

AMYLaza TRONG HẠT CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CHỊU NÓNG VÀ MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CHỊU HẠN

TRẦN THỊ PHƯƠNG LIÊN, HUỖNH THỊ THU HUỆ,
NÔNG VĂN HẢI, LÊ THỊ MUỘI
Viện Công nghệ sinh học

TRẦN ĐÌNH LONG

Trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm đậu đỗ

Amylaza là nhóm enzym thuỷ phân tinh bột được quan tâm nghiên cứu từ nhiều năm nay trên các cây lương thực như lúa mì, lúa gạo, ngô, khoai, sắn, đậu tương. α -amylaza (EC3.2.1.1) thuỷ phân mối liên kết 1-4 glycozit bên trong phân tử tinh bột một cách ngẫu nhiên, giải phóng glucoza, maltoza, các dextrin với kích thước phân tử (KTPT) khác nhau. β -amylaza (EC3.2.1.2) thuỷ phân mối liên kết 1-4 glycozit của tinh bột từ phía đầu chuỗi, giải phóng maltoza. Vì vậy, α - và β -amylaza đóng vai trò quan trọng trong thời kỳ nảy mầm cũng như tham gia chuyển hoá hydrat cacbon ở lá trong quá trình sống của cây [1]. Sản phẩm chuyển hoá của chúng - các dextrin phân tử lượng thấp, oligosacarit - tham gia vào việc tạo áp suất thẩm thấu trong tế bào và bảo vệ các cấu trúc của tế bào khỏi các tác động cực đoan [2]. Hoạt độ của các enzym thuỷ phân tinh bột được tăng cường dưới tác động của điều kiện mất nước trong giai đoạn hình thành hạt ở cây [3]. Bằng các phương pháp điện di hoạt tính, sắc ký trao đổi ion, người ta đã phát hiện thấy nhiều dạng isozym amylaza trong lá mầm của hạt nảy mầm ở lúa, ngô, đậu tương, Những isozym này thường đặc trưng cho từng loài và có khả năng sử dụng làm chỉ thị phân tử [1].

Trong bài này, chúng tôi nghiên cứu hoạt độ của amylaza tổng số trong thời gian nảy mầm của hạt giống đậu tương chịu nóng M103 và ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ này. Trên cơ sở đó, chúng tôi tìm ra thời điểm thích hợp nhất để tách chiết và nghiên cứu điện di hoạt tính amylaza của các giống đậu tương địa phương có

khả năng chịu nóng, chịu hạn và các tổ hợp lai nhằm phục vụ cho việc chọn lọc trong các thí nghiệm lai tạo sau này.

Công trình này được tiến hành tại Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

I - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Các giống đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr.) địa phương chịu nóng, chịu hạn và các tổ hợp lai được trồng và tiến hành khảo nghiệm tại Trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm đậu đỗ và Trung tâm tài nguyên di truyền thực vật. Các giống đậu tương chịu hạn là Đỗ Lạng, Thúa Lá, Azumpa-Gia Lai, Cúc Hữu Lũng-Lạng Sơn, Trà Lĩnh, Cúc Lục Ngạn (Cúc LN - còn gọi là Cúc vàng), VX92, VX-93. Các giống đậu tương chịu nóng: Ba tháng-Đơn Ca-Chi Lăng, Bắc Cạn, Cúc Hà Bắc, Cúc vàng rón đen, Hạt to-Liên Nghĩa-Đức Trọng-Lâm Đồng, Tứ Quý xanh B hạt vàng, Tứ Quý xanh, Palga (có nguồn gốc từ Thái Lan), M103. Các tổ hợp lai: tổ hợp 1: M103♀, V74♂ và MV1 (giống lai); tổ hợp 2: DT95♀, TN12♂ và TD (dòng lai); Tổ hợp 3: DT95♀, AK06♂ và AD (dòng lai); Tổ hợp 4: MV1♀, Cúc LN♂ và MV1C (giống lai); Tổ hợp 5: DT93-giống lai của giống 821 có hệ gen của Cúc LN và giống 134 của Nhật Bản.

2. Phương pháp

Amylaza tổng số được tách chiết như sau: lá

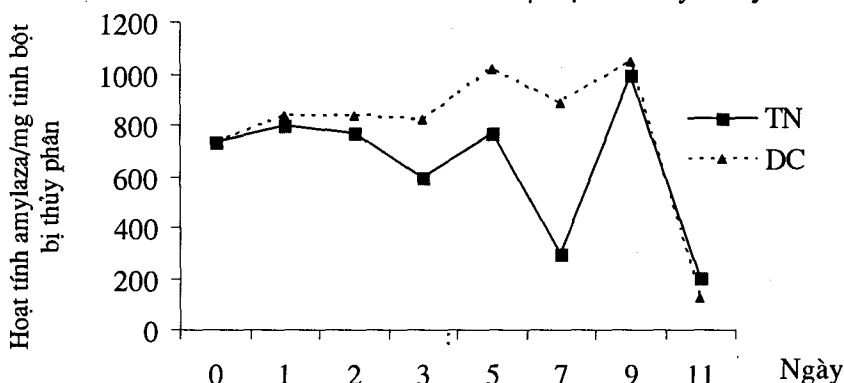
mầm của hạt khô và của hạt nảy mầm từ 1 đến 12 ngày được tách riêng, nghiền nhỏ trong cối chày sứ với axêton hoặc ête lạnh (-20°C) để phá màng tế bào và loại lipid. Sau khi ly tâm, thu lấy cặn và chiết tiếp bằng nước, hoặc bằng một trong các dung dịch sau: dung dịch NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH = 7. Sau khi ủ trong khoảng 15 phút đến 2 giờ, ly tâm lấy dịch để nghiên cứu tiếp bằng các phương pháp khác. Quá trình chiết được tiến hành ở 4°C.

Xác định hoạt độ của amylaza tổng số: thành phần của dịch phản ứng bao gồm dung dịch tinh bột tan 5% (tinh bột Merk); dung dịch đệm axêtat 0,2M pH = 5,5; dịch chiết enzym và nước (hoặc dung dịch đệm chiết enzym). Sau khi ủ trong 30 phút ở 40°C, phản ứng được dừng bằng dung dịch HCl 1 N, nhuộm bằng một giọt iốt 0,2% trong KI và đo ở bước sóng 595 nm (đặc trưng cho tinh bột được nhuộm bằng iốt) [4].

Điện di hoạt tính của amylaza: điện di được tiến hành trên gel polyacrylamit (PA) 10% và 12,5% có chứa SDS và tinh bột 0,5% [5]. Sau khi điện di, gel được lấy ra, rửa bằng nước cất để loại bột SDS và ủ trong dung dịch đệm K-phốtphat có pH = 5,6 trong 30 phút đến 2 giờ ở 40°C. Sau đó, nhuộm bằng dung dịch iốt 0,2% trong KI. Vị trí nào trên gel có amylaza sẽ xảy ra thủy phân tinh bột và cho vạch trắng (không có màu xanh đen của tinh bột khi tác dụng với iốt).

II - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Hoạt độ của amylaza trong hạt của giống đậu tương M103



Hình 1. Hoạt độ của amylaza trong quá trình nảy mầm của hạt giống đậu tương M103: DC-Ở điều kiện bình thường. TN-Ở điều kiện xử lý 45°C trong 2 giờ

Hạt của giống đột biến chịu nóng M103 được sử dụng để xác định hoạt độ của amylaza tổng số ở hạt khô cũng như trong thời kỳ nảy mầm từ 1-12 ngày ở điều kiện bình thường và ở điều kiện xử lý 45°C trong 2 giờ. Các dung dịch đệm Tris-HCl 0,1 M pH = 7,0; NaCl 0,1 M pH = 7,0; H₂O pH = 7,0 được sử dụng để chiết enzym. Kết quả cho thấy sự sai khác không đáng kể. Vì vậy, chúng tôi sử dụng dung dịch NaCl 0,1 M pH = 7,0 làm dung dịch chiết để xác định hoạt độ của enzym. Kết quả xác định được trình bày trên hình 1. Hoạt độ của amylaza ở hạt khô tương đối cao, tăng nhẹ khi bắt đầu nảy mầm và giảm hẳn trong giai đoạn cuối của quá trình này. Xử lý ở nhiệt độ 45°C trong 2 giờ không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt độ của amylaza của giống M103. Amylaza ở đậu tương (bao gồm α -amylaza và β -amylaza) được tìm thấy trong hạt ở những giai đoạn phát triển khác nhau [4,6]. α -amylaza được phát hiện thấy trong hạt và có hoạt tính thay đổi theo quá trình chín của hạt: xuất hiện trong thời gian đầu hình thành hạt và giảm dần đến mất hẳn khi hạt chín. Còn β -amylaza được phát hiện thấy trong hạt ở tất cả các giai đoạn phát triển và nảy mầm của hạt. Hoạt độ của chúng tương đối cao và ít liên quan đến sự chuyển hoá của tinh bột trong quá trình nảy mầm [4]. Qua đó cho thấy amylaza có trong hạt khô và quá trình nảy mầm có thể chủ yếu là β -amylaza. β -amylaza là enzym tương đối bền nhiệt (tuy không bền nhiệt bằng α -amylaza, nhưng tính chất này đã được Totsuka và cs. [7] sử dụng trong quá trình tách chiết và tinh chế β -amylaza). Có thể vì vậy xử lý hạt ở nhiệt độ 45°C trong 2 giờ không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt độ của enzym này.

Để nghiên cứu sâu hơn về các amylaza, đặc biệt là các isozym của chúng, chúng tôi đã sử dụng phương pháp điện di hoạt tính của amylaza.

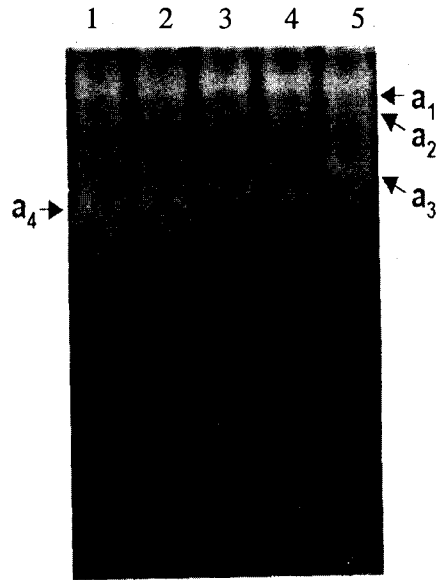
2. Thành phần các isozym của amylaza của các giống đậu tương trên điện di hoạt tính của amylaza

a. Sự đa dạng của amylaza ở đậu tương

Amylaza tổng số chiết từ hạt khô của các giống đậu tương được nghiên cứu bằng phương pháp điện di hoạt tính trên gel PA 10% có chứa SDS. Kết quả điện di trên các giống đậu tương VX9-2, MV1, M103, Trà Lĩnh, Cúc LN của vụ hè 1996 cho thấy amylaza tổng số của các giống có 3 băng (ký hiệu a_1 , a_2 , a_3 hoặc a_4) (hình 2). Tất cả các giống nghiên cứu đều có chung băng a_1 và a_2 . Hầu hết các giống đều có băng a_4 . Đặc biệt băng a_3 ở Cúc LN có độ động điện di chậm hơn so với băng a_4 của các giống còn lại. Cúc LN là giống đậu tương địa phương, hạt nhỏ, có thời gian sinh trưởng ngắn ngày thích hợp với các vụ trong năm, nhất là vụ hè. Trên thế giới, việc nghiên cứu sự xuất hiện của các isozym của amylaza nói chung và của β -amylaza nói riêng trong hạt đậu tương được tiến hành từ nhiều năm nay. Các nghiên cứu của Gorman và Kiang đã phát hiện thấy các băng AM1, AM2, AM3 trên điện di. Trong đó, băng AM3 có độ động điện di nhanh nhất và được xác định là β -amylaza. Hai dạng AM3 được phát hiện thấy ở các giống khác nhau [6, 8].

Trong các loại amylaza, β -amylaza ở đậu tương được nghiên cứu kỹ nhất. Chúng có khả năng hoạt hoá ngay ở dạng đơn phân tử [7, 8, 9]. Điện di hoạt tính của amylaza trong điều kiện có SDS là thích hợp nhất để giải phóng enzym khỏi các phức enzym-phối tử, chuyển thành dạng mônômer. Bốn alen của gien β -amylaza đã được Hibdebrand và Hymowith (1980) [8] mô tả trên cơ sở nghiên cứu các giống đậu tương thuần chủng có tính trạng trội và tính trạng lặn về từng dạng isozym riêng rẽ của β -amylaza bằng phương pháp lai hữu tính và điện di amylaza. Đó là $Sp1^{an}$ (không có hoạt tính β -amylaza), $Sp1^a$ (có hoạt tính β -amylaza, isozym Rf = 0,36), $Sp1^b$ (có hoạt tính β -amylaza, isozym Rf = 0,42) và $sp1$ (không có hoạt tính β -amylaza). Locus $Sp1$ được định vị trên nhóm liên kết tương ứng

với nhóm C2 [10]. Các alen $Sp1^a$ và $Sp1^b$ này dễ dàng được phát hiện và có thể sử dụng làm chỉ thị trong lai tạo. Kết quả nghiên cứu trên các giống đậu tương của Việt Nam có thể đưa ra giả thiết rằng các băng a_3 và a_4 tương ứng với $Sp1^a$ và $Sp1^b$



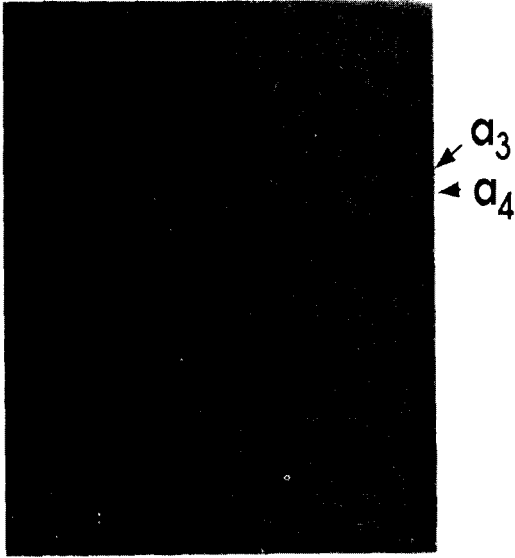
Hình 2. Phổ điện di hoạt tính của amylaza tổng số của các giống đậu tương: 1-VX92; 2-MV1; 3-M103; 4- Trà Lĩnh; 5- Cúc LN (vụ hè 1996).

b. Sự liên kết giữa amylaza và các tính trạng chịu nóng, chịu hạn

Nhằm mục đích tìm hiểu sự phân ly của các băng amylaza này, hạt của các giống đậu tương VX9-2, MV1, M103, ĐT93, Cúc LN thu hoạch trong vụ đông năm 1996 và vụ hè năm 1997 đã được sử dụng làm nguyên liệu để nghiên cứu. Kết quả đã phát hiện thấy giống ĐT93 (giống lai của giống 821 có hệ gien của Cúc LN và giống 134 Nhật Bản) có cả 2 băng a_3 và a_4 (hình 3): băng a_3 tương ứng với Cúc LN và băng a_4 tương ứng với các giống còn lại. Để kiểm tra sự ổn định của các băng này, hạt của các giống ĐT93 và Cúc LN của tất cả các vụ từ hè 1996 đến đông 2000 được nghiên cứu và đã cho kết quả tương tự.

Trong một tổ hợp lai khác: MV1, Cúc LN và MV1C (MV1C là giống lai của hai giống MV1 và Cúc LN), phổ điện di hoạt tính amylaza cho thấy giống MV1C có băng a_3 tương tự như ở giống Cúc LN. Băng này ổn định ở giống

1 2 3 4 5 6



Hình 3. Phổ điện di hoạt tính của amylaza tổng số của các giống đậu tương:

1-ĐT93; 2-Cúc LN (vụ đông 1996); 3-VX92;
4-MV1; 5-M103; 6- ĐT93 (vụ hè 1997).

MV1C trong các vụ đông 2000, hè 2001, đông 2001. Trong đó, các tổ hợp lai M103, V74, MV1; DT95, TN12, TD; DT95, AK06, AD đều có hoạt tính amylaza và chỉ xuất hiện một băng là a_4 .

Để tìm hiểu mối liên quan giữa các băng amylaza và các tính chịu nóng, chịu hạn, hạt của các giống đậu tương địa phương chịu hạn như Đỗ Lạng, Thúa Lá, Azumpa -Gia Lai, Cúc Hữu Lũng-Lạng Sơn, VX-93 và của các giống chịu nóng: Ba tháng-Đơn Ca-Chi Lăng, Bắc Cạn, Cúc Hà Bắc, Cúc vàng rốn đen, Hạt to Liên Nghĩa-Đức Trọng-Lâm Đồng, Tứ Quý xanh B hạt vàng, Tứ Quý xanh, Palga đã được nghiên cứu trên diện di hoạt tính amylaza. Kết quả cho thấy phần lớn các giống đậu tương được nghiên cứu đều có hoạt tính amylaza và đều cho băng a_4 . Băng a_3 không phát hiện thấy trong hạt của các giống địa phương chịu hạn, nhưng phát hiện thấy trong các hạt của các giống: Bắc Cạn, Cúc Hà Bắc, Cúc vàng rốn đen, Palga (hình 4). Đây là các giống chịu nóng có kích thước hạt nhỏ (7,5g/100hạt \rightarrow 10,5g/100hạt) và có thời gian sinh trưởng ngắn ngày.

1 2 3 4 5 6 7 8



Hình 4. Phổ điện di hoạt tính của amylaza tổng số của các giống đậu tương:

1-Bắc Cạn, 2-Cúc Hà Bắc; 3-Cúc vàng rốn đen; 4-Hạt to Liên Nghĩa-Đức Trọng-Lâm Đồng;
5-Palga; 6. Tứ Quý xanh B-Hạt vàng; 7-MV1-C; 8- ĐT93 của vụ đông 2002.

Trong 32 giống và các tổ hợp lai được nghiên cứu, các giống Cúc LN, Bắc Cạn, Cúc Hà Bắc, Cúc vàng rốn đen, Palga và MV1C là có băng a_3 (tương ứng $Sp1^a$), còn tất cả các giống khác đều có hoạt tính β -amylaza thể hiện

ở băng a_4 (tương ứng $Sp1^b$). Đặc biệt, giống ĐT93 có đồng thời cả hai băng a_3 và a_4 . Cần phải nhấn mạnh rằng: hai giống ĐT93 và MV1C đều là con lai, nhưng đã được chọn lọc và thuần hoá nhiều năm, vì vậy có tính trạng ổn định,

không phân ly và được đưa ra để làm giống trồng đại trà vào vụ hè. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự xuất hiện của băng amylaza a_3 có thể là tính trạng trội và liên kết với tính chịu nóng, hạt nhỏ, thời gian sinh trưởng ngắn ngày. Những nghiên cứu gần đây của Cregan và cs. [10] về bản đồ gen liên kết của đậu tương cho thấy locus Sp1 nằm trên cùng một nhóm liên kết với locus màu hoa tím (T) và các locus điều khiển thời gian sinh trưởng (E). Như vậy, chúng ta có thể sử dụng băng a_3 như chỉ thị để chọn lọc theo hướng thích ứng với khí hậu nóng, thời gian sinh trưởng ngắn ngày để tạo giống trồng xen vụ trong vụ hè.

Trong những năm gần đây, vấn đề phân lập tách dòng và biểu hiện gen mã hoá β -amylaza của đậu tương cũng như tìm hiểu tính chất của enzym này đã được đặc biệt quan tâm nghiên cứu. Gen mã hoá β -amylaza nguyên vẹn đã được phân lập, xác định trình tự, nghiên cứu sự biểu hiện cũng như cấu trúc bậc ba và các tâm hoạt tính [7, 9, 11]. Morita và cs. (1976) [12] đã phát hiện thấy hai thành phần của β -amylaza trên sắc ký trao đổi ion, nhưng có cùng khối lượng phân tử (KLPT) và thành phần axit amin. Ji và cs. (1990) [13] đã nghiên cứu về vị trí của các axit amin thay đổi giữa các isozym của β -amylaza trong đậu tương. Totsuka và Fukazawa (1993) [7] đã tiến hành so sánh β -amylaza của giống Bominori được tách dòng và biểu hiện trong *E. coli* với β -amylaza được tách từ dịch chiết của hạt của cùng giống đậu tương này. Tác giả đã nhận thấy chúng có cùng KLPT trên SDS PAGE, nhưng khác nhau trên điện di đẳng điện: β -amylaza biểu hiện trong *E. coli* có một vạch với pI = 5,28, còn β -amylaza tách từ dịch chiết của hạt có 5 isozym với pI lần lượt là: 5,0; 5,15; 5,2; 5,3; 5,32. Năm vạch isozym có độ đậm nhạt khác nhau. Tác giả đã giả thiết về sự đa dạng của các bản sao gen amylaza trong bộ gen của đậu tương.

Để hiểu sâu hơn về bản chất phân tử, khả năng di truyền các alen tương ứng với các vạch isozym, cũng như sự liên kết với các gen khác, cần những nghiên cứu sâu hơn như: sử dụng kháng thể kháng β -amylaza để kiểm tra độ đồng nhất của các vạch, nghiên cứu kiểm tra lại sự di truyền và phân ly tính trạng ở các thế hệ F1, F2, F3 một cách có hệ thống; nghiên cứu sự liên kết

của tính trạng này với các tính trạng đặc biệt khác của một số giống đậu tương chịu nóng (thời gian sinh trưởng rất ngắn, hạt nhỏ...). Ngoài ra, tách chiết và tinh chế β -amylaza từ dịch chiết của các giống Cúc LN, Bắc Cạn, Cúc vàng rốn đen, Palga, MV1C, ĐT93 để nghiên cứu so sánh về hoạt tính, thành phần axit amin và cấu trúc không gian của các isozym... cũng là vấn đề rất có ý nghĩa khoa học.

III - KẾT LUẬN

Hoạt độ của amylaza của giống đậu tương chịu nóng M103 tương đối cao trong hạt khô, tăng nhẹ trong quá trình nảy mầm và giảm hẳn trong giai đoạn cuối của quá trình này. Nghiên cứu hạt của 32 giống đậu tương địa phương có khả năng chịu nóng, chịu hạn và các tổ hợp lai cho thấy tất cả các giống đều có hoạt tính amylaza trên điện di hoạt tính amylaza. Chúng tôi đã phát hiện thấy hai băng a_3 và a_4 khác nhau giữa các giống được nghiên cứu: Cúc LN và các giống lai của nó (ĐT93, MV1C), Bắc Cạn, Cúc Hà Bắc, Cúc vàng rốn đen, Palga đều có băng a_3 , các giống còn lại có chứa băng a_4 . Đặc biệt, giống ĐT93 có cả hai băng a_3 và a_4 . Theo chúng tôi, các isozym này có thể sử dụng như chỉ thị phân tử cho Cúc LN trong lai tạo chọn giống. Tuy nhiên, cần nghiên cứu sâu hơn về bản chất phân tử của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tanksky S. D., Orton T. J., 1986: Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Elsevier.
2. Ingram J., Bartels D., 1996: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 47: 377-403.
3. Yang J. et al., 2001: J. Exp. Bot., 52 (364): 2169-2179.
4. Adams C. A., Broman T. H., Rinne R. W., 1981: Ann. Bot., 48: 433-439.
5. Acevedo E., Cardemil L., 1997: Phytochemistry, 44: 1401-1405
6. Verma D. P. S., Shoemaker R. C., 1996: Soybean, Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. CAB International.
7. Totsuka A., Fukazawa C., 1993: Eur. J. Biochem., 214: 787-794.

8. Hildebrand D. F., Hymowitz T., 1980: Crop Sci., 20: 727-730.
9. Totsuka A. et al., 1994: Eur. J. Biochem., 221: 649-654.
10. Cregan P. B. et al., 1999: Crop Sci., 39: 1464-1490.
11. Pujadas G., Palau J., 2001: Protein Sci., 10 (8): 1645-1657.
12. Morita Y. et al., 1976: J. Biochem., 79: 591-603.
13. Ji E. S. et al., 1990: Agrical. Biol. Chem., 54 (11): 3065-3067.

AMYLASE IN SOME DROUGHT TOLERANT AND HEAT TOLERANT SOYBEAN CULTIVARS

TRAN THI PHUONG LIEN, HUYNH THI THU HUE,
NONG VAN HAI, LE THI MUOI, TRAN DINH LONG

SUMMARY

The amylase activity in the heat tolerant soybean cultivar M103 shows to be significant in mature seeds. It increased slightly during the germination and declined at the end of the germinating phase.

The studies of the mature seeds from thirty-two drought tolerant and heat tolerant soybean cultivars and inbred lines showed both β -amylase electrophoretic patterns and enzyme activity. Two putative β -amylase isozymes a_3 and a_4 bands found would be useful to distinguish in soybean cultivars. The heat tolerant cultivars-Cuc LN and its hybrid lines (ĐT93, MV1C), Bac Can, Cuc Ha Bac, Cuc vang ron den, Palga had the a_3 band. The a_4 band was observed in the seeds of the other cultivars. The hybrid cultivar ĐT93 specially contained both the a_3 and a_4 bands. These isozymes could be used for the selection of codominant inheritance of the local cultivar CucLN.

Ngày nhận bài: 16-1-2003