photosystem I) and *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE* (belonging to photosystem II) in the experimental fomulas were higher expressed than that in control group at 20 and 70 days. However, at 40 days, the expression levels of these genes were significantly different. Obtained results supplied the basis for understanding the active mechanism of the above genes to control/regulates photosynthetic activity of plants with and without the presence of zerovalent cobalt nanoparticles as well as under stress conditions.

Keywords: *Glycine max*, cobalt nanoparticles, *Cytb6f*, Fv/Fm, *Lhca*, photosynthesis, *psaA*, *psaB*, *psbA-E*, genes.

Citation: Luu Thi Tam, Hoang Thi Minh Hien, Hoang Thi Lan Anh, Phan Hoang Tuan, Dang Diem Hong, 2019. The impact of zerovalent cobalt nanoparticle on photosynthesis - related genes expression in soybean leaves *Glycine max* (L.) Merr. (DT26). *Tap chi Sinh hoc*, 41(1): 141–152. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v41n1.13540>.

*Corresponding author email: ddhong60vn@yahoo.com/ddhong@ibt.ac.vn

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

TÁC ĐỘNG CỦA HẠT NANO COBALT HÓA TRỊ 0 LÊN MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA MỘT SỐ GEN CHÍNH LIÊN QUAN ĐẾN HOẠT TÍNH QUANG HỢP Ở LÁ CÂY ĐẬU TƯƠNG *Glycine max* (L.) Merr. (DT26)

Lưu Thị Tâm¹, Hoàng Thị Minh Hiền¹, Hoàng Thị Lan Anh¹,
Phan Hoàng Tuấn², Đặng Diễm Hồng^{1,3,*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, Thái Nguyên, Việt Nam

³Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

Ngày nhận bài 8-1-2019, ngày chấp nhận 20-3-2019

TÓM TẮT

Quang hợp là một quá trình sinh lý quan trọng và là cơ sở của sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá tác động của hạt nano cobalt hóa trị 0 lên quang hợp và mức độ biểu hiện của các gen chính liên quan đến quang hợp của lá cây đậu tương *Glycine max* (L.) Merr. ‘DT26’ ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Kết quả thu được cho thấy hạt nano cobalt (với 2 mức liều 0,17 và 16,67 mg/kg hạt do Việt Nam và Mỹ sản xuất) có tác động tích cực lên quang hợp của lá đậu tương thông qua tăng hàm lượng chlorophyll a và hiệu suất quang hóa cực đại (Fv/Fm) so với lô đối chứng. Các giá trị này có xu hướng tăng dần và đạt giá trị cực đại tại thời điểm 40 ngày, sau đó giảm dần ở thời điểm 70 ngày. Mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến hoạt tính quang hợp của lá đậu tương cũng thay đổi theo thời gian sinh trưởng và nồng độ cobalt xử lý. Các gen thuộc quang hệ I (*psaA*, *Lhca*, *psaB*), quang hệ 2 (*psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*) và cytochrome B₆F (*Cytb6f*) ở lô thí nghiệm đều có mức độ biểu hiện cao hơn so với lô đối chứng tại thời điểm 20 và 70 ngày. Tuy nhiên, tại thời điểm 40 ngày, mức độ biểu hiện của các gen này lại có sự khác biệt đáng kể. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để hiểu biết về chức năng và cơ chế điều hòa của các gen nêu trên nhằm cải thiện khả năng quang hợp của thực vật dưới điều kiện có và không có mặt hạt cobalt hóa trị 0 cũng như ở những điều kiện bất lợi.

Từ khóa: *Glycine max*, gen *psaA*, *Lhca*, *psaB*, *Cytb6f*, *psbA-E*, Fv/Fm, nano cobalt, quang hợp.

*Địa chỉ liên hệ email: ddhong60vn@yahoo.com/ddhong@ibt.ac.vn

MỞ ĐẦU

Đậu tương, một cây trồng kinh tế quan trọng trên thế giới, là nguồn cung cấp protein và dầu thực vật chủ lực. Sản lượng và chất lượng của đậu tương chịu ảnh hưởng nhiều bởi điều kiện môi trường bất lợi, kể cả tác nhân sinh học và phi sinh học. Việc sử dụng các phương pháp hiện đại như công nghệ nano để tăng năng suất cây đậu tương đang là hướng đi tiềm năng. Các hạt nano (sắt, đồng, mangan, kẽm, cobalt, selen... và các dạng oxit của nó)

thường được sử dụng như một chất kích thích sinh trưởng thực vật và vi dinh dưỡng. Ưu điểm của chúng là có kích thước nhỏ, diện tích bề mặt lớn, dễ hấp thu và nồng độ sử dụng thấp, có khả năng kích hoạt các quá trình trao đổi chất trong cơ thể động thực vật. Đối với cây họ đậu, cobalt đóng một vai trò thiết yếu trong sinh trưởng phát triển của cây bằng cách điều chỉnh việc sử dụng nước và giảm tốc độ thoát hơi nước của cây, đặc biệt là cho sự hình thành nốt sần và quá trình cố định nitơ (DalCorso et al., 2014). Nó là một yếu tố thiết

yếu để tổng hợp các enzyme và coenzyme khác nhau như vitamin B₁₂ (cyanocobalamin), cần thiết cho dinh dưỡng của người và động vật (Collins & Kinsela, 2011). Gad et al. (2013) đã công bố sản lượng đậu tương tăng 42,5% khi cây được xử lý với dung dịch cobalt ở nồng độ 12 mg/L. Cobalt đã được chứng minh có ảnh hưởng đến tăng trưởng và trao đổi chất của thực vật ở các mức độ khác nhau tùy thuộc vào nồng độ và trạng thái của chúng. Jayakumar (2009) đã chỉ ra năng suất đậu tương chỉ tăng khi bổ sung cobalt ở nồng độ thấp (50 mg cobalt/kg đất). Khi xử lý ở nồng độ cobalt cao (100–250 mg/ kg đất) lại làm giảm đáng kể năng suất đậu tương.

Quang hợp ở thực vật là quá trình hấp thụ và chuyển đổi năng lượng ánh sáng mặt trời thành năng lượng liên kết hóa học được tích lũy dưới dạng các hợp chất hữu cơ nhờ bộ máy quang hợp (Chia & He, 1999). Hiệu quả của quá trình quang hợp phụ thuộc vào khả năng hấp thụ, vận chuyển năng lượng ánh sáng về tâm phản ứng của quang hệ II (PSII) và hiệu suất chuyển đổi năng lượng ánh sáng mặt trời thành sinh khối cây trồng. Một số nghiên cứu cũng chứng minh rằng các gen liên quan với hệ thống quang hợp (quang hệ I - PSI và quang hệ II - PSII) rất nhạy cảm với môi trường bất lợi như hạn, mặn (Chaves et al., 2009), ánh sáng và nhiệt độ cao (Murchie et al., 2005). Các protein liên quan đến cấu trúc và chức năng của quá trình quang hợp cũng bị ức chế do điều kiện môi trường bất lợi về nhiệt gây ra (Ahsan et al., 2010). Các yếu tố môi trường bất lợi làm chậm quá trình quang hợp ở thực vật thông qua việc thay đổi cấu trúc lục lạp và giảm hàm lượng sắc tố quang hợp. Năng lượng ánh sáng hấp thụ bởi các sắc tố quang hợp như chlorophyll không được sử dụng hiệu quả bởi các hệ thống PSI và PSII dẫn đến hiệu suất quang hợp thấp và làm giảm năng suất của thực vật.

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về ảnh hưởng của hạt nano cobalt lên khả năng nảy mầm, kéo dài rễ, sinh trưởng, một số thông số về quang hợp và hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa và năng suất của cây đậu tương đã được thực hiện (Ngo et al., 2014; Trần Mỹ Linh và nnk., 2018; Phan Hoàng

Tuấn và nnk., 2018a, b). Tuy nhiên, các nghiên cứu về sự biểu hiện của một số gen chính liên quan đến quang hợp ở lá cây đậu tương dưới tác động của các hạt nano cobalt hoàn toàn chưa được thực hiện. Để góp phần lý giải tác động tích cực của hạt nano cobalt lên việc tăng năng suất của cây đậu tương thông qua tăng hoạt động quang hợp, chúng tôi đã tiến hành đánh giá mức độ biểu hiện của một số gen mã hóa cho các protein nằm trong trung tâm phản ứng của PSI và PSII, phức hợp thu nhận ánh sáng và chuỗi vận chuyển điện tử trong mạch vận chuyển quang hợp như *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*, *Cyt b6/f* và *Lhca* của giống đậu tương DT26 ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau trong điều kiện có và không có mặt của hạt nano cobalt hóa trị 0.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Giống đậu tương DT26 (*Glycine max* (L.) Merr. 'DT26') do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành với 5 công thức: Đối chứng (ký hiệu ĐC), xử lý bằng nước RO; thí nghiệm-xử lý với hạt nano cobalt do Việt Nam (VN) và Mỹ (USA) chế tạo với 2 liều là 0,17 và 16,67 mg/kg hạt tương ứng với nồng độ kích thích (KTVN và KTUSA) và ức chế (UCVN và UCUSA) như đã mô tả chi tiết trong công bố Phan Hoàng Tuấn và nnk. (2018a). Mỗi công thức lặp lại 5 lần.

Tại thời điểm 20, 40 và 70 ngày sau gieo, tiến hành thu các mẫu lá ở lô đối chứng và lô thí nghiệm được xử lý với hạt nano cobalt hóa trị 0 ở các nồng độ khác nhau. Các mẫu lá tươi sau khi thu được giữ ở (-)20°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm (Phan Hoàng Tuấn và nnk., 2018a).

Xác định hàm lượng chlorophyll a ở lá đậu tương

Lá đậu tương non hoàn chỉnh nhát thu tại các thời điểm 20, 40 và 70 ngày sau gieo được tách chiết chlorophyll. Qui trình tách chiết chlorophyll được mô tả chi tiết theo công bố của Phan Hoàng Tuấn và nnk. (2018a).

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). Điều kiện đo cụ thể như mô tả trong công bố của Phan Hoàng Tuấn và nnk. (2018a). Hiệu suất lượng tử quang hóa cực đại đặc trưng cho phần năng lượng ánh sáng hấp thụ bằng PSII được sử dụng tối đa trong phản ứng quang hóa được thể hiện bằng tỷ lệ F_v/F_m

với $F_v = F_m - F_o$. Trong đó, F_m - huỳnh quang cực đại, F_o - huỳnh quang ổn định.

Phương pháp tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số của lá đậu tương DT26 được tách chiết bằng kit RNAiso plus (Takara, Tokyo, Nhật Bản) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp cDNA từ khuôn RNA tổng số

cDNA được tổng hợp trên khuôn RNA sử dụng kit RevertAid First Strand cDNA (Singapore), thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Lượng RNA làm khuôn mẫu cho một phản ứng tổng hợp cDNA là 1 μ g.

Bảng 1. Trình tự cặp mồi đặc hiệu để nhân các gen biểu hiện liên quan đến hoạt tính quang hợp ở cây đậu tương DT26 [Nguồn: Teixeira et al. (2016)]

TT	Gen	ID gen	Locus tag	Kích thước dự đoán (bp)	Mồi xuôi (F)	Mồi ngược (R)
1	<i>Lhca</i>	100815789	Glyma14g008000	155	ACCCATGGCACAACAACA	ACAGCACAGCGATACAAC
2	<i>psaA</i>	3989266	GlmaCp011	149	AGCAACTCCCTTTTCACC	GACCCGCTATCAAGAAAGAAT
3	<i>psaB</i>	3989267	GlmaCp012	180	TGGTGTATTATCAGTGGTGGT	TGATGATTGAGGCGGGATT
4	<i>psbA</i>	3989259	GlmaCp001	184	GCAAACCTATAGCCGCAGA	GGATGGTTTGGTGTTTGATGA
5	<i>psbB</i>	3989323	GlmaCp047	101	CCCTCTGACCCTGTCTTT	ATATCCAACCGCCCCAC
6	<i>psbC</i>	3989283	GlmaCp015	119	CCTAGTAGTTTGCCGGAT	CACGTGGAAACGCTCTTTA
7	<i>psbD</i>	3989284	GlmaCp016	130	AACGAAGTCATAGGCACG	CTTTGGGGTTGCTTTTCC
8	<i>psbE</i>	3989313	GlmaCp037	105	AATTCCTTGTCGGCTCTCTG	TCCCTATTCATTGCAGGTTGG
9	<i>Cyt b6f</i>	3989327	GlmaCp051	169	CGTCCCTCTGTTGTCATGT	GGAGAGGTGATGGTGAAAAGTT
10	<i>β-actin</i>	CA937380	Glyma18g52780	152	GATCTTGCTGGTCTGTGATCT	GTCTCCAACCTCTTGCTCATAGTC

RT-PCR bán định lượng khuếch đại các gen liên quan đến hoạt tính quang hợp ở cây đậu tương DT26

RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) bán định lượng được thực hiện với khuôn là cDNA được tổng hợp từ RNA của các mẫu lá đậu tương thu ở các công thức đối chứng và thí nghiệm

tại các thời điểm 20, 40 và 70 ngày. Các cặp mồi đặc hiệu cho các gen chính liên quan đến hoạt tính quang hợp như *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*, *psaA*, *psaB*, *Cytb6f* và *Lhca* được trình bày ở bảng 1. Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 20 μ L bao gồm 1 μ L cDNA, 10 μ L Master Mix (10X); 1 μ L mồi F (10 pmol), 1 μ L mồi R (10 pmol), 7 μ L H₂O. Chu trình nhiệt được thực hiện như

sau: Bước 1: 95°C, 5 phút; bước 2: 95°C, 30 giây; bước 3: 49°C, 30 giây (đối với các gen *psbA*, *psbC*, *psbD*, *psbE*, *psaA*, *psaB*) và 52°C, 30 giây (đối với các gen *psbB*, *Cyt b6f*, *Lhca*); bước 4: 72°C, 1 phút 30 giây; bước 5: Lặp lại 35 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; bước 6: 72°C, 5 phút, bước 7: Giữ sản phẩm ở 15°C cho tới khi sử dụng. Sử dụng β -actin như là gen tham chiếu để chuẩn hóa số liệu. Điều kiện nhân gen β -actin là tương tự với từng gen nêu trên. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2%, nhuộm với ethidium bromide, sau đó được chụp ảnh và xử lý bằng phần mềm phân tích Gel pro32 Analyzer.

Xử lý số liệu

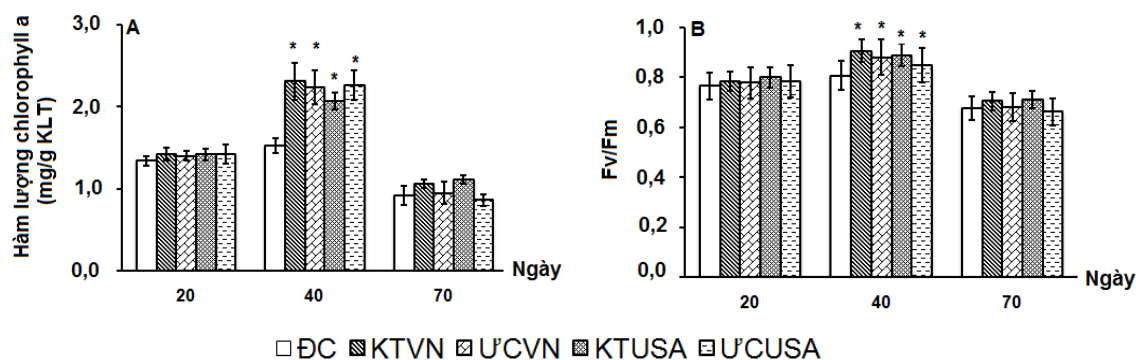
Mức độ biểu hiện của các gen được đánh giá thông qua diện tích và độ đậm nhạt của các băng sau điện di bằng phần mềm phân tích Gel pro32 Analyzer để định lượng gián tiếp hàm lượng của các băng. Tỷ lệ độ đậm băng của các gen *psaA*, *psaB*, *psbA-E*, *Cytb6f* và *Lhca* ở từng thời điểm tại mỗi công thức thí nghiệm sẽ được chuẩn hóa với gen β -actin tương ứng và so sánh với công thức đối chứng (không được xử lý hạt nano cobalt). Số liệu được trình bày bằng MEAN \pm SEM. Các kết quả thu được 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 và hiệu suất quang hóa cực đại (Fv/Fm) của lá đậu tương ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau dưới tác động của hạt nano cobalt hóa trị 0

Tốc độ quang hợp của thực vật liên quan trực tiếp đến mật độ và kích thước của các ăng ten thu nhận ánh sáng, cụ thể là các phân tử sắc tố chlorophyll (Shao et al., 2014). Khi phân tử chlorophyll a hấp thụ năng lượng ánh sáng, chúng sẽ chuyển từ trạng thái cơ bản lên trạng thái kích thích. Phân tử chlorophyll a ở trạng thái kích thích sẽ mất năng lượng bằng một số quá trình như mất nhiệt, phát huỳnh quang và thực hiện phản ứng quang hóa. Tổng hằng số của các phản ứng nêu trên là không đổi. Nếu coi quá trình mất nhiệt là như nhau ở mọi điều kiện thí nghiệm thì hiệu quả quang hợp của thực vật có thể được đánh giá thông qua huỳnh quang của chlorophyll a trong lá cây. Kết quả về sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a và tỷ lệ Fv/Fm của cây đậu tương ở các giai đoạn khác nhau dưới tác động của hạt nano cobalt được trình bày trên hình 1.



Hình 1. Sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a (A) và tỷ lệ Fv/Fm (B) của lá cây đậu tương DT26 ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau khi có và không có mặt hạt nano cobalt. Dấu “*” chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở lô thí nghiệm so với lô ĐC ($P < 0,05$)

Kết quả chỉ ra trên hình 1A đã cho thấy việc xử lý hạt đậu tương DT26 với dung dịch hạt nano cobalt của Việt Nam và Mỹ đều có

tác động tích cực lên quang hợp của cây đậu tương thông qua tăng hàm lượng chlorophyll a so với lô đối chứng. Hàm lượng chlorophyll a

có xu hướng tăng dần và đạt cực đại ở thời điểm 40 ngày sau gieo. Sau đó, hàm lượng này giảm mạnh khi cây đậu tương chuyển sang giai đoạn sinh trưởng sinh thực (70 ngày sau gieo). Không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học về hàm lượng chlorophyll a giữa lô ĐC và thí nghiệm ở thời điểm 20 và 70 ngày ($P > 0,05$). Tuy nhiên, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sinh học về hàm lượng chlorophyll a giữa các lô xử lý với hạt nano cobalt so với lô ĐC được thể hiện rõ rệt tại thời điểm 40 ngày ($P < 0,05$). Điều này có thể do việc xử lý hạt nano cobalt đã giúp hỗ trợ quá trình tổng hợp chlorophyll và hạn chế sự phân hủy của nó ở trong tối (Abdul Jaleel et al., 1999). Kết quả của chúng tôi cũng tương đồng với công bố của Ngo et al. (2014) cho thấy hàm lượng chlorophyll của cây đậu tương DT51 tăng khoảng 10% so với đối chứng khi hạt được xử lý với dung dịch hạt nano cobalt ở nồng độ 0,08 g/ha.

Tỷ lệ Fv/Fm là một tham số huỳnh quang chlorophyll quan trọng, thể hiện hiệu quả sử dụng tối đa năng lượng ánh sáng được hấp thụ bởi sắc tố trong phản ứng quang hóa ở PSI và II và được sử dụng như là một chỉ thị để phát hiện sớm những thay đổi về cấu trúc và chức năng của bộ máy quang hợp của thực vật dưới điều kiện sinh lý bình thường và điều kiện bất lợi (Qiu et al., 2013). 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 cobalt được chỉ ra ở hình 1B. Xu hướng thay đổi của hiệu suất quang hóa cực đại cũng tương tự như hàm lượng chlorophyll. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa lô ĐC và lô xử lý hạt nano cobalt ở nồng độ 0,17 mg/kg hạt ($P < 0,05$) tại thời điểm 40 ngày sau gieo. Kết quả này cho thấy xử lý hạt đậu tương với dung dịch nano cobalt đã giúp việc sử dụng năng lượng ánh sáng trong phản ứng quang hóa ở PSII đạt hiệu quả cao hơn dẫn tới tăng tỷ lệ Fv/Fm.

Mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến quang hợp ở lá cây đậu tương DT26 dưới tác động của hạt nano cobalt

Các yếu tố môi trường bất lợi đều ảnh hưởng lớn đến quang hợp. Vì vậy, thực vật luôn có cơ chế tự bảo vệ bằng cách thay đổi

mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến hoạt động của PSI và PSII để bảo vệ bộ máy quang hợp, làm giảm nhẹ ảnh hưởng của các yếu tố môi trường gây ức chế quang hợp và cân bằng nội môi tế bào (Wang et al., 2014).

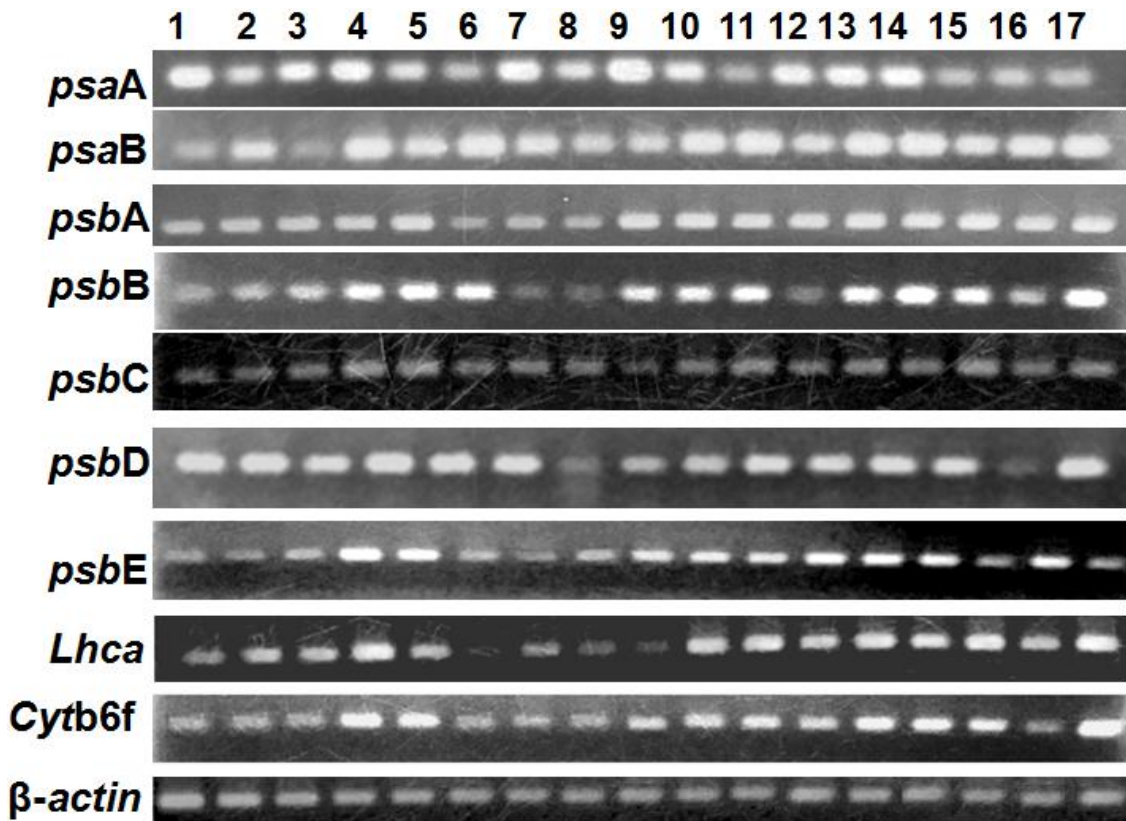
Lõi của PSII gồm 2 protein D1 và D2 (được mã hóa bởi gen *psbA* và *psbD*) liên kết thành heterodimer nằm ngay giữa trung tâm phản ứng PSII được ký hiệu là phân tử huỳnh quang P_{680} , là chất nhận điện tử sơ cấp trong mạch vận chuyển điện tử quang hợp. Chúng cùng với một số các phân tử sắc tố chlorophyll a, β -caroten và sắt..., tạo nên tâm phản ứng của PSII. Tất cả được kết nối thành một mạch vận chuyển điện tử [Mn] 4, TyrZ, pheophytin a, QA, QB và nonheme. Trong khi đó, 2 loại protein khác (được mã hóa bởi hai gen *psbB* và *psbC*) liên kết mảng với các phân tử chlorophyll và β -carotene dưới dạng phức hợp thu nhận ánh sáng, CP47 và CP43 (Barber et al., 1997). Sự thay đổi mức độ biểu hiện của các gen này sẽ ảnh hưởng đến chức năng quang hợp như hiệu suất lượng tử của quang hợp và thay đổi hoạt tính quang hợp (Luciński & Jackowski, 2006). PSI (theo sau PSII trong chuỗi vận chuyển điện tử quang hợp), là chất nhận điện tử từ phức hợp cytochrom b6f và chuyển chúng đến ferredoxin để sản xuất các phân tử có hiệu năng cao như NADPH. Sau đó, chúng tiếp tục được sử dụng trong các phản ứng tối để cố định CO_2 theo chu trình Calvin Benson. Các thành phần của PSI được mã hóa bởi các gen lục lạp và gen nhân như *psaA*, *psaB*, *Lhca*, có chức năng thu nhận ánh sáng và vận chuyển năng lượng được hấp thụ tới lõi của PS II (Berry et al., 2013).

Kết quả về điện di sản phẩm PCR nhân các gen *psaA-B*, *psbA-E*, *Cytb6f* và *Lhca* mã hóa cho các protein liên quan đến bộ máy quang hợp ở cây đậu tương DT26 được chỉ ra ở hình 2. Mức độ biểu hiện của các gen nêu trên của lá cây đậu tương DT26 ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau dưới điều kiện có và không có mặt của hạt nano cobalt hóa trị 0 được chỉ ra ở bảng 2 và hình 3.

Kết quả chỉ ra ở bảng 2 và hình 3 cho thấy khi xử lý hạt nano cobalt của Việt Nam và Mỹ ở cả 2 nồng độ kích thích (0,17 mg/kg hạt) và

ức chế (16,67 mg/kg hạt), cả 9 gen liên quan đến hoạt tính quang hợp (thuộc cả PSI và II) đều có xu hướng tăng mức độ biểu hiện (với mức tăng từ 1 đến 1,7 lần tùy từng gen) so với lô ĐC ở giai đoạn 20 và 70 ngày. Tại thời điểm 20 ngày, sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ở mức độ biểu hiện của các gen này ở các lô xử lý hạt cobalt nồng độ 16,67 mg/kg

hạt so với ĐC ($P < 0,05$). Tuy nhiên, ở nồng độ xử lý 0,17 mg/kg hạt thì mức độ sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Tại thời điểm 70 ngày, việc xử lý hạt nano cobalt đều làm tăng biểu hiện của các gen liên quan đến hoạt tính quang hợp của cây đậu tương ($P < 0,05$).



Hình 2. Ảnh điện di nhân gen *psaA-B*, *psbA-E*, *Cytb6f* và *Lhca* mã hóa cho các protein liên quan đến bộ máy quang hợp ở cây đậu tương DT26

Giếng 1–17 tương ứng với mẫu:

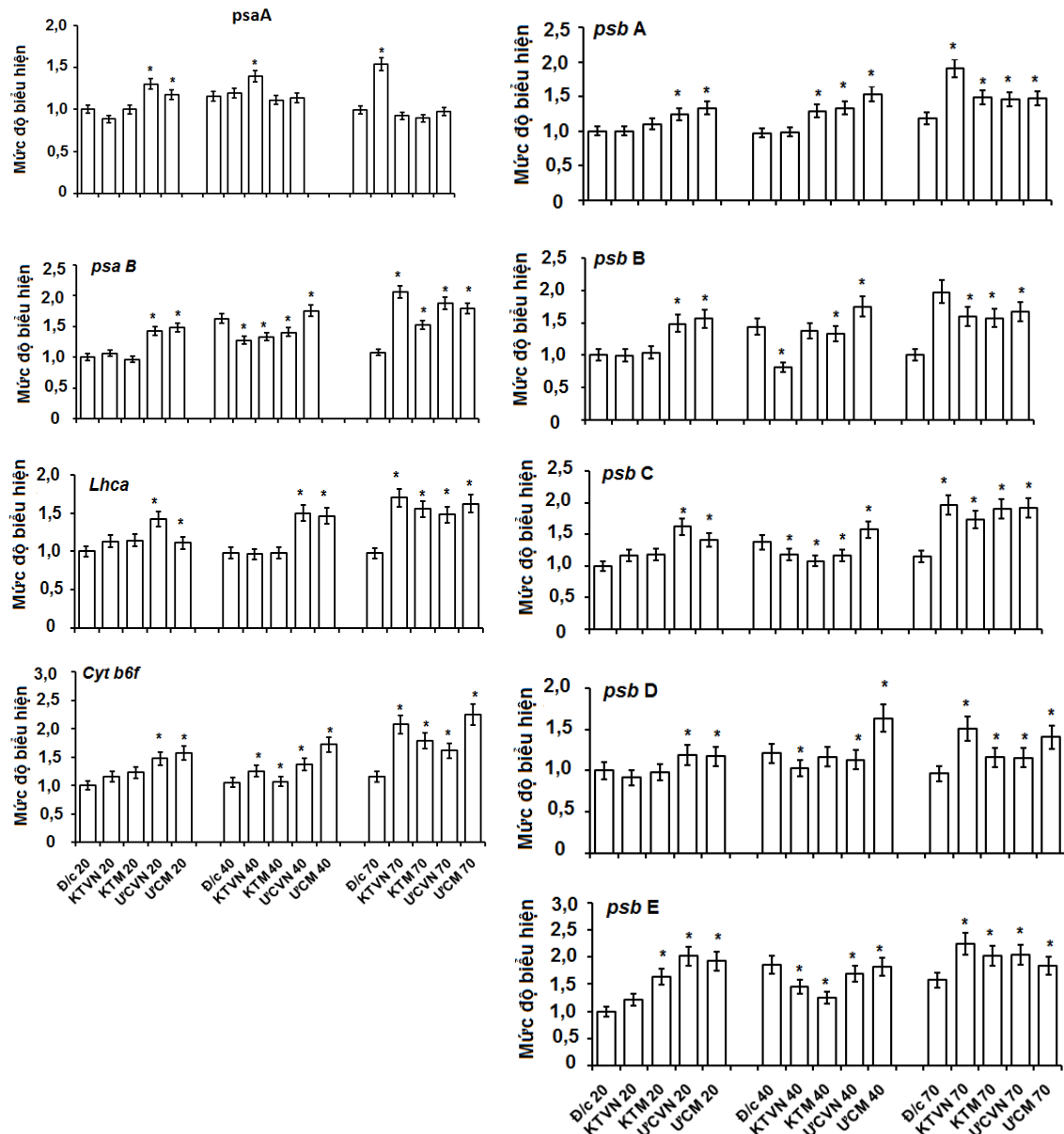
- | | | |
|--------------------|--------------------|---------------------|
| 1: ĐC- 20 ngày | 6: ĐC- 40 ngày | 12: ĐC- 70 ngày |
| 2: KTVN - 20 ngày | 8: KTVN - 40 ngày | 14: KTVN - 70 ngày |
| 3: KTUSA - 20 ngày | 9: KTUSA - 40 ngày | 15: KTUSA - 70 ngày |
| 4: ƯCVN - 20 ngày | 10: ƯCVN - 40 ngày | 16: ƯCVN - 70 ngày |
| 5: ƯCUSA- 20 ngày | 11: ƯCUSA- 40 ngày | 17: ƯCUSA- 70 ngày |

Ở giai đoạn 40 ngày, là thời điểm quang hợp của cây đậu tương đạt cực đại, sự biểu hiện của các gen này có sự sai khác rõ rệt. Đối với các gen *Lhca*, *psaA* (thuộc PSI, có chức năng thu nhận ánh sáng và vận chuyển điện tử), gen *cytb6f* (thuộc phức hợp cytochrome)

và gen *psbA* (mã hóa cho protein D1 của PSII có chức năng vận chuyển điện tử) có xu hướng biểu hiện tăng ở lô được xử lý hạt nano cobalt so với lô ĐC (ngoại trừ lô xử lý hạt nano cobalt Mỹ ở nồng độ 16,67 mg/kg hạt). Như vậy, tại thời điểm quang hợp tăng thì

mức độ biểu hiện của các gen mã hóa cho các protein liên kết với sắc tố để thu nhận ánh sáng trong PSI cũng tăng, tức là quá trình vận chuyển điện tử trong PSI được tăng cường. Ngược lại, các gen *psaB* (thuộc PSI, có chức năng vận chuyển điện tử trong mạch vận chuyển điện tử quang hợp), các gen *psbB-E* (mã hóa cho protein của tâm phản ứng PSII,

có chức năng vận chuyển điện tử trong mạch vận chuyển điện tử quang hợp) lại có mức độ biểu hiện gen giảm so với lô ĐC. Kết quả này có thể do tốc độ vận chuyển điện tử của protein được mã hóa bởi các gen *psaB*, *psbB-E*, tham gia vào phản ứng sáng của quá trình quang hợp có xu hướng giảm khi hoạt tính quang hợp của cây tăng.



Hình 3. Mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến hoạt tính quang hợp của cây đậu tương DT26 ở các giai đoạn khác nhau khi có và không có mặt hạt nano cobalt. Dấu "*" chỉ sự sai có ý nghĩa thống kê ở lô thí nghiệm so với lô ĐC ($P < 0,05$)

Bảng 2. Mức độ biểu hiện của các gen chính liên quan đến hoạt tính quang hợp ở lá cây đậu trong DT26 ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau

Gen	Mã hóa protein	Chức năng	Mức độ biểu hiện gen		
			20 ngày	40 ngày	70 ngày
Quang hệ I					
<i>psaA</i>	Apoprotein A1	Vận chuyển điện tử	+	+	+
<i>psaB</i>	Apoprotein A2	Vận chuyển điện tử	+	-	+
<i>Lhca</i>	Protein gắn với sắc tố	Thu nhận ánh sáng	+	+	+
Quang hệ II					
<i>psbA</i>	Protein D1	Vận chuyển điện tử	+	+	+
<i>psbB</i>	Protein của trung tâm phản ứng CP47	nt	+	-	+
<i>psbC</i>	Protein của trung tâm phản ứng CP43	nt	+	-	+
<i>psbD</i>	Protein D2	nt	+	-	+
<i>psbE</i>	Tiểu phân α của Cytochrome b559	nt	+	-	+
<i>Cyt6f</i>	Protein PET A	nt	+	+	+

Ghi chú: nt: Như trên; dấu (-): Giảm mức độ biểu hiện gen; dấu (+): Tăng mức độ biểu hiện gen ở công thức thí nghiệm so với công thức đối chứng. PET: Photosynthetic electron transport - vận chuyển điện tử quang hợp; Vị trí và chức năng của các gen tham khảo theo công bố của Berry et al. (2013).

Trong cùng một công thức, biểu hiện của các gen liên quan đến quang hợp cũng có xu hướng khác nhau (hình 4).

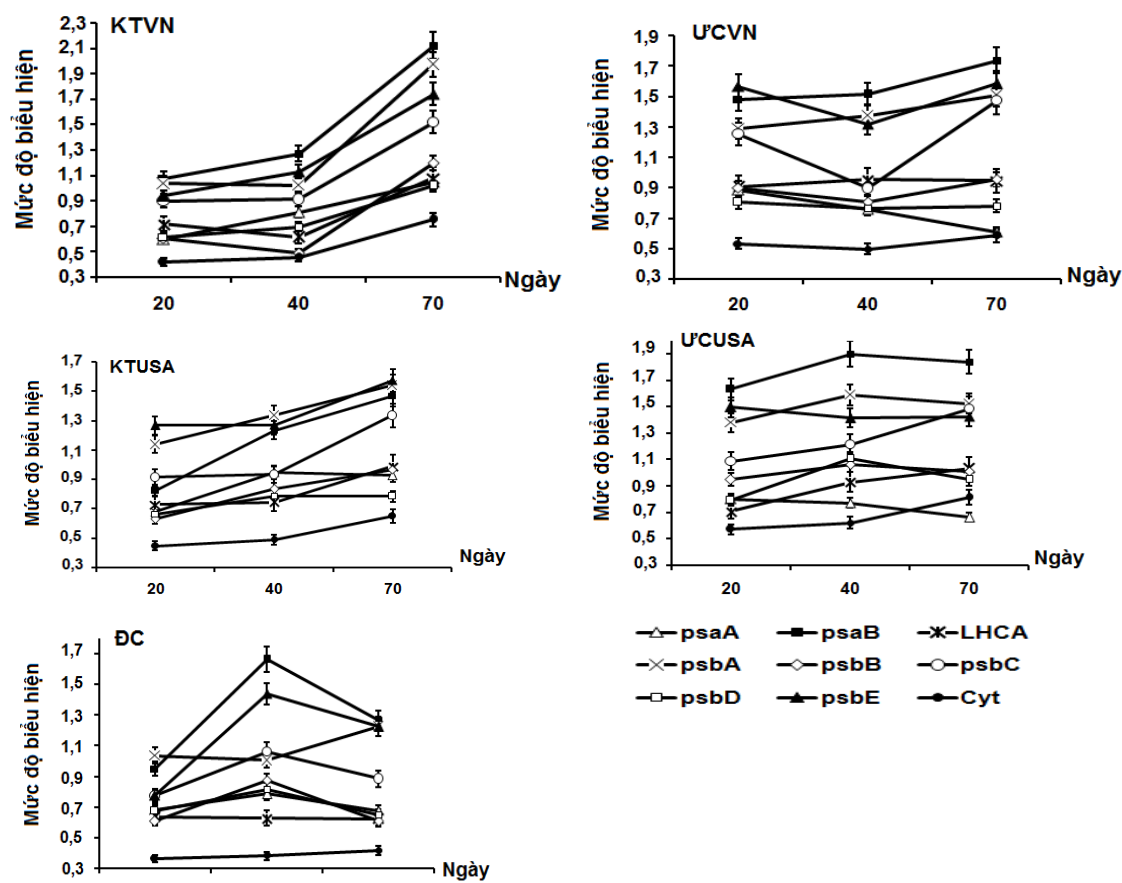
Ở lô ĐC, mức độ biểu hiện của các gen *psaA*, *psaB*, *psbA-E* có tương quan chặt với hàm lượng chlorophyll a. Khi hàm lượng chlorophyll a đạt cực đại tại thời điểm 40 ngày, hoạt động của các gen này cũng đạt cao nhất. Ngoại trừ 2 gen *Lhca* và *Cyt6f* có xu hướng ổn định trong suốt thời gian sinh trưởng của cây đậu tương. Ở lô xử lý hạt nano cobalt ở nồng độ 0,17 mg/kg hạt (KTVN và KTUSA), tất cả 9 gen liên quan đến quang hợp đều có mức độ biểu hiện thay đổi không đáng kể giữa thời điểm 20 đến 40 ngày. Tuy nhiên, tại thời điểm 70 ngày, tất cả các gen này đều được tăng cường hoạt động. Có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức độ biểu hiện của các gen tại thời điểm 40 và 70 ngày ($P < 0,05$). Khi tăng nồng độ cobalt xử lý (16,67 mg/kg hạt), sự thay đổi biểu hiện của các gen ở các thời điểm khác nhau là không nhiều và sự sai khác không có ý nghĩa thống kê sinh học ($P > 0,05$). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy hiệu quả tác động của hạt nano cobalt của Việt Nam và Mỹ ở cả 2 liều

0,17 và 16,67 mg/kg hạt là không có sự khác biệt. Ngay cả liều xử lý cao 16,67 mg/kg hạt đều chưa phát hiện thấy tác động tiêu cực đến bộ máy quang hợp của cây đậu tương DT26.

Một số nghiên cứu trên thế giới cũng cho thấy cobalt ở nồng độ thấp có ảnh hưởng tích cực lên sinh trưởng cũng như tốc độ vận chuyển điện tử trong mạch vận chuyển điện tử quang hợp (Mohanty et al., 1989; Ali et al., 2010). Mohanty et al. (1989) đã đưa ra giả thuyết rằng tác dụng của cobalt lên quang hợp có thể do chúng có vai trò thay đổi chức năng của Q_B trong mạch vận chuyển điện tử, dẫn đến ảnh hưởng lên hoạt động của quang hợp. El-Sheekh et al. (2003) đã công bố về ảnh hưởng của nồng độ cobalt lên sinh trưởng, hàm lượng sắc tố và mạch vận chuyển điện tử trong quang hợp của 2 loài tảo *Monoraphidium minutum* và *Nitzschia perminuta*. Kết quả cho thấy cobalt kích thích sinh trưởng và hàm lượng sắc tố của 2 loài tảo này ở nồng độ thấp (0,1–0,5 ppm). Cobalt ảnh hưởng trực tiếp lên phức hợp P_{680} của mạch vận chuyển điện tử trong PSII. Có sự thay đổi trong việc phân phối năng lượng kích thích có lợi cho hệ thống PSI. Điều này cũng có thể

dẫn tới sự tăng cường tổng hợp phân tử ATP thông qua quá trình vận chuyển điện tử vòng trong mạch vận chuyển điện tử quang hợp dẫn tới tăng cường/kích thích sự tích lũy carbon vô cơ trong các tế bào sinh trưởng khi nồng độ cobalt thấp. Tuy nhiên, để hiểu rõ hơn cơ

chế phân tử của hạt nano cobalt tác động lên hoạt động quang hợp ở cây đậu tương DT26 cần phải có những nghiên cứu sâu hơn nữa ở các sản phẩm mã hóa bởi các gen liên quan đến quang hợp của PSI và PSII nêu trên.



Hình 4. Mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến hoạt tính quang hợp của cây đậu tương DT26 ở công thức khác nhau khi có và không có mặt hạt nano cobalt

KẾT LUẬN

Hạt nano cobalt hóa trị 0 với nồng độ 0,17 và 16,67 mg/kg hạt có ảnh hưởng tích cực lên hoạt động quang hợp của cây đậu tương DT26 thông qua tăng hàm lượng chlorophyll a và hiệu suất quang hóa cực đại, Fv/Fm. Không có sự khác biệt về hiệu quả tác động lên quang hợp giữa hạt nano cobalt do Việt Nam và Mỹ sản xuất.

Mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến hoạt tính quang hợp của lá đậu tương

cũng thay đổi theo thời gian sinh trưởng và nồng độ cobalt xử lý. So với lô đối chứng, các gen *psaA*, *Lhca*, *Cytb6f* (thuộc quang hệ I) và gen *psbA* (thuộc quang hệ II) của lô thí nghiệm có xu hướng biểu hiện tăng dần trong suốt thời gian sinh trưởng của cây. Các gen mã hóa cho các protein thuộc quang hệ II như *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE* và gen *psaB* (thuộc quang hệ I) lại có xu hướng tăng mức độ biểu hiện ở thời điểm 20 và 70 ngày và giảm biểu hiện ở thời điểm 40 ngày. Ngay ở nồng độ xử lý cao 16,67 mg hạt nano cobalt/kg hạt cũng

chưa ảnh hưởng tiêu cực đến chức năng quang hợp của cây đậu tương DT26.

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 KHCNVN “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp”. Tác giả xin được cảm ơn GS.TS. Choon-Hwan Lee (Khoa sinh học phân tử, Đại học Quốc gia Pusan, Hàn Quốc) về những trao đổi quý báu trong việc xử lý các số liệu biểu hiện của các gen.

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.
- Ahsan N., Donnart T., Nouri M. Z., Komatsu S., 2010. Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. *J. Proteome. Res.*, 9(8): 4189–4204.
- Ali B., Hayat S., Hayat Q., Ahmad A., 2010. Cobalt stress affects nitrogen metabolism, photosynthesis and antioxidant system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Plant Interact*, 5(3): 22–231.
- Barber J., Nield J., Morris E.P., Zheleva D., Hankamer B., 1997. The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol. Plant*, 100: 817–827.
- Berry J. O., Yerramsetty P., Zielinski A. M., Mure C. M., 2013. Photosynthetic gene expression in higher plants. *Photosynth. Res.*, 117(1-3): 91–120.
- Chaves M. M., Flexas J., Pinheiro C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.*, 103: 551–560.
- Chia T. F., He J., 1999. Photosynthetic capacity in oncidium (Orchidaceae) plants after virus eradication. *Environ. Exp. Bot.*, 42:11–16.
- Collins R. N., Kinsela A. S., 2011. Pedogenic factors and measurements of the plantuptake of cobalt. *Plant Soil*, 339: 499–512.
- DalCorso G., Manara A., Piasentin S., Furini A., 2014. Nutrient metal elements in plants. *Metallomics*, 6: 1770–1788.
- El-Sheekh M. M., El-Naggar A. H., Osman M. E. H., El-Mazaly E., 2003. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. *Braz. J. Plant Physiol.*, 15(3): 159–166.
- Gad N., El-Moez A., Bekbayeva L. K., Karabayeva A. A., Surif M., 2013. Effect of cobalt supplement on the growth and productivity of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *World Appl. Sci. J.*, 26(7): 926–933.
- Jayakumar K., Abdul Jaleel C., Azooz M. M., Vijayarengan P., Gomathinayagam M., Panneerselvam R., 2009. Effect of different concentrations of Cobalt on morphological parameters and yield components of Soybean. *GJMS*, 4(1): 10–14.
- Trần Mỹ Linh, Phạm Thị Hòe, Nguyễn Thị Thu Hiền, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu, 2018. Đánh giá tác động của hạt nano kim loại đến quá trình nảy mầm của hạt đậu tương trong điều kiện hạn. Báo cáo toàn văn tại Hội nghị Khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2018. Nxb. KHTN&CN, H. Tr. 1539–1545.
- Luciński R., Jackowski G., 2006. The structure, functions and degradation of pigment binding proteins of photosystem II. *Acta Biochim. Pol.*, 53(4): 693–708.
- 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.
- Mohanty N., Vass I., Demeter S., 1989. Impairment of photosystem 2 activity at the level of secondary quinone electron acceptor in chloroplasts treated with cobalt, nickel and zinc ions. *Physiol. Plant*, 76: 386–390.

- Murchie E.H., Hubbart S., Peng S., Horton P., 2005. Acclimation of photosynthesis to high irradiance in rice: gene expression and interactions with leaf development. *J. Exp. Bot.*, 56: 449–460.
- 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: 015016 (7 pp). <https://doi.org/10.1088/2043-6262/5/1/015016>.
- 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.
- Shao Q., Wang H., Guo H., Zhou A., Huang Y., Sun Y., Li M., 2014. Effects of shade treatments on photosynthetic characteristics, chloroplast ultrastructure and physiology of *Anoectochilus roxburghii*. *PloS One*, 9: e85996
- Teixeira R.N., Ligterink W., França-Neto J.D.B., Hilhorst H.W.M, da Silva E.A.A., 2016. Gene expression profiling of the green seed problem in Soybean. *BMC Plant Biology*, 16(1): 37. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0729-0>
- Phan Hoàng Tuấn, Hoàng Thị Lan Anh, Lưu Thị Tâm, Ngô Thị Hoài Thu, Đào Trọng Hiền, Nguyễn Hoài Châu, Đặng Diễm Hồng, 2018a. Đánh giá hiệu quả tác động của hạt nano cobalt hóa trị 0 lên sinh trưởng và các thông số quang hợp của cây đậu tương *Glycine max* (L). Merrill “DT51” ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Báo cáo toàn văn tại Hội nghị Khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2018. Nxb. KHTN&CN, H. Tr. 1331–1338.
- Phan Hoàng Tuấn, Lưu Thị Tâm, Hoàng Thị Lan Anh, Ngô Thị Hoài Thu, Nguyễn Hoài Châu, Đặng Diễm Hồng, 2018b. Nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano coban dạng đơn lẻ và hỗn hợp lên sự thay đổi các thông số quang hợp và hoạt độ của enzyme chống oxy hóa ở cây đậu tương *Glycine max* Merr. (DT26). *Tạp chí Sinh học*, 40(2): 333–343.
- Wang B., Du Q. Z., Yang X., Zhang D., 2014. Identification and characterization of nuclear genes involved in photosynthesis in Populus. *BMC Plant Biol.*, 14(1): 81.