

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ VAI TRÒ CHẤT KHOÁNG ĐỐI VỚI THỰC VẬT

7.1. Nguyên tắc chung

Chất khoáng tham gia vào các cấu tạo cơ thể thực vật và điều tiết hoạt động trao đổi chất của chúng. Có thể nghiên cứu vai trò của chất khoáng ở dạng riêng rẽ hay phối hợp (kể cả dạng phân bón đã chế biến sẵn).

Để đạt được mức độ chính xác người ta thường nghiên cứu trong điều kiện từng cây ở giá thể sạch (hạt polietylen, nước cất hay dung dịch dinh dưỡng định trước). Cũng có thể nghiên cứu trên nền cát, sỏi hay đất trồng sau khi đã sơ bộ xác định thành phần dinh dưỡng khoáng của chúng.

7.2. Nghiên cứu vai trò của nguyên tố vi lượng trong kỹ thuật thủy canh và giá thể sạch

* Thiết bị và vật liệu: hóa chất để pha dung dịch dinh dưỡng (xem phần 4.1.2 Chương 4), chậu thủy tinh hoặc nhựa, hạt polyetylen . pH-meter, ống thổi khí. Hạt giống ủ mầm dài 2 - 3 cm

* Cách tiến hành:

- Chuẩn bị chậu trồng cây. Trồng cây trong dung dịch chọn bình thủy tinh $\Phi = 20 - 30\text{cm}$, cao 20 - 40cm, có nắp tiêu chuẩn (như đã giới thiệu ở phần trước đây). Trồng cây trong giá thể hạt

nhựa cần chậu nhựa hay thủy tinh $\Phi = 40 - 50\text{cm}$, cao 20cm để có thể trồng được nhiều cây hơn.

- Pha dung dịch dinh dưỡng theo phương pháp đã giới thiệu trước đây. Các dung dịch trồng cây (dung dịch dinh dưỡng đầy đủ đa lượng và vi lượng, dung dịch đủ đa lượng nhưng thiếu nguyên tố vi lượng cần nghiên cứu, dung dịch dinh dưỡng đã có một số nguyên tố vi lượng cần nghiên cứu), tùy loại cây mà pha dung dịch dinh dưỡng thích hợp. Kiểm tra pH của dung dịch cho phù hợp với loại cây. Thường sử dụng nồng độ vi lượng từ 0,01% - 0,04% để nghiên cứu.

- Chọn hạt giống tốt, ủ mầm 2 - 3 cm rồi đem trồng trong bình có dung dịch dinh dưỡng hay chậu có hạt nhựa có chứa dung dịch dinh dưỡng, cần thiết có thể có que nhựa hoặc giàn nhựa làm giá đỡ cho cây.

- Hàng ngày chăm sóc cây: để cây ở điều kiện buồng trồng cây Microclima hay buồng trồng cây trong điều kiện phòng thí nghiệm hoặc trong nhà lưới có đủ ánh sáng, thoáng khí, dùng bơm khí sục cho dung dịch.

- Đo các chỉ tiêu: sinh trưởng về chiều cao, diện tích lá, tốc độ ra lá, cường độ quang hợp, hàm lượng sắc tố, huỳnh quang diệp lục, năng suất quả hạt và chất lượng sản phẩm (tùy loại cây và theo các phương pháp đã nêu ở các phần khác).

Trên cơ sở đó so sánh giữa các mẫu thí nghiệm để làm rõ vai trò của nguyên tố vi lượng khi tác động riêng rẽ và phối hợp tới cây trồng nói chung hay tới từng quá trình sinh lý, sinh hóa nói riêng. Các nguyên tố vi lượng thường có tác động rõ rệt tới quá trình quang hợp, hô hấp, tới hoạt động của hệ enzym, tới khả năng chống chịu điều kiện môi trường bất lợi, tới hiệu quả sinh trưởng và phát triển của cây

Chú ý: Các phương pháp này đòi hỏi phải giữ sạch dụng cụ, vật liệu, tránh nhiễm bẩn hóa chất hay chất dinh dưỡng khác.

7.3. Nghiên cứu vai trò của nguyên tố vi lượng, đa lượng đối với cây trồng trên đồng ruộng

* Thiết bị và vật liệu: dụng cụ trồng cây, nguyên tố vi lượng, đa lượng, phân bón, giống cây trồng.

* Cách tiến hành:

- Sơ bộ phân tích thành phần dinh dưỡng đất trồng (đa lượng, vi lượng, độ pH...).

- Làm đất tơi xốp, bố trí ô thí nghiệm (theo quy định).

- Chọn nguyên tố khoáng hay loại phân bón cần nghiên cứu trên cơ sở phân tích đất trồng. Chỉ nghiên cứu vai trò của những nguyên tố khoáng khi hàm lượng của chúng còn thiếu trong đất.

- Xác định cách bón: bón vào đất hay phun qua lá.

- Xác định hàm lượng chất khoáng cần thiết để trộn vào đất bón lót trước hay bón thúc và chọn nồng độ cần thiết để phun qua lá sau này.

- Phân bón cần nghiên cứu có thể dùng bón lót hay bón thúc tùy loại phân, với liều lượng chỉ dẫn (phân vi lượng nên bón qua lá với nồng độ từ 0,01% đến 0,04%).

- Trồng cây: gieo hạt trên các ô thí nghiệm theo phương pháp trồng cây trên đồng ruộng (có thể ngâm ủ mầm khi nảy mầm ngắn dưới 1cm đem trồng). Đảm bảo chế độ tưới nước để đất có độ ẩm 60 - 80%.

- Chăm sóc theo kỹ thuật gieo trồng.

- Theo dõi các chỉ tiêu:

+ Thời gian nảy mầm đồng ruộng (từ lúc gieo hạt đến khi cây lên khỏi mặt đất).

+ Thời gian xuất hiện lá thật đầu tiên.

+ Chiều cao cây, diện tích lá.

+ Trao đổi nước của lá (sự thoát hơi nước, khả năng giữ nước, khả năng hút nước...).

+ Cường độ quang hợp.

+ Huỳnh quang và hàm lượng diệp lục.

+ Sự ra hoa tạo quả.

+ Năng suất quả, hạt, lá....

+ Phẩm chất sản phẩm.

So sánh giữa các lô thí nghiệm và đối chứng (không bón phân khoáng) để thấy ảnh hưởng của chất khoáng và phân bón tới cây trồng, đồng thời xác định nồng độ/hàm lượng chất khoáng/phân bón tối ưu cho một loại cây trên nền đất cụ thể.

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ VAI TRÒ PHYTOHORMON

8.1. Nguyên tắc chung

Phytohormon được sinh ra trong phần non của cây với hàm lượng rất nhỏ nhưng có vai trò rất quan trọng trong việc điều khiển các quá trình sinh lý trong cây.

Thường thì phytohormon kích thích sinh trưởng khi ở nồng độ rất thấp, còn khi nồng độ cao chúng thường ức chế sinh trưởng. Mỗi nhóm chất phytohormon có tác động khác nhau tới các quá trình sinh lý và sinh trưởng. Các bộ phận của cây chỉ chịu tác động khi chúng đang ở trạng thái sẵn sàng tiếp nhận phytohormon.

Ngày nay người ta thường sử dụng phytohormon tổng hợp để nghiên cứu và ứng dụng vào trồng trọt trong việc kích thích ra rễ cành giâm, cành chiết, để phân hóa rễ và chồi trong nuôi cấy mô, để tăng chiều dài của cây, để phá ngủ nghỉ, để tạo dáng hợp lý cho cây cảnh... hoặc để ức chế sinh trưởng, diệt cỏ.

8.2. Ảnh hưởng của auxin đến sự ra rễ của cành giâm

* Thiết bị và vật liệu: Bình để ngâm cành giâm, ô cát ẩm để giâm cành, axit indolaxetic, axit naphthylaxetic, heteroauxin, cành giâm (cây ăn quả, cây lấy gỗ), cốc, ống đong,

* Cách tiến hành:

- Pha dung dịch heteroauxin các nồng độ 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} (M) hoặc 50, 70, 90, 110, 130, 150mg/100ml nước. Nếu dùng naphthylaxetic

thì pha 5:1000. Trước tiên heteroauxin hòa tan trong cồn (10mg trong 0,5ml cồn), có thể thay cồn bằng nước sôi. Sau đó dùng nước đưa lên tới số lượng cần thiết.

- Đưa chồi vào ngâm trong dung dịch heteroauxin sao cho ngập 1/3 trong dung dịch, thời gian ngâm 24 – 28 giờ, không nên ngâm quá lâu vì có thể chúng bị độc.

Nhiệt độ xử lý ngâm tốt nhất khoảng 22 - 23°C.

- Sau đó lấy chồi ra, rửa bằng nước và đem ngâm trong cát sạch (có trộn ít bùn thì tốt). Cát dùng để giâm cành nên đặt trong buồng trồng cây ở điều kiện phòng thí nghiệm, nhà lưới, chú ý giữ ẩm và mát. Tiến hành giâm cả cành đối chứng (không xử lý auxin).

- Theo dõi: sau một thời gian (tùy loại cây) theo dõi số lượng cành ra rễ, số lượng rễ/cành, chiều dài tổng số rễ hoặc chiều dài lớn nhất.

So sánh với đối chứng để thấy ảnh hưởng của auxin tới khả năng ra rễ cành giâm và nồng độ xử lý thích hợp.

Chú ý: có thể nhúng nhanh cành giâm vào dung dịch auxin với nồng độ cao gấp 100 lần. (chẳng hạn, sử dụng NAA, IBA nồng độ 2000ppm để nhúng cành chèn trong 5-10 giây sẽ ra rễ tốt)

8.2. Ảnh hưởng của auxin tới sự sinh trưởng của rễ và thân mầm

* Thiết bị và vật liệu: heteroauxin, đĩa petri, hạt (đậu, ngô, lúa...), thước đo, cân điện tử sartorius.

* Cách tiến hành:

- Chuẩn bị dung dịch heteroauxin với các nồng độ 0,01; 0,005; 0,001; 0,0005; 0,0001; 0,00005; 0,00001% hoặc nồng độ như ở thí nghiệm trước, cho dung dịch heteroauxin vào các đĩa petri tương ứng.

- Chọn hạt đều, cho vào ngăn trong đĩa petri, mỗi đĩa 20 hạt. Đậy nắp đĩa petri. Đặt đĩa vào nơi ẩm trong 5 - 6 ngày.

- Sau 2 ngày tiến hành theo dõi: tỷ lệ nảy mầm, chiều dài rễ, thân mầm, khối lượng tươi và khối lượng khô của mầm.

So sánh kết quả với mầm đối chứng (đĩa petri cho nước cất và 20 hạt) để thấy vai trò của heteroauxin, đồng thời biết được nồng độ kích thích tốt nhất cho việc nảy mầm, sinh trưởng rễ và thân mầm của loại cây nghiên cứu.

8.3. Ảnh hưởng của giberelin tới sinh trưởng và phát triển của cây

* Thiết bị và vật liệu: chậu trồng cây, phân bón NPK, giberelin, bình phun sương, cốc thủy tinh 100ml, hạt (đậu, ngô, cà chua...).

* Cách tiến hành:

- Chuẩn bị chậu trồng cây với giá thể là đất trộn phân bón hoặc giá thể khác phù hợp.

- Chuẩn bị dung dịch giberelin với các nồng độ 5.10^{-4} , 5.10^{-5} , 5.10^{-6} , 5.10^{-7} , 5.10^{-8} mg/lít.

- Cho hạt ngâm trong dung dịch giberelin nảy mầm (20 hạt cho vào cốc thủy tinh chứa 4ml dung dịch giberelin tương ứng có giấy thấm lót cốc và đặt trên hạt). Đưa cốc vào Microclima hay buồng sinh trưởng ở nhiệt độ 25 - 30°C để nảy mầm.

- Gieo hạt trong chậu với các công thức:

- 1) Đối chứng (không dùng giberelin)
- 2) Hạt của mẫu nảy mầm tốt nhất trong cốc thủy tinh
- 3) Mẫu phun giberelin 5.10^{-4}
- 4) Mẫu phun giberelin 5.10^{-5}
- 5) Mẫu phun giberelin 5.10^{-6}
- 6) Mẫu phun giberelin 5.10^{-7}

7) Mẫu phun giberelin 5.10^{-8} .

Các công thức từ 3 đến 7 gieo hạt bình thường và chăm sóc cùng với các công thức khác.

Việc phun giberelin cho các mẫu từ 3 đến 7 tiến hành vào thời kỳ 4 lá (phun đủ ướt lá dạng sương).

- Theo dõi kết quả:

+ Đối với hạt nảy mầm trong cốc thủy tinh: tỷ lệ nảy mầm, sinh trưởng của rễ, thân mầm, khối lượng tươi mầm, hoạt độ enzym phân giải chất dự trữ của lá mầm (protease, lipase, amylase..).

+ Đối với cây trồng trong chậu: chiều cao cây, thời gian ra lá đầu tiên, diện tích lá, các chỉ số trao đổi nước, cường độ quang hợp, hàm lượng sắc tố, huỳnh quang diệp lục, khối lượng tươi, khô của cây, khả năng ra hoa, đậu quả, khối lượng quả.

Trên cơ sở kết quả thu được rút ra nhận xét về vai trò của giberelin trong việc kích thích nảy mầm, sinh trưởng mầm, sinh trưởng cây, cường độ các quá trình sinh lí, khả năng ra hoa tạo quả và sinh trưởng quả. So sánh việc phun và ngâm hạt bằng giberelin. Phát hiện nồng độ giberelin thích hợp để xử lý hạt và phun cho cây.

Có thể tiếp tục đặt thí nghiệm để so sánh hiệu quả phun giberelin ở các thời kỳ sinh trưởng khác nhau, hoặc so sánh hiệu quả của việc ngâm hạt hay phun qua lá với việc đồng thời ngâm hạt + phun dung dịch giberelin.

8.4. Ảnh hưởng của xitokinin tới sự già hóa của cơ quan thực vật (theo Ivanov V.B)

* Thiết bị và vật liệu: cốc thủy tinh 200ml, cân điện, dao lam, tủ sấy, dung dịch 6 - benzilaminopurin 10, 20, 30, 40, 50 mg/lít, lá cây (nhãn, ổi, cam, quýt...).

* Cách tiến hành:

- Lấy lá cây ở nhiều tầng khác nhau, và ở nhiều cành khác nhau, số lượng đủ 5 lá/1 mẫu (có ít nhất 3 lần nhắc lại).

- Pha dung dịch xytokinin: 100ml dung dịch có nồng độ tương ứng, cốc đối chứng cho nước cất.

- Số lượng công thức thí nghiệm tùy thuộc vào số tầng lá và cành muốn nghiên cứu.

- Cho vào mỗi cốc 5 lá rồi để cốc vào buồng ươm có đủ ánh sáng.

- Đồng thời lấy số lá còn lại (mỗi mẫu 3 lá) đem sấy ở 105°C cho đến khối lượng không đổi để tính khối lượng khô của từng lá.

- Sau 6 - 7 ngày khi lá ở mẫu đối chứng bắt đầu có màu úa vàng thì kết thúc thí nghiệm.

Đánh giá màu xanh của lá ở mẫu thí nghiệm (theo thang điểm 5) và xác định khối lượng khô của 1 lá ở các mẫu thí nghiệm. Đánh giá ảnh hưởng của xytokinin đến sự hóa già thông qua 2 chỉ tiêu màu xanh của lá và kiểm tra mức độ biến đổi (giảm) khối lượng khô trong thí nghiệm. Đồng thời xác định nồng độ thích hợp nhất của xytokinin cho vấn đề này.

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU ĐIỀU KIỆN NÓNG, LẠNH VÀ MẶN Ở THỰC VẬT

9.1. Xác định khả năng chịu nóng của thực vật

9.1.1. Nguyên tắc thí nghiệm

Nhiệt độ cao tác động xấu tới cấu trúc tế bào, hệ thống enzym, cường độ các quá trình sinh lý và ảnh hưởng trực tiếp tới sinh trưởng và phát triển của cây. Có thể đánh giá được mức độ chịu nóng của thực vật thông qua việc xác định khả năng nảy mầm của hạt, hoạt động của hệ enzym, khả năng tổng hợp các sắc tố cũng như độ bền và mối liên kết sắc tố - protit - lipit, khả năng huỳnh quang diệp lục, cường độ của các quá trình sinh lý, sự hình thành của các chất bảo vệ (prolin, axit abscisic, protit...). Việc nghiên cứu này thường có kết quả rõ nét với các mẫu thực vật được xử lý nhiệt.

9.1.2. Xác định tính chịu nóng của thực vật bằng phương pháp xử lý nhiệt hạt nảy mầm (theo Volcova A. M)

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Hạt nảy mầm rất nhạy cảm với nhiệt độ. Ở nhiệt độ thích hợp, chúng tăng cường khả năng nảy mầm, còn khi nhiệt độ tăng cao khả năng này giảm sút rồi ngừng hẳn. Thí nghiệm với các

ngưỡng nhiệt khác nhau có thể thấy rõ và phân biệt được khả năng chịu nhiệt độ cao của các loài cây, giống cây thông qua khả năng nảy mầm, sinh trưởng mầm của chúng.

* Thiết bị, vật liệu:

Khay kích thước phù hợp, có nắp, đảm bảo đủ oxy. Giấy thấm để tạo rãnh với số lượng theo yêu cầu. Bình định mức, cân điện có độ chính xác 10^{-4} , tủ sấy, buồng cho hạt nảy mầm.

Hạt giống chọn đều khỏe, khả năng nảy mầm không dưới 70%. Trước khi thí nghiệm ngâm hạt giống trong dung dịch $KMnO_4$ 1% trong 5 - 10 phút (để hạt vào túi vải màn nhúng vào trong dung dịch). Sau đó rửa bằng nước sôi để nguội rồi thấm khô bằng giấy thấm. Nên chọn các hạt thu hoạch cùng một vụ để dễ so sánh.

* Cách tiến hành:

Trước khi gieo hạt, khay được tiệt trùng bằng cồn, giấy thấm được sấy khô ở $130^{\circ}C$ trong 1 giờ.

Các công thức thí nghiệm được bố trí trong một khay, với số lượng hạt trên khay phù hợp. Số lần nhắc lại mẫu từ 6 - 8. Cho nước cất vào khay đủ ướt hạt và giấy thấm sau đó phủ mặt khay bằng hai lượt giấy thấm ẩm. Một nửa số khay đưa vào các buồng sinh trưởng ở nhiệt độ $20 - 21^{\circ}C$ (đối chứng), nửa còn lại đưa vào tủ sấy. Thường hạt đậu tương, đậu cove, đậu Hà lan xử lý hạt trong 6 giờ ở nhiệt độ $44^{\circ}C$ hoặc $46^{\circ}C$. Sau khi xử lý nhiệt, để nguội trong điều kiện nhiệt độ phòng, sau đó đưa vào buồng sinh trưởng nhiệt độ $20 - 21^{\circ}C$ để xác định khả năng nảy mầm.

Xác định tỷ lệ nảy mầm của hạt: $P = \frac{a}{b} \cdot 100\%$

a- số hạt nảy mầm ở lô thí nghiệm

b- số hạt nảy mầm ở lô đối chứng

Có thể tính tốc độ nảy mầm (số ngày trung bình để một hạt nảy mầm) so sánh thí nghiệm và đối chứng; xác định hoạt độ của

các enzym phân giải chất dự trữ trong hạt nảy mầm (α -amylase, peroxidase, catalase, lipase, protease...)

Xác định khối lượng tươi, khô của mầm.

Số liệu có thể thu từng ngày hay cách ngày.

9.1.3. Đánh giá khả năng chịu nóng của cây rau theo điện trở của mô lá (theo Ivankin A. P)

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Hiện tượng điện sinh học có vai trò quan trọng trong tế bào và liên quan chặt chẽ với quá trình sinh lý trong cây.

Nhiệt độ cao tác động tới màng sinh chất, trong trường hợp gây tổn thương màng nhanh không cho phép thoát hơi nước và có thể gây chết lá (như là cho lá vào đun cách thủy) thì điện trở lá giảm sút. Còn trong điều kiện tự nhiên khi tác động nhiệt độ cao một cách từ từ, kèm theo mất nước, do đó điện trở lá tăng lên.

* Thiết bị và vật liệu: thiết bị đo điện trở P.556 hoặc tương tự. Các điện cực thực hiện quan hệ giữa cầu của sơ đồ đo và đối tượng được làm bằng thép không gỉ, khoảng cách là 3,5mm (khoảng cách này có thể thay đổi, nhưng giữ ổn định trong một đợt đo, chú ý khoảng cách này lớn thì điện trở càng cao và có thể ra ngoài giới hạn có thể đo).

Lá cây rau thường chọn cùng tầng để dễ so sánh.

* Cách tiến hành:

Thí nghiệm này có thể làm trực tiếp trên đồng ruộng. Hơn nữa có thể đo được nhiều mẫu trong thời gian ngắn.

Trên lá chọn 3 điểm (một điểm ở đầu lá, hai điểm ở cuống lá) để đo. Thường đo vào 10 giờ sáng đến 16 giờ chiều trong những ngày nắng.

Có thể đo trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Việc sử dụng kim điện cực chú ý cắm sâu vào mô lá đồng đều giữa các mẫu. Để làm được điều đó dùng trợ giúp của giá đỡ.

Đối với cây bắp cải có thể đo lúc 10 giờ trên lá cây, sau đó cắt lá đưa vào điều kiện phòng thí nghiệm với các ngưỡng nhiệt cần đo/ để héo và xác định điện trở sau từng 2 giờ ($R \times 10^5 \Omega$) sẽ thấy điện trở tăng dần.

Những giống chịu nóng khá thường có điện trở lá thấp hơn giống chịu đựng yếu trong thời điểm nóng.

Chú ý: Nếu so sánh khả năng chống chịu của các giống có độ dày lá khác nhau, có thể sử dụng hệ số ε (hệ số điện).

$$\varepsilon = \frac{R_s}{R_c} \text{ (} R_s \text{ điện trở lá sống, } R_c \text{ điện trở lá chết)}$$

Để xác định hệ số này trước tiên đo R_s sau đó lấy các lá cho vào môi trường cách thủy 15 - 20 phút, sau đó đem ra đo R_c .

Thí nghiệm này cũng có thể dùng để xác định khả năng chịu hạn của thực vật.

9.1.4. Thí nghiệm đánh giá khả năng chịu nóng, chịu hạn thông qua hệ sắc tố ở cây xanh (theo Shmatko I. G, Shapoval A. I, Shevchuc N. V)

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Hệ sắc tố rất mẫn cảm với điều kiện môi trường thay đổi. Khi nhiệt độ tăng hay thiếu nước thường xảy ra hủy hoại cấu trúc lục lạp, giảm tổng hợp sắc tố, tăng hoạt tính chlorophyllaza và làm suy yếu mối liên kết diệp lục - protit - lipit. Có thể đánh giá mức độ ảnh hưởng của nhiệt độ cao và hạn hán tới hệ sắc tố thông qua các chỉ tiêu nêu trên.

* Thiết bị và vật liệu:

Cối chà sỏi, cân điện có độ chính xác 10^{-4} , máy đo quang phổ (UV- vis), lá cây.

* Cách tiến hành:

- Xác định hàm lượng diệp lục tổng số:

Lấy 10 gam lá, nghiền kỹ rồi lấy 2 mẫu với mỗi mẫu là 100mg đem ra cối nghiền với 80% axeton đến dịch đồng nhất. Lọc dịch đó nhờ bình Bunzen có hút chân không hoặc dùng máy ly tâm, rửa sạch cối sau đó chuyển sang bình định mức 25ml. Dịch chiết đem xác định hàm lượng dla và dlb nhờ máy quang phổ (với bước sóng dla: E₆₆₃, dlb: E₆₄₅). Tính toán:

$$dla (C_a) = 12,7 E_{663} - 2,69 E_{645}$$

$$dlb (C_b) = 239 E_{645} - 4,68 E_{663}$$

$$dla + dlb = 8,02 E_{663} + 20,2 E_{645}$$

Sau đó chuyển đổi đơn vị ra mg/g: $dl = \frac{K.V}{d}$, trong đó K - C_a, C_b, C_a + C_b; V - thể tích pha loãng (ml), d - khối lượng mẫu sử dụng (mg).

Có thể sử dụng máy SPAD-502 để đo nhanh hàm lượng diệp lục tổng số hoặc sử dụng UV-vis để định lượng diệp lục a, diệp lục b như ở phần trước.

- Xác định dla, dlb liên kết chặt.

Lấy hai mẫu 100mg đưa ra cối nghiền với xăng 43 - 122 sau đó đem lọc, bỏ dịch lọc, lấy phần còn lại rửa sạch sấy khô bằng thổi khí. Sau đó dùng axeton 80% chiết xuất diệp lục từ chất tủa, đưa vào bình định mức 25ml rồi định lượng diệp lục bằng máy quang phổ.

9.2. Xác định khả năng chịu rét của thực vật

9.2.1. Nguyên tắc thí nghiệm

Nhiệt độ môi trường hạ thấp tác động tới các quá trình sinh lý trong cây, làm giảm sút cường độ trao đổi chất, làm chậm tốc độ

sinh trưởng, nhưng đồng thời cũng góp phần tăng cường hình thành một số chất dự trữ, bảo vệ.

Ở nhiệt độ đóng băng, sự hình thành tinh thể nước đá gây tổn thương cơ học và gây mất nước của tế bào.

Khả năng chống chịu điều kiện nhiệt độ thấp của cây thay đổi theo thời kỳ sinh trưởng và rất mẫn cảm ở giai đoạn nảy mầm, nảy chồi.

Trên cơ sở đó, để xác định khả năng chịu nhiệt độ thấp có thể bố trí các thí nghiệm về sinh trưởng, hoạt động của quá trình sinh lý, sự hình thành chất bảo vệ... trong cây.

9.2.2. Đánh giá sự nảy mầm của hạt và sinh trưởng của cây trong điều kiện nhiệt độ thấp

* Thiết bị và vật liệu: khay cho hạt nảy mầm, buồng sinh trưởng kiểu Microclima. Hạt giống có khả năng nảy mầm cao (trên 70%.)

* Cách tiến hành:

- Sử dụng khay sạch lau bằng bông cồn, hay sấy trước đó ở 130°C trong 3 giờ.

- Hạt giống đã kiểm tra tỷ lệ nảy mầm. Trước hết xử lý hạt giống ở dung dịch KMnO₄ 1% trong 5 phút. Sau đó gieo hạt trong khay trên các rãnh gấp nếp của giấy thấm. Tưới ẩm bằng nước cất, rồi đặt lên trên bằng giấy thấm một đầu ngập trong nước ở đáy khay.

Đưa khay vào buồng cho nảy mầm rồi điều chỉnh xuống nhiệt độ thấp từ 5°C - 10°C - 15°C tùy loại cây và mục đích thí nghiệm. Mẫu đối chứng để ở giàn ươm trong điều kiện nhiệt độ phòng ở 25°C - 26°C.

Có thể xác định tỷ lệ nảy mầm, tốc độ và mức độ sinh trưởng của mầm, sự hô hấp, hoạt độ enzym (amylase, protease, lipase,

peroxidase, catalase... tùy từng loại cây) chất bảo vệ (prolin, glycine betaine, đường khử...) trong điều kiện nhiệt độ thấp.

- Lựa chọn hạt nảy mầm tốt chuyển vào gieo trồng trong chậu nhỏ với giá thể chuẩn bị sẵn từ đất, sơ dừa... Đưa chậu cây con vào buồng Microclima và điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu, ánh sáng và không khí tiêu chuẩn. Mẫu đối chứng để trong giàn trồng cây điều kiện phòng.

Theo dõi sự sinh trưởng, khả năng quang hợp, hoạt độ enzym, sự huỳnh quang của sắc tố, chất bảo vệ. Có thể so sánh các chỉ tiêu này ở các giống có khả năng chịu lạnh khác nhau.

9.2.3. Sự chuyển hóa chất dự trữ trong điều kiện nhiệt độ thấp ở chồi cây ăn quả (theo Ivanov V.B)

Khi nhiệt độ xuống quá thấp, đột ngột, trong tế bào và ngoài tế bào hình thành tinh thể nước đá, có thể gây tổn thương cơ học và gây sự thiếu nước của tế bào. Các chất như: đường, glyxerin, polivinylpyrrolidon, dimetyl-sufocid, protit và axit amin ưa nước, mono - oligosaccarit có khả năng giảm stress cho cây.

Trong thời gian chuyển sang mùa lạnh, trong chồi thường tích trữ các chất hữu cơ. Đến mùa đông, các chất hữu cơ này sẽ thủy phân tạo ra chất bảo vệ.

* Thiết bị và vật liệu: dung dịch iot trong KI, dung dịch Sudan III, dung dịch CuSO₄ đặc, dung dịch muối Senet kiềm, dung dịch Feling, glyxerin.

Kính hiển vi, dao lam, kẹp ghim, giá ống nghiệm, đĩa thủy tinh, giấy lọc, diêm.

Chồi cây thường lấy vào tháng 10 và tháng 12 đưa vào đun trong hơi cồn 96°C (treo dưới nắp lọ, đáy đựng cồn và đặt trên bếp cồn).

* Cách tiến hành:

Chuẩn bị các lát cắt ngang chồi, sau đó làm thí nghiệm xác định tinh bột, lipit, đường khử. So sánh hàm lượng các chất đó trong tháng 10 và tháng 12.

- Xác định tinh bột: lát cắt rõ phân lõi, phần gỗ và vỏ đưa lên kính, cho giọt iod rồi quan sát trên kính hiển các hạt tinh bột màu sẫm.

- Xác định lipit: cho vào lát cắt mỏng vài giọt dung dịch sudan III, để yên ít nhất 10 phút, sau đó rửa bằng nước rồi cho giọt glyxerin. Xem dưới kính hiển vi với độ phóng đại lớn phần nhu mô (gỗ và libe, tia gỗ libe) và phân lõi. Hạt lipit có màu da cam hoặc đỏ.

- Xác định đường khử: cắt dọc đoạn chồi khoảng vài cm rồi cho vào dung dịch CuSO_4 đặc trong 5 phút, sau đó rửa bằng nước và cho vào ống nghiệm với dung dịch muối senet kiềm sôi trong 2 phút. Đoạn chồi đem rửa rồi cắt lát ngang đưa lên kính trong giọt nước sau đó thay bằng glyxerin rồi đậy và xem dưới kính hiển vi. Hạt Cu_2O ở độ phóng đại nhỏ có màu đen, còn ở độ phóng đại lớn màu đỏ. (Có thể dùng dung dịch felling ngâm lát cắt trên kính rồi cho đun sôi dung dịch sẽ tạo ra Cu_2O).

Đánh giá các chỉ tiêu theo thang 5 điểm. So sánh sự tích lũy các chất trong điều kiện đầu và giữa mùa đông đông, thời đánh giá khả năng chịu nhiệt độ thấp của các giống cây.

9.2.4. Xác định khả năng chịu băng giá của thực vật theo mức độ tổn thương của chúng

* Thiết bị và vật liệu: khoan lá (8 - 10mm), NaCl, nước đá nghiền nhỏ, nhiệt kế tới -25°C , dao lam, lá cây hoặc củ, rễ.

* Cách tiến hành:

Lấy lá cây từ các giống cây khác nhau, dùng khoan lá lấy 3 mẫu, mỗi mẫu 5 mảnh cho vào đĩa petri rửa sạch dịch bào, sau đó

cho vào ống nghiệm tương ứng chứa 1/4 thể tích là nước cất. Cho ống nghiệm vào buồng lạnh (hay nhúng trong hỗn hợp lạnh) trong thời gian 15 - 20 phút.

Hỗn hợp lạnh làm bằng cách trộn nước đá (3 phần) và muối (1 phần) đạt nhiệt độ -21°C .

Sau đó đưa ống nghiệm ra ngoài, để trong nhiệt độ phòng $25 - 30^{\circ}\text{C}$ cho tan hết đá.

Các mẫu đối chứng của các giống cũng làm như trên nhưng để trong nhiệt độ phòng.

Sau đó kiểm tra và so sánh mẫu các lát cắt, màu và dung dịch trong ống nghiệm, khả năng sống của tế bào (bằng cách gây co nguyên sinh lát cắt trong NaCl 8%). Khi tế bào bị tổn thương, chúng không giữ được dịch bào, nên đối với tế bào có màu sẽ thấy rất rõ mức độ tổn thương.

Dùng thí nghiệm này có thể đánh giá được vai trò của chất bảo vệ đến khả năng chịu băng giá của thực vật, bằng cách ngâm các mẫu thực vật trong các dung dịch: saccaroza 1M, glyxerin 12% hay hỗn hợp hai loại này.

Đánh giá mức độ tổn thương theo thang 5 điểm (màu của lá, của dịch trong ống nghiệm) và số lượng tế bào không có khả năng co nguyên sinh.

9.3. Xác định khả năng chịu mặn của thực vật

9.3.1. Nguyên tắc thí nghiệm

Môi trường mặn tác động xấu tới sinh trưởng của cây, trước tiên chúng tạo áp suất thẩm thấu cao làm cây khó hút nước, gây nguy cơ bị héo, sau đó ion muối vào cây sẽ gây độc cho tế bào, ảnh hưởng tới trao đổi chất, cường độ các quá trình sinh lý và sinh trưởng của cây.

Trong điều kiện đất mặn, cây thường phản ứng bằng cách tăng tổng hợp chất bảo vệ (các chất tăng áp suất thẩm thấu tế bào, các chất trung hòa chất độc do rối loạn trao đổi chất như NH_3), điều chỉnh giảm cường độ trao đổi chất...

Có thể xác định khả năng chịu mặn của thực vật thông qua khả năng nảy mầm của hạt, hoạt độ enzym trong giai đoạn nảy mầm hay trong lá khi bị mặn, cường độ quá trình quang hợp, hô hấp, huỳnh quang diệp lục, hàm lượng NH_3 hay các axit hữu cơ trung hòa NH_3 trong mô; hàm lượng prolin và axit abscisic trong mầm hay trong lá.

9.3.2. Ảnh hưởng của dung dịch muối đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của mầm

* Thiết bị và vật liệu:

Dung dịch NaCl nồng độ từ 1% - 5%

Khay cho hạt nảy mầm; giấy thấm, nước cất

Hạt giống (đậu, đỗ, ngô, lúa...) có khả năng nảy mầm không dưới 70%. Tủ microclima hay giàn cho cây sinh trưởng bình thường.

* Cách tiến hành:

Chọn hạt khỏe, cho vào túi vải màn rồi xử lý bằng dung dịch KMnO_4 1% trong 5 phút, làm khô nhẹ và đặt vào khay. Trước đó khay được khử trùng bằng cách sấy khô 150°C trong 1 giờ cùng với giấy thấm. Cho vào các khay thí nghiệm dung dịch NaCl với các nồng độ từ 1 - 5% tùy mục đích thí nghiệm. Khay đối chứng cho nước cất. Các rãnh gấp giấy thấm gieo hạt theo cách bố trí của Kozushko.

Đưa các khay có hạt vào buồng Microclima hoặc buồng sinh trưởng ở $22 - 26^\circ\text{C}$.

Sau 1 ngày, theo dõi tỷ lệ nảy mầm, sự sinh trưởng chiều dài, khối lượng mầm và đồng thời đánh giá tốc độ nảy mầm và sinh

trường mầm, so sánh giữa các giống, giữa các công thức để thấy ảnh hưởng của nồng độ muối đến sự nảy mầm. Song song với các chỉ tiêu này có thể đo hoạt độ của enzym thủy phân chất dự trữ trong lá mầm, hàm lượng prolin và axit abscisic, cường độ hô hấp của hạt nảy mầm.

9.3.3. Ảnh hưởng của muối đến sinh trưởng, hàm lượng diệp lục của lá

* Thiết bị và vật liệu: chồi của cây, cốc, dao lam, NaCl hoặc Na_2SO_4 , thước đo.

* Cách tiến hành:

Chọn chồi trưởng thành, cắt gốc chồi trong nước.

Sơ bộ tính chiều dài cành, số lá, chiều dài lá trên cùng, hàm lượng diệp lục tổng số (dùng máy SPAD-502 hay xác định bằng UV-Vis). Đưa chồi vào các cốc thí nghiệm với NaCl nồng độ từ 1 - 10% tùy loại cây và các cốc đối chứng (nước cất). Đặt cây trong điều kiện ánh sáng tán xạ. Ngày thứ 3 và thứ 5 tiến hành xác định: màu của lá, hàm lượng diệp lục tổng số, chiều dài chồi, chiều dài lá trên cùng đã đo trước đó, sự xuất hiện lá mới, sự xuất hiện và diện tích vết cháy ở lá. So sánh kết quả ở lô thí nghiệm và lô đối chứng để đánh giá mức độ chịu mặn và xác định ngưỡng nồng độ muối chịu được của cây.

9.3.4. Ảnh hưởng của muối đến cường độ quang hợp và khả năng huỳnh quang của lá

* Thiết bị và vật liệu: có thể thực hiện 2 cách

1) Đặt thí nghiệm như ở mục trên

2) Gieo trồng cây trong chậu hay ngoài ruộng: chậu cây, bình phun sương, NaCl, máy đo cường độ quang hợp PP systems TPS-2, máy đo huỳnh quang.

* Cách tiến hành:

Trường hợp 1: Đo các chỉ tiêu: cường độ quang hợp và khả năng huỳnh quang trước khi thí nghiệm và sau đó 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và sau 1 ngày.

Trường hợp 2: phun các dung dịch NaCl với các nồng độ từ 1% - 10% tùy loại cây vào lá ở mức độ đủ thấm. Sau 3 giờ đo cường độ quang hợp và huỳnh quang diệp lục của lá và tiếp tục đo hàng ngày, cho đến ngày thứ 3. Có thể bố trí các mẫu thí nghiệm phun 2 hay 3 lần dung dịch muối vào các thời kỳ sinh trưởng khác nhau (cây con, ra hoa, ra quả ...) để so sánh. Kết quả đo được so sánh với đối chứng để đánh giá mức độ ảnh hưởng của NaCl tới quang hợp và huỳnh quang của lá, đồng thời xác định ngưỡng chịu muối của sắc tố.

Có thể sử dụng phương pháp tưới dung dịch muối vào đất. Muốn vậy, sơ bộ sấy khô đất ở nhiệt độ 25 - 30°C rồi cho vào chậu. Đưa cây con ươm trong bầu nhỏ vào trồng trong chậu. Hàng ngày tưới dung dịch NaCl 1 - 5% cho đủ ẩm. Xác định các chỉ tiêu như đã nêu ở trên, đồng thời theo dõi sự sinh trưởng, khả năng sống sót và mức độ cháy lá để đánh giá khả năng chịu nhiễm mặn của cây.

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ VAI TRÒ ENZYM TRONG MÔ THỰC VẬT

Enzym là các protein đơn giản hoặc protein phức tạp có khả năng xúc tác đặc hiệu cho các phản ứng hóa sinh. Các enzym được chia thành 6 lớp đánh số theo thứ tự nhất định:

1. Oxidoreductase: xúc tác cho phản ứng oxi hóa khử. Cơ chất bị oxi hóa được xem là chất cho hiđro hoặc electron. Các dehydrogenase và oxidase thuộc lớp này (chỉ oxidase sử dụng O_2 làm chất nhận). Ví dụ catalase (EC 1.11.1.6), peroxidase (EC 1.11.1.7).

2. Transferase: xúc tác cho phản ứng chuyển vị nhóm.

3. Hydrolase: xúc tác cho phản ứng thủy phân các liên kết khác nhau. Tên hệ thống của các enzym lớp này có thể là tên cơ chất + đuôi "az" (-ase). Các enzym protease (EC 3.4.21.40), lipase (triglyceride lipase, EC 3.1.1.3), α -amylase (EC 3.2.1.1) thuộc lớp này.

4. Liase: xúc tác phản ứng cắt đứt các liên kết C-C, C-O, C-N...

5. Izomerase: xúc tác cho phản ứng đồng phân (thay đổi nội bộ 1 phân tử)

6. Ligase: xúc tác cho phản ứng kết hợp 2 phân tử có kèm theo thủy phân liên kết pirophotphat trong phân tử ATP.

Đơn vị hoạt độ enzym: Hội nghị quốc tế về Hóa sinh enzym đã đưa ra khái niệm đơn vị enzym quốc tế (hoặc đơn vị enzym

tiêu chuẩn) vào năm 1961. Đơn vị hoạt độ enzym (U) là lượng enzym có khả năng xúc tác làm chuyển hóa 1 micromole ($1\mu\text{mol}$) cơ chất sau một phút ở điều kiện tiêu chuẩn.

$$1 \text{ U} = 1\mu\text{mol cơ chất } (10^{-6} \text{ mol})/\text{phút.}$$

Từ năm 1972, người ta đưa thêm khái niệm Katal (Kat): là lượng enzym có khả năng xúc tác làm chuyển hóa 1 mol cơ chất sau một giây ở điều kiện tiêu chuẩn: $1\text{Kat} = 6.10^7 \text{ U}$ và $1\text{U} = 1/60 \mu\text{Kat}$.

Đối với chế phẩm enzym, ngoài việc xác định mức độ hoạt động còn cần phải đánh giá độ sạch của nó. Đại lượng đặc trưng cho độ sạch của chế phẩm enzym là hoạt độ riêng (specific activity). Hoạt độ riêng của một chế phẩm enzym là số đơn vị enzym/mg protein (U/mg) cũng có thể 1g chế phẩm hoặc 1ml dung dịch enzym. Thông thường hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Lowry hoặc Bradford.

Hoạt độ enzym phụ thuộc vào các yếu tố vật lí và hóa học khác nhau như nhiệt độ, pH môi trường và một số chất có bản chất hóa học khác nhau. Các chất này có thể làm tăng hoặc giảm hoạt độ xúc tác của enzym.

10.1. Xác định hoạt độ enzym protease

10.1.1. Xác định hoạt độ enzym protease sử dụng casein làm cơ chất

Protease (cũng được gọi là peptidase hoặc proteinase) là một enzym thủy phân protein bằng cách tách protein thành các chuỗi polypeptit hoặc đến sản phẩm cuối cùng là axit amin, là enzym tham gia vào mọi quá trình sinh lý diễn ra trong suốt đời sống thực vật, tham gia vào các hoạt động nội bào ở tất cả các cơ thể sống. Trong những năm gần đây, các nhà nghiên cứu đã chỉ ra rằng chúng giữ vai trò rất quan trọng đối với đời sống thực vật. Protease thực vật tham gia vào quá trình nảy mầm của hạt, tái chế các protein thực vật bị hư hại, điều hòa quá trình già hóa ở thực vật và protein thay đổi để thực hiện những chức năng đặc hiệu

trong tế bào thực vật. Nghiên cứu trên đối tượng lúa mì (*Triticum aestivum* L. cv) đã cho thấy giai đoạn cây non bị sốc với nhiệt độ cao (ở 45°C), thì có sự gia tăng hoạt độ của enzym protease, kết quả này cho thấy việc thủy phân protein là một yếu tố chính dẫn tới việc tích lũy các axit amin. Trên đối tượng đậu cove (*Phaseolus vulgaris* L.) dưới điều kiện thiếu nước cũng cho thấy sự tăng cường hoạt động của protease.

* Nguyên tắc thí nghiệm: Protease tác dụng với cơ chất casein (một loại protein). Sau một thời gian protein còn lại được kết tủa bằng axit tricloaxetic, xác định sản phẩm tạo thành bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Phương pháp này cải tiến trên cơ sở phương pháp xác định hoạt độ protease của Nguyễn Văn Mùi và Nguyễn Quang Vinh, Bùi Phương Thuận và Phan Tuấn Nghĩa.

* Định nghĩa đơn vị hoạt độ: Đơn vị hoạt độ là lượng enzym mà trong điều kiện tiêu chuẩn ở 30°C sau 1 phút phân giải protein tạo thành các sản phẩm hòa tan trong axit tricloaxetic tương ứng với 1µmol tirozin.

* Cách dựng đường chuẩn tirozin:

- Chuẩn bị dung dịch tirozin nồng độ gốc 1mM: cân 181,19mg tirozin cho vào bình định mức 1 lít.

- Bổ sung dung dịch HCl 0,2N để hòa tan tirozin trong bình định mức. Chuẩn đến mức 1000ml.

- Pha loãng nồng độ gốc thành các nồng độ thấp hơn từ 0,01 - 0,1mM/ml bằng cách: lấy 10 ống nghiệm, cho lượng tirozin 1mM và HCl 0,2N theo bảng:

STT ống	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dung dịch gốc (ml)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
HCl 0,2N (ml)	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,00

- Từ các nồng độ này thực hiện phản ứng màu như sau: bổ sung 2ml dung dịch Na₂CO₃ 6% lắc đều, thêm 0,5ml thuốc thử Folin-Ciocalteu pha loãng 5 lần. Giữ 30 phút ở nhiệt độ phòng, đo OD_{750nm}.

- Xây dựng đường chuẩn là tương quan giữa nồng độ tirozin với OD_{750nm}.

* Thiết bị và vật liệu:

- Casein 1% (w/v) trong đệm photphat M/15 (pH 6,5): cân 1g casein hòa tan trong 10-15ml NaOH 0,1N (đặt vào nồi cách thủy, thỉnh thoảng khuấy cho đến khi hòa tan hoàn toàn). Làm lạnh, dùng dung dịch KH₂PO₄ M/15 để điều chỉnh pH đến 6,5, thêm dung dịch đệm photphat M/15 (pH 6,5) đến mức 100ml. Kiểm tra lại pH.

- Dung dịch Na₂HPO₄ M/15. Nếu dùng muối Na₂HPO₄.2H₂O: cân 11,876g, hòa tan trong nước cất 2 lần, dâng nước đến mức 1000ml.

• Dung dịch KH₂PO₄ M/15: cân 9,078g, hòa tan trong 1000ml nước cất.

- Để chuẩn bị dung dịch đệm photphat pH 6,5: lấy 68,5ml dung dịch Na₂HPO₄ M/15 và 3,5ml dung dịch KH₂PO₄ M/15, lắc đều, kiểm tra lại pH và dùng một trong hai dung dịch này để điều chỉnh pH đến 6,5.

- Axit tricloaxetic 5%, Na₂CO₃ 6%.

- Chuẩn bị dịch chiết enzym từ hạt: Hạt được nghiền nhỏ bằng cối chày sứ với nitơ lỏng và bột bảo quản trong ống polyetylen ở -10°C, bột nghiền được hòa tan trong dung dịch đệm photphat M/15 (pH 6,5), lắc trong 1 giờ ở 4°C, và sau đó ly tâm 12000xg trong 15 phút ở 4°C, dịch trong phía trên được sử dụng cho phân tích hoạt độ enzym.

* Cách tiến hành: Lấy 2 ống nghiệm sạch, khô

- Ống 1 (ống thí nghiệm): cho vào 0,5ml dịch chiết enzym, giữ 10 - 15 phút ở 30°C, thêm 1ml dung dịch casein (đã đạt đến 30°C, lắc đều, giữ ở 30°C đúng 10 phút), cho ngay 2,5ml axit tricloaxetic 5% vào, lắc đều để lắng 30 phút, ly tâm 2000g (hoặc lọc) để nhận dịch trong suốt phía trên. Lấy 0,5ml dịch trong suốt cho vào ống nghiệm,

thêm 2ml dung dịch Na_2CO_3 6%, lắc đều, thêm 0,5ml thuốc thử Folin-Ciocalteu đã pha loãng 5 lần, lắc đều, sau 30 phút đo $\text{OD}_{750\text{nm}}$.

- Ống 2 (ống đối chứng): thay 0,5ml dịch chiết enzym bằng 0,5ml nước cất, các bước sau làm tương tự ống thí nghiệm.

* Cách tính hoạt độ:

- Tính hiệu số $\text{OD}_2 - \text{OD}_1$, dựa vào đường chuẩn tirozin để tính ra μmol tirozin tương ứng. Trong đó: OD_2 mật độ OD của ống thí nghiệm, OD_1 mật độ OD của ống đối chứng.

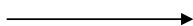
- Tính hoạt độ của 1ml dung dịch enzym theo công thức:

$$X(\text{U/ml}) = \frac{a.8.b}{t}$$

X: số đơn vị hoạt độ trong 1ml dịch chiết enzym, 8: thể tích của hỗn hợp phản ứng và TCA (4ml : 0,5ml), a: số μmol tirozin tương ứng với hiệu số giá trị mật độ quang của ống thí nghiệm và ống đối chứng, b: hệ số pha loãng của dung dịch enzym (nếu có), t: thời gian phản ứng (10 phút).

10.1.2. Xác định hoạt độ enzym protease sử dụng TAME (Na-p-Tosyl-L-Arginine Methyl Ester) làm cơ chất

Quy trình này được xây dựng trên cơ sở tham khảo quy trình và sử dụng hóa chất chuẩn của hãng Sigma-Aldrich.



(TAME: Na-p-Tosyl-L-Arginine Methyl Ester)

* Hóa chất:

Hóa chất A: đệm kali photphat 100mM, pH 8,0 ở 25°C (chuẩn bị 100ml bằng nước đề ion sử dụng $\text{K}_2\text{HPO}_4.3\text{H}_2\text{O}$, điều chỉnh pH 8,0 ở 25°C bằng hóa chất B).

Hóa chất B: dung dịch kali phosphat 100 mM (chuẩn bị 100ml bằng nước đề ion sử dụng KH_2PO_4).

Hóa chất C: dung dịch Na-p-Tosyl-L-Arginine Methyl Ester (TAME) 0,8mM (chuẩn bị 50ml trong hóa chất A sử dụng Na-p-Tosyl-L-Arginine Methyl Ester).

Hóa chất D: dung dịch enzym protease.

* Cách tiến hành:

Sử dụng pipet cho các hóa chất sau vào cuvet thích hợp (ml):		
Hóa chất	Test	Blank
Hóa chất C (TAME)	2,90	2,90
Cân bằng đến nhiệt độ 25 ⁰ C. Rồi bổ sung:		
Hóa chất D (dung dịch enzym)	0,10	----
Nước đề ion	----	0,10
Nhanh chóng đảo nhẹ và ghi lại sự gia tăng giá trị mật độ quang (OD) ở bước sóng A _{247nm} trong khoảng 10 phút. Thu được ΔA _{247nm} /phút.		

* *Tính hoạt độ enzym:*

Tính hoạt độ theo thể tích

$$U/ml \text{ enzym} = \frac{(\Delta_{47nm}/\text{min Test} - \Delta_{47nm}/\text{min Blank}) \cdot 3 \cdot df}{0,54 \cdot 0,1}$$

Trong đó:

3: tổng thể tích (ml) của hỗn hợp phản ứng.

df: yếu tố pha loãng (nếu có).

0,54: hệ số dập tắt của Na-p-Tosyl-L-Arginine ở bước sóng 247nm

0,1: thể tích (ml) của enzym được sử dụng.

Tính hoạt độ theo khối lượng:

$$U/mg = \frac{U/ml \text{ enzym}}{mg/ml \text{ enzym}}$$

10.2. Xác định hoạt độ enzym lipase (triglyceride lipase)

Lipase là các enzym xúc tác quá trình thủy phân lipid. Chúng bao gồm photpholipase, lipolytic acyl hydrolase, galactolipase và

triacylglycerol lipase. Lipase là yếu tố quan trọng đối với trao đổi chất nội bào, cụ thể là đối với quá trình phân giải lipit, nhóm enzym này còn đóng vai trò trong quá trình truyền tín hiệu, vận chuyển lipit trong quá trình hạt nảy mầm, và phân giải lipit màng sinh chất trong suốt quá trình già hóa.

10.2.1. Xác định hoạt độ enzym lipase bằng phương pháp chuẩn độ sử dụng dầu lạc làm cơ chất (theo Nguyễn Văn Mùi)

* Nguyên tắc thí nghiệm: dưới tác dụng của enzym lipase, lipit bị thủy phân giải phóng axit béo và glycerin. Hàm lượng axit béo được chuẩn độ bằng kiềm. Hoạt độ enzym là lượng kiềm cần để trung hòa axit mới được giải phóng ra. Cơ chất tốt nhất đối với lipase chính là lipit của cùng một đối tượng.

* Thiết bị và vật liệu:

Bình nón loại 100ml, cối chày sứ, bếp điện, tủ ấm...

Đệm axetat pH 4,7 (dung dịch a - axit axetic 0,2M được chuẩn bị bằng cách lấy 11,55ml axit axetic đặc, dẫn nước đến 1000ml. Dung dịch b – dung dịch natri axetat 0,2M được chuẩn bị bằng cách cân 16,4g CH_3COONa , dẫn nước đến mức 1000ml. Lấy 25,5ml dung dịch a + 25,5ml dung dịch b, dẫn nước đến 100ml), cồn 96%, toluen, dung dịch NaOH 0,1N, chỉ thị màu phenolphthalein 1% (được chuẩn bị trong cồn), nitơ lỏng, diethylene, metanol...

* Cách tiến hành:

- Lấy mẫu nghiền nhỏ bằng cối chày sứ trong nitơ lỏng, cân 5g bột nghiền chứa enzym lipase, cho vào 2 bình nón loại 100ml (kí hiệu bình đối chứng và bình thí nghiệm), bổ sung 10ml nước vào cả 2 bình, lắc đều khoảng 2 giờ.

- Đun sôi bình đối chứng 3-5 phút để bất hoạt enzym.

- Bổ sung 1ml dầu lạc làm cơ chất và 5ml đệm axetat pH 4,7 vào cả hai bình, ủ ở 37°C trong 24 giờ.

- Sau đó bổ sung 25ml cồn 96% và 15 – 25ml diethylene:metanol (2:1 v/v).

- Chuẩn độ axit béo trong 2 bình bằng dung dịch NaOH 0,1N với chỉ thị màu là phenolphthalein 1%.

- Hoạt độ enzym lipase: lượng kiềm cần để trung hòa axit mới được giải phóng ra. Hoạt độ enzym lipase theo khối lượng mẫu:

$$X \text{ (U/mg)} = \frac{(V_{\text{NaOH}_{\text{TN}}} - V_{\text{NaOH}_{\text{ĐC}}}) \cdot f \cdot 10}{w}$$

+ X: hoạt độ enzym lipase

+ a: sốml NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm

+ b: sốml NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ bình đối chứng

+ w: mg khối lượng mẫu.

+ f: hệ số điều chỉnh NaOH (hoặc KOH) 0,1N (trong trường hợp chúng ta sử dụng hóa chất nguyên chuẩn từ ống fixanal NaOH thì $f = 1$, còn tự pha thì phải hiệu chỉnh để xác định nồng độ chính xác của NaOH 0,1N.

Theo định luật đương lượng: Các chất có cùng nồng độ đương lượng thì phản ứng theo đúng thể tích bằng nhau $V_1 N_1 = V_2 N_2$.

Từ biểu thức: nếu biết V_1, N_1, V_2 , cần tính N_2 :

$$N_2 = \frac{V_1 \cdot N_1}{V_2} = f \cdot N_1 \left(f = \frac{V_1}{V_2} \right), f - \text{được gọi là hệ số điều chỉnh.}$$

F được xác định như sau:

+ Cho vào bình tam giác 10ml H_2SO_4 0,1N nguyên chuẩn;

+ Bổ sung 1-2 giọt phenolphthalein vào bình tam giác chứa axit để làm chất chỉ thị;

+ Cho dung dịch NaOH 0,1N vừa pha vào buret;

+ Nhỏ từ từ NaOH vào bình tam giác đựng H_2SO_4 0,1N với chỉ thị phenolphthalein, lắc đều trong quá trình chuẩn độ, đến khi xuất hiện màu hồng thì dừng lại. Đọc thể tích NaOH đã chuẩn (giả sử 12ml);

+ Thay vào biểu thức định luật đương lượng có:

$$10 \times 0,1 = N_2 \times 12 \rightarrow N_2 = \frac{10 \times 0,1}{12} = \frac{1}{12} \left(f = \frac{10}{12} \right)$$

10.2.2. Xác định hoạt độ enzym lipase bằng phương pháp chuẩn độ sử dụng oliu làm cơ chất

Quy trình này được xây dựng trên cơ sở tham khảo quy trình và sử dụng hóa chất chuẩn của hãng Sigma-Aldrich.

* Hóa chất:

Hóa chất A: dung dịch đệm Tris - HCl 200mM, pH 7,7 ở 37°C.

Hóa chất B: dung dịch dầu oliu cơ chất cho lipase.

Hóa chất C: cồn 95%.

Hóa chất D: dung dịch chỉ thị thymolphthalein 0,9% (w/v).

Hóa chất E: dung dịch chuẩn độ NaOH 50mM.

Hóa chất F: dung dịch enzym lipase.

* Cách tiến hành:

Cho các hóa chất sau vào dụng cụ chứa thích hợp (ml):

Hóa chất	Bình Test	Bình Blank
Nước đề ion	2,50	2,50
Hóa chất A (đệm)	1,00	1,00
Hóa chất B (dầu oliu)	3,00	3,00
Lắc đều ở 37°C. Sau đó bổ sung:		
Hóa chất F (dung dịch enzym)	1,00	----
Lắc đều ở 37°C trong 30 phút. Ngay sau khi ủ, lấy pipet hút 1ml hóa chất F cho vào bình tam giác 50ml, ghi nhãn "Blank", và bảo quản ở 0 - 4°C.		
Sau 30 phút, chuyển dung dịch ở bình Test sang bình tam giác 50ml ghi nhãn "Test" và dung dịch ở bình Blank sang bình tam giác 50ml ghi nhãn "Blank". Rồi bổ sung:		
Hóa chất C (cồn 95%)	3,00	3,00
Đảo đều và bổ sung 4 giọt hóa chất D vào 2 bình tam giác Test và Blank.		
Chuẩn độ mỗi bình bằng Hóa chất E (NaOH) đến khi xuất hiện màu xanh sáng (nên sử dụng buret loại 25ml với độ chính xác 0,1ml để chuẩn độ).		

* *Tính hoạt độ enzym*

Hoạt độ theo thể tích:

$$U/ml \text{ enzym} = \frac{V_{NaOH} \cdot 1000 \cdot 2 \cdot df}{1}$$

Trong đó:

V_{NaOH} (ml): là hiệu thể tích NaOH dùng chuẩn độ bình Test và Blank (ml).

1000: hệ số chuyển từ mili đương lượng sang micro đương lượng.

2: hệ số chuyển đổi thời gian từ 30 sang 1 giờ.

df: yếu tố pha loãng (nếu có).

1: ml dung dịch enzym được sử dụng.

Hoạt độ theo khối lượng mẫu ban đầu: bằng hoạt độ theo thể tích chia cho khối lượng mẫu ban đầu (mg):

$$U/mg = \frac{U/ml \text{ enzym}}{W(mg)}$$

10.3. Xác định hoạt độ enzym α -amylase và β -amylase (theo Nguyễn Văn Mùi)

α -amylase (1,4- α -D-Glucan glucanohydrolase) đóng vai trò chìa khóa trong trao đổi chất ở thực vật bằng phản ứng thủy phân tinh bột trong quá trình hạt nảy mầm và ở các mô khác. Sự phân cắt của enzym này chủ yếu là cắt ở vị trí α -1,4 của amylose và amylopectin, đây là các thành phần quan trọng của các hạt tinh bột trong tế bào. Thực vật có thể tích lũy năng lượng mặt trời bằng cách tạo ra đường. Amylase trong thực vật sẽ hỗ trợ thực vật trong giai đoạn đầu của sự phát triển trước khi cây có thể quang hợp. Trong một nghiên cứu về sự nảy mầm ở hạt ngũ cốc, enzym này đã được tìm thấy trong lớp aloron, enzym này sẽ thủy phân tinh bột của nội nhũ thành đường để cung cấp năng lượng cho các hoạt động sinh

trưởng và phát triển của mầm. Amylase nhạy với nhiệt độ, khi nhiệt độ trong hạt giống quá cao, enzym này ngừng hoạt động và do đó hạt không thể nảy mầm. Giberellin cũng tham gia vào sự nảy mầm của hạt và giai đoạn đầu của sự phát triển. Giberellin có một vòng tetra cyclic diterpen, nên chất này được coi là tín hiệu của thúc đẩy amylase xúc tác chuyển tinh bột thành đường.

Ở thực vật có cả α -amylase và β -amylase. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, hoạt động của β -amylase tăng cường được cảm ứng bởi lạnh và nhiệt độ cao. β -amylase có trong chất nền stroma của lục lạp tế bào mô thịt lá, không bào và chất tế bào. Sự hoạt động biểu hiện của enzym này được cảm ứng bởi nhiệt độ thấp và nhiệt độ cao. Trên đối tượng *Arabidopsis* khi bị stress lạnh ở 4°C trong 12 giờ, sự biểu hiện của enzym này tăng lên khoảng 14 lần. Tương tự trên đối tượng củ khoai tây khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 20°C xuống 5°C hoặc 3°C, hoạt động của enzym này tăng gấp 4-5 lần trong khoảng 10 ngày và sau đó là sự tích đường maltose. Stress nhiệt độ cao cảm ứng hoạt độ của enzym này, chẳng hạn như ở lúa mì sinh trưởng ở nhiệt độ 25°C tới 35°C dẫn đến tăng hoạt động của β -amylase.

10.3.1. Xác định hoạt độ enzym α -amylase

* Nguyên tắc thí nghiệm: Các nhóm khử được giải phóng ra từ thủy phân tinh bột sẽ khử axit 3,5-dinitrosalixilic, kết quả là hình thành sản phẩm có màu có thể đo được bằng quang phổ ở bước sóng 540nm.

* Định nghĩa đơn vị: Một đơn vị hoạt độ enzym là lượng enzym phân giải tinh bột tan tương ứng với 1 μ mol maltose/phút ở 25°C, pH 6,9.

* Thiết bị và vật liệu:

- Đệm natri photphat 0,02M (pH 6,9) chứa NaCl 0,006M hoặc sử dụng đệm xitrat 0,1M (pH 5,0), NaOH 2,0M

- Thuốc màu axit dinitrosalixilic: hòa tan 1g axit 3,5-dinitrosalixilic trong 20ml NaOH 2M. Sau đó bổ sung từ từ 30g natri kali tartrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dâng nước đến mức 100ml bằng nước cất. Bảo quản trong lọ kín tránh CO_2 , *lưu ý*: dung dịch này ổn định trong 2 tuần.

- Tinh bột 1% (w/v): hòa tan 1g tinh bột trong 100ml đệm đã chuẩn bị ở trên. Đun sôi nhẹ để hòa tan. Làm mát và dâng thể tích đủ 100ml nếu cần. Ủ ở 25°C trong 5 phút trước khi dùng phân tích.

- Dung dịch maltose chuẩn: hòa tan 360mg maltose ($M = 360,3$ đvC) trong 100ml nước tinh khiết bằng bình định mức thu được dung dịch nồng độ 10mM (10mmol/ml).

- Chuẩn bị dung chiết enzym: lấy 1g lá tươi nghiền trong 20ml nước cất bằng cối chày sứ đã làm lạnh. Ly tâm 24.000 vòng/30 phút ở 4°C . Dịch trong phía trên dùng để phân tích hoạt độ enzym.

* Cách tiến hành:

- Điều chỉnh máy đo quang phổ về bước sóng 540nm ở 25°C và điều chỉnh bể ổn nhiệt tới 25°C .

- Dùng pipet lấy 0,5ml dung dịch enzym cho vào ống nghiệm (ống kiểm tra) và ống đối chứng chứa 0,5ml nước cất.

- Ủ các ống này ở 25°C trong 5 phút.

- Sau một khoảng thời gian, bổ sung 0,5ml dung dịch tinh bột (đã có nhiệt độ 25°C) và ủ đúng 3 phút ở 25°C .

- Đúng 3 phút sau khi bổ sung tinh bột, thêm 1ml thuốc thử axit dinitrosalixilic vào các ống với khoảng thời gian đều nhau giữa các ống.

- Đặt các ống vào bể ổn nhiệt để đun sôi trong 10 phút

- Làm mát ở nhiệt độ phòng và thêm 10ml nước cất vào mỗi ống, đảo nhẹ.

- Đo $\text{OD}_{540\text{nm}}$ sau khi đã chỉnh cân bằng ánh sáng qua cuvet đối chứng và cuvet mẫu (Autozero) bằng ống đối chứng.

- Xác định μmol maltose đã giải phóng dựa vào đường chuẩn maltose.

* Tính hoạt độ enzym:

Một đơn vị hoạt độ α -amylase được định nghĩa là lượng enzym cần thiết để tạo ra 1mg maltose trong 3 phút:

$$U/ml = \frac{\mu\text{mol maltose (release).df}}{0,5.3}$$

Trong đó:

μmol maltose (release): lượng maltose được giải phóng ra, được tính dựa vào đường chuẩn maltose.

df: hệ số pha loãng nếu cần

0,5: thể tích dịch chiết enzym sử dụng phản ứng

3: thời gian phản ứng.

* Cách xây dựng đường chuẩn maltose:

- Chuẩn bị 5 ống nghiệm để dựng đường chuẩn:

STT	Ống 1	Ống 2	Ống 3	Ống 4	Ống Đ/c
Nước cất (ml)	0,95	0,90	0,85	0,80	1,00
Dung dịch maltose chuẩn (ml)	0,05	0,10	0,15	0,20	-----

Trộn và đặt vào bình nước sôi trong 10 phút, sau đó làm nguội trong chậu đá

Thuốc thử (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
----------------	------	------	------	------	------

Trộn và đặt vào bình nước sôi trong 10 phút, sau đó làm nguội trong chậu đá

- Đo $OD_{\text{chuẩn}} - OD_{\text{đối chứng}}$ ở bước sóng 540nm tương ứng với các nồng độ maltose. Từ đó xây dựng đường chuẩn maltose.

10.3.2. Xác định hoạt độ enzym β -amylase

- β -amylase phân hủy liên kết α -1,4-glucan trong polisaccarit, tách maltose ra khỏi đầu không khử của chuỗi.

- Cách xác định hoạt độ β -amylase tương tự như với α -amylase chỉ thay đổi thành phần đệm photphat thành đệm axetat 10mM (pH 4,8) hoặc đệm xitrat 0,1M (pH 3,4).

10.4. Xác định hoạt độ catalase

Catalase là enzym chủ yếu loại bỏ H_2O_2 được tạo ra trong peroxisom bởi quá trình quang hô hấp. Hoạt động của enzym này giảm xuống khi quá trình quang hô hấp bị ức chế chẳng hạn khi nồng độ CO_2 cao. Catalase thực vật được mã hóa bởi một họ gen nhỏ, thường gồm 3 gen isozym, có mô hình biểu hiện rất khác nhau về không gian cũng như thời gian trong suốt đời sống của thực vật. Khi thực vật bị stress nước, ở mức nội bào sẽ tạo ra các oxi gây hại (reactive oxygen species) chẳng hạn như gốc supeoxit (O_2^-), H_2O_2 và gốc OH^- tự do, đây là nguyên nhân gây hư hại cho màng sinh chất. Và một trong những cơ chế giải độc của thực vật đó là hệ thống các enzym chống oxi hóa: superoxit dismutase chuyển gốc supeoxit thành O_2 và H_2O_2 , sau đó H_2O_2 được giải độc nhờ enzym catalase và ascorbat peroxidase. Hoạt động của catalase tăng liên quan đến tăng khả năng chịu stress.

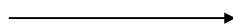
10.4.1. Xác định hoạt độ enzym catalase bằng phương pháp chuẩn độ (theo Nguyễn Quang Vinh và CS)

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Catalase xúc tác cho phản ứng:



Để định lượng catalase có thể dùng dung dịch $KMnO_4$ 0,1N để xác định lượng H_2O_2 trước và sau khi enzym tác dụng, từ đó tính lượng H_2O_2 đã bị chuyển hóa.



Từ phản ứng trên có 1ml dung dịch KMnO_4 0,1N tương ứng với 1,7mg H_2O_2 .

* Thiết bị và vật liệu:

- Đệm photphat 50mM (pH 7,0): (a) hòa tan 6,81g KH_2PO_4 trong 1000ml nước cất; (b) hòa tan 11,41g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ trong 1000ml nước cất; trộn dung dịch a và b cho đến khi đạt pH 7,0.

- KMnO_4 0,1N, H_2SO_4 10%, H_2O_2 0,1% trong đệm photphat 50mM (pH 7).

- Chiết enzym:

- o Cân 200mg lá, nghiền trong 10ml đệm photphat (pH 7,0) 50mM.
- o Ly tâm lạnh ở 17000g/15 phút/2°C.
- o Dịch trong phía trên là dịch chiết enzym thu được.

* Cách tiến hành:

Lấy 2 bình nón dung tích 100ml:

Bình thí nghiệm

Dung dịch H_2O_2 0,1% (ml): 10

Dịch chiết enzym (ml): 10

Giữ ở 30°C trong 30 phút

Axit H_2SO_4 10% (ml): 5

Chuẩn độ H_2O_2 dư thừa bằng KMnO_4 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng bền

Bình đối chứng

Dịch chiết enzym (ml): 10

Đun sôi cách thủy trong 5 phút để biến tính enzym, lấy ra để nguội

Dung dịch H_2O_2 0,1% (ml): 10

Giữ ở 30°C trong 30 phút

Axit H₂SO₄ 10% (ml): 5

Chuẩn độ H₂O₂ dư thừa bằng KMnO₄ 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng bền

* *Tính hoạt độ enzym:*

- Tính số mg H₂O₂ bị phân giải dưới tác dụng của enzym có trong a (g) mẫu:

$$x = \frac{(A-B).1,7.V_1}{V_2.a}$$

A: số ml KMnO₄ 0,1N đã dùng để chuẩn độ H₂O₂ dư thừa trong bình đối chứng

B: số ml KMnO₄ 0,1N đã dùng để chuẩn độ H₂O₂ dư thừa trong bình thí nghiệm

V₁: số ml dịch chiết enzym từ mẫu (= 10ml)

V₂: số ml dịch chiết enzym dùng cho phản ứng (= 10ml)

a : khối lượng (g) mẫu (200mg = 0,2g)

Số đơn vị catalase trong 1g mẫu (số μmol H₂O₂ bị phân giải trong 1 phút):

$$C(U/mg) = \frac{x}{0,034.30}$$

30: thời gian enzym tác dụng

0,034: 1 μmol đương lượng H₂O₂

10.4.2. Xác định hoạt độ enzym catalase bằng phương pháp quang phổ

Quy trình này được xây dựng trên cơ sở tham khảo quy trình và sử dụng hóa chất chuẩn của hãng Sigma-Aldrich.

Dựa vào khả năng hấp thụ ánh sáng UV 230-250nm của H₂O₂. Catalase xúc tác sự phân hủy H₂O₂ dẫn đến giảm sự hấp thụ theo thời gian. Hoạt độ enzym có thể được đo bằng sự giảm độ hấp thụ này.

* Hóa chất:

Hóa chất A: dung dịch đệm kali photphat 50mM, pH 7,0 ở 25°C.

Hóa chất B: dung dịch H₂O₂ 0,036% (w/w) dùng làm cơ chất: được chuẩn bị trong hóa chất A bằng cách dùng dung dịch H₂O₂ 30% (w/w), xác định OD_{240nm}. Ống Blank chứa hóa chất A. Giá trị OD này nên trong khoảng 0,55 và 0,52. Bổ sung đệm để tăng độ hấp thụ và bổ sung hóa chất A để làm giảm độ hấp thụ.

Hóa chất C: dung dịch enzym catalase, được chuẩn bị trong Hóa chất A.

* Cách tiến hành:

Cho các hóa chất sau vào cuvet thích hợp (ml):

Hóa chất	Test	Blank
Hóa chất A	----	3,0
Hóa chất B	2,9	----
Theo dõi độ hấp thụ A _{240nm} cho đến khi không đổi, sau đó bổ sung:		
Hóa chất C	0,1	----
Đảo nhẹ và ghi lại thời gian cần thiết để A _{240nm} giảm từ 0,45 đến 0,40.		
Hóa chất C (còn 95%)	3,00	3,00

* *Tính hoạt độ enzym:*

Hoạt độ enzym theo thể tích

$$U/ml \text{ enzym} = \frac{3,45 \cdot df}{t \cdot 0,1}$$

Trong đó:

3,45: Tương ứng với 3,45 μmol H₂O₂ bị phân hủy trong 3ml hỗn hợp phản ứng, làm giảm độ hấp thụ A_{240nm} từ 0,45 xuống 0,40.

df: yếu tố pha loãng (nếu có).

t (phút): thời gian cần cho độ hấp thụ giảm A_{240nm} từ 0,45 xuống 0,40.

0,1:ml enzym phân tích.

10.5. Xác định hoạt độ peroxidase

Peroxidase có rất nhiều dạng trong thực vật, vai trò của từng dạng đó đến nay vẫn chưa rõ ràng, tuy nhiên khi cây bị nhiễm bệnh thì hoạt độ peroxidase tổng số tăng lên. Peroxidase được coi như là một thông số sàng lọc với các stress sinh lý khác nhau. Hoạt động của enzym này tăng khi cây bị cảm ứng với lạnh, hạn, hạn muối và khi thiếu oxi. Hoạt động của enzym này cũng được dùng như là chỉ thị cho các kiểu ô nhiễm khác nhau, ví dụ khi mức độ ozon cao sẽ dẫn tới sự tăng cường hoạt động của enzym này.

10.5.1. Xác định hoạt độ enzym peroxidase bằng phương pháp so màu sử dụng pyrogallol làm cơ chất (theo Nguyễn Văn Mùi)

** Nguyên tắc thí nghiệm*

Peroxidase phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 , khi có mặt của chất cho hidro là pyrogallol. Sự oxi hóa pyrogallol thành sản phẩm có màu là purpurogallin có thể được đo quang phổ ở bước sóng 430nm với khoảng thời gian đặc hiệu. Cường độ sản phẩm tỷ lệ với hoạt độ enzym.

** Thiết bị và vật liệu:*

Pyrogallol: 0,05M trong đệm photphat 0,1M (pH 6,5), H_2O : 1% được chuẩn bị trong đệm photphat 0,1M (pH 6,5), dung dịch purpurogalin 0,4mg/ml trong H_2SO_4 1%, H_2SO_4 5%

** Cách tiến hành:*

- Mẫu thực vật được chuẩn bị trong đệm photphat như mô tả ở trên theo tỷ lệ 1:5, dịch nghiền đồng thể được sử dụng cho phân tích hoạt độ enzym.

- Lấy 1 ống thí nghiệm chứa: 3ml dung dịch pyrogallol, 0,1ml dịch chiết enzym, 0,5ml H_2O_2 1%. Ống đối chứng được chuẩn bị tương tự nhưng dịch chiết enzym được thay bằng đệm photphat.

- Ủ hỗn hợp ở 30°C trong 10 phút. Sau đó cho 1ml H_2SO_4 5% để dừng phản ứng.

- Đo OD_{430nm} của ống kiểm tra.

* *Tính hoạt độ enzym:*

- Từ giá trị OD_{430nm} đối chiếu với đường chuẩn purpurogallin để xác định lượng purpurogallin tạo ra.

- Một đơn vị hoạt độ là lượng enzym trong 10 phút xúc tác tạo thành 1μmol purpurogallin.

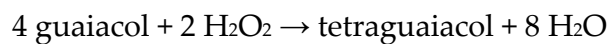
* Cách xây dựng đường chuẩn purpurogallin:

- Từ dung dịch purpurogallin 0,4mg/ml trong H₂SO₄ 1% pha loãng thành các nồng độ thấp hơn: 0,01mg/ml; 0,1mg/ml; 0,2mg/ml; 0,3mg/ml; 0,4mg/ml.

- Đo OD_{430nm} của các dung dịch trên, xây dựng đường chuẩn giữa OD và nồng độ purpurogallin.

10.5.2. Xác định hoạt độ enzym peroxidase bằng phương pháp so màu sử dụng guaiacol làm cơ chất

* Nguyên tắc thí nghiệm:



Sự hình thành tetraguaiacol làm tăng độ hấp thụ ở bước sóng 430nm.

* Hóa chất:

Đệm photphat 0,1M, pH 7,0.

Dung dịch guaiacol 20mM: hòa tan 240mg guaiacol trong 100ml nước (*chú ý*: guaiacol có mùi khó chịu nên cần thao tác trong tủ hút).

Dung dịch H₂O₂ 0,042% ~ 12,3mM: hòa tan 0,14ml H₂O₂ 30% (w/w) trong nước. Dung dịch này được chuẩn bị mới, OD_{240nm} của dung dịch này nên là 0,485.

Dịch chiết enzym: 1g mẫu mô thực vật tươi nghiền trong 3ml đệm photphat 0,1M (pH 7,0) (sử dụng cối chày sứ lạnh). Ly tâm

18.000xg ở 5°C trong 15 phút. Lấy dịch trong phía trên để phân tích (thực hiện phép đo trong khoảng 2 - 4 giờ sau chiết). Đặt trong đá trong quá trình phân tích.

* Cách tiến hành:

- Dùng pipet hút 3ml dung dịch đệm, 0,05ml dung dịch guaiacol, 0,1ml dung dịch enzym và 0,03ml dung dịch H₂O₂ vào cuvet Test (đặt dung dịch đệm vào nhiệt độ 25°C trước khi phân tích). (cuvet Blank cho các thành phần tương tự, thay 0,1ml enzym bằng dung dịch đệm).

- Đảo đều, đặt cuvet vào máy đo quang phổ.

- Đợi đến khi độ hấp thụ tăng đến 0,05. Dùng đồng hồ đếm giây ghi lại khoảng thời gian (Δt) cần thiết để độ hấp thụ tăng lên giá trị 0,1.

* Tính hoạt độ enzym:

Do hệ số dập tắt của sản phẩm khử guaiacol ở 436nm dưới điều kiện đặc hiệu là 6,39/ μ mol, nên hoạt độ enzym/lít dịch chiết được tính như sau:

$$\text{U/lít enzym} = \frac{3,18.0,1.1000}{6,39.1.\Delta t.0,1} = \frac{500}{\Delta t}$$

Chú ý:

- Giá trị hoạt độ enzym đạt độ chính xác cao khi Δt nằm trong khoảng 1 – 3 phút, do vậy có thể cần phải pha loãng dịch chiết enzym.

- O-dianisidine (1mg/ml metanol) có thể dùng để làm cơ chất cho peroxidase. O-dianisidine dạng oxi hóa (hợp chất màu vàng cam) được đo OD_{430nm}. Lấy 3,5ml đệm photphat (pH 6,5) vào cuvet sạch. Bổ sung 0,2ml dịch chiết enzym và 0,1ml dung dịch O-dianisidine. Đặt hỗn hợp phản ứng về nhiệt độ 28 - 30°C và sau đó đặt cuvet vào máy đo quang phổ đo OD_{430nm}. Sau đó, bổ sung

0,2ml H₂O₂ 0,2M và đảo nhẹ. Ngay sau đó dùng đồng hồ bấm giây bắt đầu ghi lại giá trị OD_{430nm}, cứ 30 giây ghi lại một lần, thực hiện trong 3 phút. *Nếu sự gia tăng giá trị OD quá nhanh thì cần pha loãng dịch chiết.* Bắt đầu pha tuyến tính (giữa OD_{430nm} và thời gian), đọc sự thay đổi độ hấp thụ trong 1 phút. Biểu diễn hoạt độ enzym là tỷ lệ gia tăng độ hấp thụ/phút/mg protein hoặc mô thực vật. Cuvet Blank sử dụng nước.

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM

11.1. Xác định hàm lượng nitơ tổng số

Nitơ tổng số bao gồm nitơ của protein và nitơ phi protein (nitơ phi protein bao gồm các loại muối khoáng, các loại axit amin...).

* Thiết bị và vật liệu:

Bộ công phá mẫu, bộ chưng cất của máy cất đạm, tủ hút, bộ chưng mẫu, chày cối sứ, cân, buret chuẩn độ, bình hình nón, găng tay. Các loại hóa chất K_2SO_4 , Se, H_2SO_4 98%, H_2O_2 , HCl.

Đối với các mẫu khô thường phải sấy khô đến khối lượng không đổi và nghiền nhỏ. Mỗi loại vật liệu khác nhau được làm theo quy trình cụ thể sau:

11.1.1. Phương pháp Kjeldahl xác định protein trong hạt ngũ cốc

* Nguyên tắc thí nghiệm: lượng protein trong một số ngũ cốc sấy ở $105^{\circ}C$ có khoảng như sau: lạc 22%, đậu tương 40%, lúa mì 15,4%, ngô 10,2%, yến mạch 12,7%.

* Cách tiến hành:

1. Đem nghiền mẫu rồi rây lấy hạt đường kính 2mm và sấy ở $105^{\circ}C$ cho đến khi khối lượng ổn định. Cân chính xác lấy 2g mẫu cho mỗi ống nung.

2. Hoá chất cho thêm vào mỗi ống nung: 7g K_2SO_4 + 5mg bột Se + 12ml H_2SO_4 96% + 5ml H_2O_2 35%.
3. Nung mẫu: tại 420°C trong 20 phút hoặc 370°C trong 60 phút.
4. Làm mát: hạ nhiệt ống nung về 50 - 60°C.
5. Chung cất theo chương trình đặt: 50ml H_2O , 50ml NaOH, thời gian chung = 3 phút, luồng hơi chung Steam = 100%.
6. Chuẩn độ sản phẩm thu được: cộng dung dịch chỉ thị (10 giọt) và chuẩn độ với dung dịch HCl 0,2 N. (1ml HCl 0,2 N = 2,803mg N-NH₄).

11.1.2. Phương pháp Kjeldahl xác định protein trong lá, thân, rễ

* Nguyên tắc thí nghiệm: hàm lượng protein trong loại mẫu này thường trong khoảng 3,6 đến 22,4%.

* Cách tiến hành:

1. Mẫu được nghiền và trộn đều, đổ vào mỗi bình nung 1 gam mẫu.
2. Thêm hoá chất vào mỗi bình nung: 3,5g K_2SO_4 + 3,5mg bột Se + 12ml axit H_2SO_4 96%, sau đó lắc đều.
3. Nung mẫu: theo chương trình nhiệt độ 150°C trong 30 phút, sau đó 420°C trong 60 phút.
4. Làm mát ống nung về 50 - 60°C.
5. Chung cất: đặt ống thu sản phẩm hình tam giác đã chứa 25ml axit boric vào đúng vị trí, lần lượt đưa các ống mẫu đã nung vào chung theo chương trình H_2O = 50ml, NaOH = 50ml (nồng độ 35%).
6. Chuẩn độ: chuẩn độ amoni điểm cuối tới pH = 4,7 với dung dịch HCl 0.1N.

11.2. Xác định hàm lượng lipit tổng số

Lipit là một hợp chất hữu cơ trong tế bào sống, không hòa tan được trong nước nhưng tan được trong các dung môi hữu cơ. Lipit là nguồn năng lượng cho cơ thể và có hàm lượng cao ở một số loại hạt như đậu tương, lạc, vừng...

* Thiết bị và vật liệu: cân, tủ lạnh, máy ly tâm, tủ sấy, eppendorf, dung dịch petroleum ether, mẫu.

* Cách tiến hành:

Mẫu hạt được sấy khô, bóc vỏ và nghiền mịn. Cân 0,5g mẫu cho vào các ống eppendorf, mỗi mẫu được nhắc lại 3 lần. Cho 1,5ml petroleum ether vào mỗi ống eppendorf, lắc đều để lạnh 4°C trong vòng 24 giờ, đem ly tâm 12000 vòng/phút trong 20 phút, chất bỏ dịch và lặp lại thí nghiệm 3 lần. Mẫu sau cùng được sấy khô trong eppendorf ở 70°C đến khối lượng không đổi rồi cân mẫu.

Hàm lượng lipit được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng lipit (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A - khối lượng mẫu ban đầu

B - khối lượng mẫu sau khi loại lipit.

11.3. Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp vi phân tích (theo Phạm Thị Trân Châu)

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Trong môi trường kiềm, đường khử kaliferixianua thành kaliferoxianua. Với sự có mặt của gelatin, kaliferoxianua kết hợp với sắt sunfat axit tạo thành phức chất xanh bền.

* Thiết bị và vật liệu:

- Dịch chiết từ thân mầm ngô: cân 1g mẫu, nghiền kĩ trong 10ml nước cất, ly tâm 7.000 vòng/15 phút. Thu dịch trong phía trên để phân tích.

- Dung dịch kaliferixianua: hòa tan 1,65g $K_3Fe(CN)_6$ và 10g Na_2CO_3 trong 1000ml nước cất. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu.

- Dung dịch sắt sunfat axit: hòa tan 1g $Fe_2(SO_4)_3$ trong 10ml H_2SO_4 đặc. Đổ từ từ dung dịch vào nước cất có sẵn trong bình định mức, pha loãng đến mức 1000ml.

- Gelatin 10%: cân 10g gelatin với 100ml nước cất, để lên máy gia nhiệt ở nhiệt độ $50^{\circ}C$ để hòa tan gelatin.

- Dung dịch sắt sunfat axit gelatin: trộn lẫn dung dịch sắt sunfat axit với gelatin 10% theo tỷ lệ 20:1. Hỗn hợp chỉ sử dụng trong ngày.

- Cối chày sứ, cốc thủy tinh, bình định mức, pipet...

- Máy ly tâm

- Máy gia nhiệt

- Máy quang phổ tử ngoại khả kiến UV-vis 2450(Shimadzu, Nhật Bản),...

* Cách tiến hành:

- Cho vào ống nghiệm 2ml dịch chiết đường và 2ml dung dịch kaliferixianua khuấy đều, đun sôi trong 15 phút, vừa đun vừa khuấy.

- Sau đó để nguội, thêm vào ống 4ml dung dịch sắt sunfat axit gelatin, khuấy đều, dẫn nước đến mức 20ml.

- Đo cường độ màu dung dịch trên máy so màu OD_{585nm} .

- Hàm lượng đường khử trong dung dịch đường suy ra từ đường chuẩn glucoz.

* Cách dựng đường chuẩn glucoz:

- Lấy 5 ống nghiệm đánh số thứ tự từ 1 đến 5, cho vào từng ống khối lượng đường tương ứng: 20, 40, 60, 80, 100mg trong 2ml dung dịch.

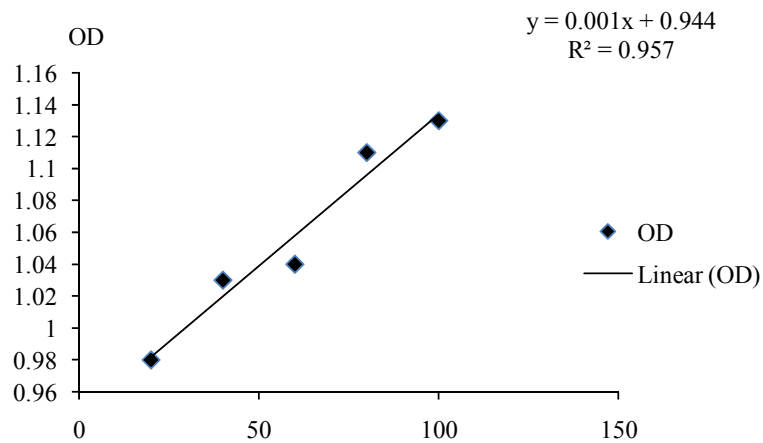
- Sau đó tiến hành tương tự như ống thí nghiệm, so màu, xác định OD_{585nm} .

- Dụng đồ thị chuẩn

- Kết quả đồ thị chuẩn:

Bảng nồng độ glucoz và giá trị OD_{585nm}

Nồng độ (µg/ml)	OD
20	0,98
40	1,03
60	1,04
80	1,11
100	1,13



- Phương trình đường chuẩn:

$$Y = 0,001.X + 0,944 (R^2 = 0,957)$$

Trong đó: X - nồng độ glucoz (µg/ml), Y - giá trị OD tương ứng

11.4. Xác định hàm lượng tinh bột

* Nguyên tắc thí nghiệm:

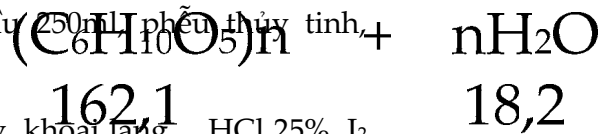
Dưới tác dụng của axit, thủy phân hoàn toàn tinh bột thành đường glucoz. Định lượng đường khử để suy ra hàm lượng tinh bột có trong nguyên liệu.



* Thiết bị và vật liệu:

- Thiết bị: cốc thủy tinh, bình cầu (250ml), phễu thủy tinh, giấy lọc.

Vật liệu: hạt lúa, hạt ngô, khoai tây, khoai lang... HCl 25%, I₂ 0,1N, NaOH 10%, giấy quỳ.



* Cách tiến hành:

Cách chuẩn bị dịch chiết tinh bột: cân 2g nguyên liệu, nghiền nhỏ, trộn đều, chuyển sang cốc. Cho vào cốc 100ml nước cất, khuấy đều trong khoảng từ 45 đến 60 phút, sau đó lọc tinh bột bằng phễu có giấy lọc. Tráng lại cốc và rửa tinh bột nhiều lần bằng nước cất để loại bỏ toàn bộ đường khỏi tinh bột.

Hệ số chuyển đổi F

- Chuyển phễu lọc chứa tinh bột sang bình cầu (loại 250ml), dùng đũa thủy tinh nhỏ chọc thủng giấy lọc, dôn tinh bột xuống bình cầu bằng nước cất (khoảng 80-100ml).

- Sau đó bổ sung 125ml HCl 25% vào bình cầu, lắp hệ thống sinh hàn, đặt bình cầu vào nồi cách thủy sôi, đun trong khoảng 2,5 - 3 giờ, thỉnh thoảng lắc bình.

- Kết thúc thời gian thủy phân tinh bột, làm nguội bình, trung hòa dung dịch thủy phân bằng NaOH 10%, dùng giấy quỳ thử sao cho dung dịch thủy phân không thừa kiềm.

- Thêm 1-2 giọt HCl 25% để dung dịch thủy phân được trung hòa, có môi trường axit yếu. Chuyển toàn bộ dung dịch sang bình định mức (loại 250ml), dùng nước cất dẫn đến mức của bình.

Khuấy đều, lọc dung dịch, được dịch lọc trong suốt dùng để định lượng đường khử (glucoz, mantoz,...) (sử dụng phương pháp vi phân tích).

- Sau khi xác định được khối lượng đường glucoz có trong dung dịch phân tích (mg), tính hàm lượng tinh bột (%) có trong nguyên liệu theo công thức:

Trong đó:

X (%): hàm lượng tinh bột

a: số mg glucoz

V₁: số ml dung dịch thủy phân (250ml)

0,9: hệ số chuyển đổi lượng glucoz sang tinh bột

V₂: số ml dung dịch đem phân tích

g: số mg nguyên liệu đem phân tích

11.5. Xác định hàm lượng nitrat trong rau bằng phương pháp quang phổ (theo Tanaka và cộng sự, 1982 được cải tiến bởi Gaya U.I. và cộng sự, 2006)

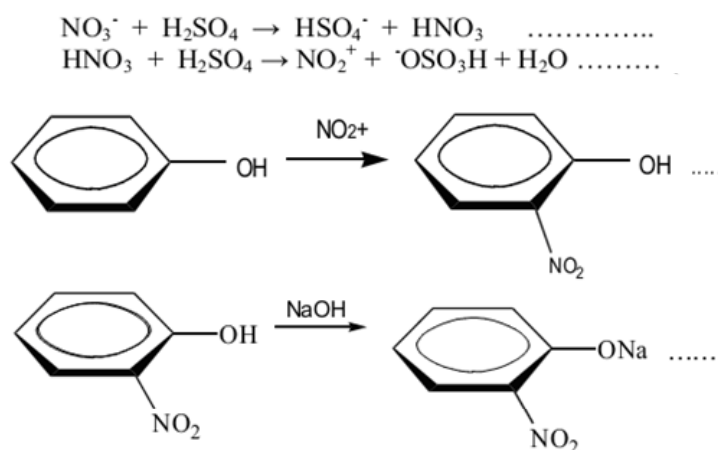
Nồng độ cao của nitơ trong đất có thể làm cho nồng độ của nitrat trong rau ăn cao và mức độ gây độc của nitrit có thể sẽ được tạo ra bởi hoạt động của vi khuẩn trong dạ dày của người sử dụng rau đó. Nitrat chứa trong rau là nguyên nhân quan trọng gây nên nhiều loại bệnh ở con người đặc biệt đối với trẻ em. Đối với kỹ thuật thủy canh, việc kiểm soát hàm lượng nitrat trong sản phẩm là có ý nghĩa, dưới đây là tiêu chuẩn hàm lượng nitrat cho phép trong một số loại rau quả theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới WHO (mg/kg sản phẩm):

X (%) = a.0,9

Loại cây	Hàm lượng NO ₃ ⁻	Loại cây	Hàm lượng NO ₃ ⁻
Dưa hấu	60	Hành tây	80
Dưa bở	90	Cà chua	150
Ớt ngọt	200	Dưa chuột	150
Măng tây	200	Khoai tây	250
Đậu quả	200	Cà rốt	250
Ngô rau	300	Hành lá	400
Cải bắp	500	Bầu bí	400
Su hào	500	Cà tím	400
Su lơ	500	Xà lách	1500

(nguồn : <http://www.rauhoaquaviệtnam.vn>)

* Nguyên tắc thí nghiệm: dựa trên sự nitơ hóa của phenol với nitrat và tạo thành nên muối natri tương ứng. Quá trình diễn ra như sau:



Do 1 mol natri nitrophenoxit được tạo ra từ 1 mol nitrat-nitơ. Bởi vì natri nitrophenoxit hấp thụ ánh sáng tử ngoại nên từ đó xác định được nitrat.

* Thiết bị và vật liệu:

- Hệ thống quang phổ tử ngoại khả kiến, máy lắc gia nhiệt, cốc thủy tinh 250ml, bình định mức, cối chày sứ, phễu chiết, pipet...

- Hóa chất: nước cất, Ag_2SO_4 5%, H_2SO_4 98%, phenol 5%, Na_2CO_3 10%, NaOH 4%, toluen...

* Cách tiến hành:

- Mẫu rau thu được mang nghiền nhỏ bằng cối chày sứ thành dạng đồng nhất. Lấy 10g của hỗn hợp vừa nghiền được cho vào cốc thủy tinh loại 250ml, cho vào cốc đó 70ml nước cất và 2,5ml NaOH 4%. Đun nóng ở 85°C trong 25 phút bằng máy lắc gia nhiệt.

- Hỗn hợp thu được đem lọc qua giấy lọc vào bình định mức loại 100ml.

- Lấy 4ml cho vào ống nghiệm, làm mát bằng cách ú vào đá. Bổ sung 1ml dung dịch Ag_2SO_4 5% sau khi đã bổ sung 7ml H_2SO_4 98% và 0,1ml dung dịch phenol 5%. Để yên hỗn hợp trong khoảng 20 phút (thi thoảng lắc nhẹ).

- Sau đó chiết hỗn hợp qua phễu tới thể tích 50ml bằng cách sử dụng toluen, quá trình được lắc bằng máy lắc trong 5-10 phút.

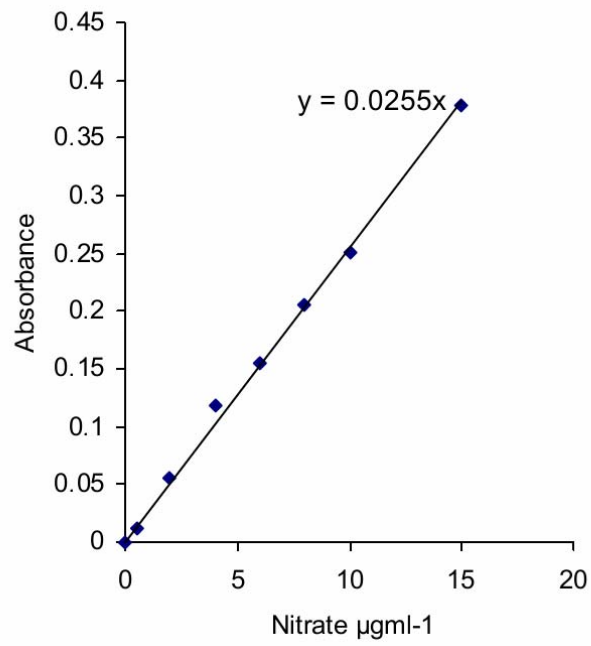
- Bỏ pha hòa tan trong nước phía dưới, pha chứa chất hữu cơ phía trên được rửa hai lần bằng 10ml nước cất, rửa được thực hiện bằng cách lắc trong 2 phút và sau mỗi lần lắc ta loại bỏ pha nước.

- Pha hữu cơ được chiết lại một lần nữa bằng cách lắc trong 1 phút với 10ml dung dịch Na_2CO_3 10% và sau đó thu dịch vào ống nghiệm. Đo độ hấp thụ OD ở bước sóng 407nm. Do lấy 4ml của 100ml dịch chiết đem phân tích nên lượng nitrat trong rau được tính theo công thức sau:

$$\text{nitrat } (\mu\text{g/g}) = \frac{C \cdot 100}{W_s \cdot 4}$$

Trong đó: C: nồng độ nitrat ($\mu\text{g/ml}$) được suy ra từ phương trình đường chuẩn (xem hình dưới)

W_s : khối lượng dịch nghiền được sử dụng (g).



Đồ thị đường chuẩn nitrat

Phương trình đường chuẩn: $Y = 0,0255X$

Trong đó:

Y - giá trị OD tương ứng với nồng độ X ($\mu\text{g/ml}$)

X - nồng độ nitrat ($\mu\text{g/ml}$)

PHÂN TÍCH THỐNG KÊ DỮ LIỆU THỰC NGHIỆM BẰNG CHƯƠNG TRÌNH EXCEL

12.1. Giới thiệu chung về phương pháp khảo sát mẫu và phần mềm Excel

12.1.1. Phương pháp khảo sát mẫu

Để đánh giá một đặc trưng sinh học nào đó của một quần thể, chúng ta sẽ gặp khó khăn thậm chí là không thể khảo sát hết tất cả các cá thể của quần thể đó, vì như vậy rất tốn kém về thời gian và công sức. Thay vào đó, chúng ta thu thập mẫu từ quần thể, sau đó sử dụng công cụ thống kê để khảo sát trên mẫu thu được để từ đó đưa ra kết luận cho tổng thể.

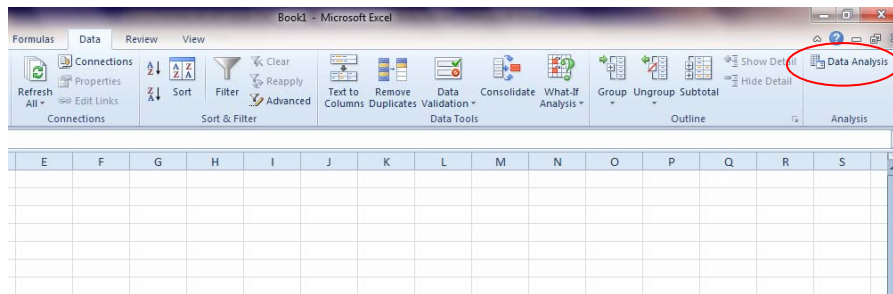
Tổng thể (population) là toàn bộ đối tượng mà ta cần nghiên cứu, số phần tử của tổng thể gọi là *dung lượng tổng thể* (ký hiệu là N), dung lượng tổng thể là một số vô hạn. Các đặc trưng của tổng thể: $F(x)$: luật phân phối xác suất của đặc tính sinh học X , μ : trung bình của tổng thể, σ : độ lệch chuẩn của tổng thể, N : kích thước tổng thể.

Mẫu (Sample) là một bộ phận của tổng thể, trên đó người ta tiến hành điều tra, đo đếm và thu thập tài liệu. Số phần tử của mẫu gọi là *dung lượng mẫu* (ký hiệu là n), dung lượng mẫu là một số hữu hạn. Các đặc trưng của mẫu X : trung bình mẫu, s : độ lệch chuẩn mẫu, n : kích thước mẫu. Các thí nghiệm tiến hành trên mẫu. Kết quả thu được qua xử lý thống kê trên mẫu được sử dụng

để suy đoán cho tổng thể. Do mẫu có kích thước hữu hạn (n rất nhỏ so với N) vì thế những kết luận về mẫu suy ra cho tổng thể sẽ có sai số, sai số này được gọi là sai số do chọn mẫu.

12.1.2. Phân tích thống kê bằng Microsoft Excel và thống kê mô tả

Excel là một chương trình bảng tính thuộc bộ Office của Microsoft, cho phép xử lý thống kê khá hiệu quả dữ liệu thông qua phần Add-in là Data analysis. Cách cài đặt phần Add-in này trong Excel 2010 như sau: File >Options > Add-ins > Analysis ToolPak > Go > OK. Sau khi cài đặt xong, trong menu Data sẽ có Data analysis:



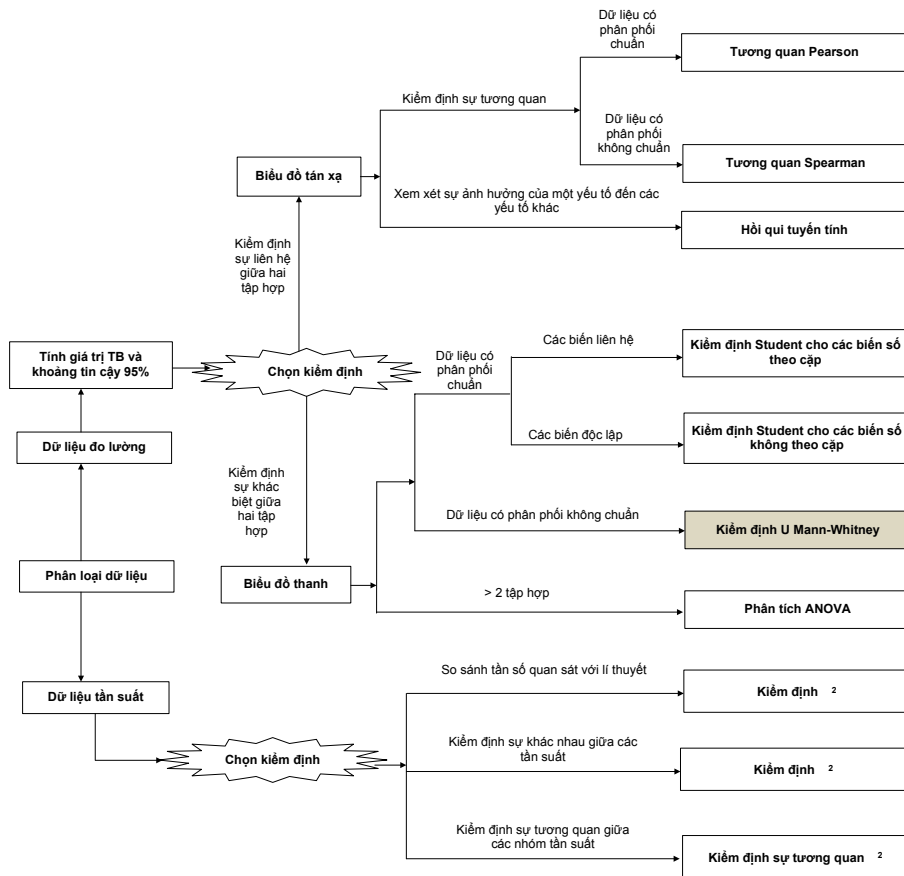
Những tính năng phân tích thống kê của chương trình bảng tính Excel được tóm tắt trong hình 1.

Các đặc trưng của mẫu: đại lượng trung bình, phương sai mẫu, độ lệch chuẩn mẫu, hệ số biến động...

- Đại lượng trung bình cộng:
$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

x_i : số lần nhắc lại của mẫu, n: kích thước mẫu, trung bình cộng là một tham số tiêu biểu cho một đặc tính, là xu hướng tập trung của số liệu. Trong Excel, đại lượng này được tính theo công thức:

```
=AVERAGE (miền dữ liệu)
```



Hình 12.1. Biểu đồ lựa chọn loại kiểm định thống kê thích hợp trong Excel (theo Neil Millar). Phần tô đậm thể hiện Excel không có chức năng này.

- Phương sai mẫu:
$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}$$

đối với mẫu nhỏ ($n < 30$) thì công thức tính phương sai:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}$$

Phương sai mẫu là tham số đặc trưng tiêu biểu nhất cho tính chất phân tán có số liệu. Trong Excel, đại lượng này được tính theo công thức:

=VAR (miền dữ liệu)

- Độ lệch chuẩn của mẫu: $s = \sqrt{s^2}$, độ lệch chuẩn biểu thị mức độ phân tán tuyệt đối (mức độ biến đổi tuyệt đối) của các giá trị khác nhau của một đặc tính sinh học. Độ lệch chuẩn càng lớn, mức độ biến động của đặc tính càng cao. Phương sai mẫu và độ lệch chuẩn mẫu có cùng thứ nguyên đại lượng trung bình cộng. Trong Excel, đại lượng này được tính theo công thức:

=STDEV (miền dữ liệu)

- Hệ số biến động: $CV = \frac{s}{x} \cdot 100$

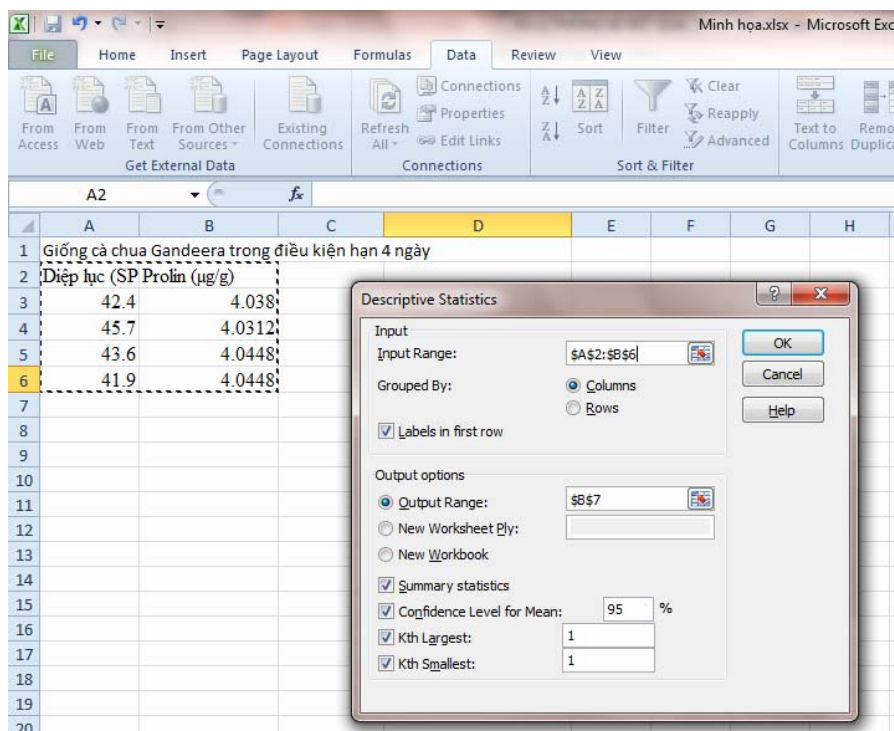
Khi so sánh hai mẫu có phương sai khác nhau về thứ nguyên, Pearson đưa ra khái niệm về hệ số biến động. Hệ số biến động đặc trưng cho độ chính xác của từng phương pháp thí nghiệm.

12.1.2.1. Các bước thực hiện thống kê mô tả trong Excel

Data analysis > Descriptive Statistics, khai báo:

- Input range: miền dữ liệu (kể cả nhãn).
- Grouped by: nhóm dữ liệu.
- Labels in first row: đánh dấu vào ô này nếu có nhãn ở đầu.
- Confidence level for mean: 95% (độ tin cậy 95%).
- K-th largest: 1 (1 số lớn nhất, 2 số lớn nhì).
- K-th smallest: 1 (1 số nhỏ nhất, 2 số nhỏ nhì).
- Output range: miền ra.
- Summary Statistics: đánh dấu nếu muốn hiển thị các tham số thống kê cơ bản.

Ví dụ 1: Nghiên cứu sự biến đổi của hàm lượng diệp lục tổng số (đơn vị: SPAD) và hàm lượng prolin ở giống cà chua Gandeera trong điều kiện hạn cho dữ liệu như hình 12.2.



Hình 12.2. Các bước thực hiện thống kê mô tả trong Excel

Kết quả thu được như sau:

Diệp lục (SPAD)		Prolin (µg/g)	
Mean	43.4	Mean	4.0397
Standard Error	0.8455767	Standard Error	0.003255
Median	43	Median	4.0414
Mode	#N/A	Mode	4.0448
Standard Deviation	1.69115345	Standard Deviation	0.006511
Sample Variance	2.86	Sample Variance	4.24E-05
Kurtosis	0.3752506	Kurtosis	-1.28926
Skewness	1.07511344	Skewness	-0.85456
Range	3.8	Range	0.0136
Minimum	41.9	Minimum	4.0312
Maximum	45.7	Maximum	4.0448
Sum	173.6	Sum	16.1588

Count	4	Count	4
Largest (1)	45.7	Largest (1)	4.0448
Smallest (1)	41.9	Smallest (1)	4.0312
Confidence Level (95.0%)	2.6910025	Confidence Level (95.0%)	0.01036

12.1.2.2. Phân tích kết quả

- Mean: giá trị trung bình của dãy số.
- Standard error: sai số chuẩn.
- Median: giá trị điểm giữa của dãy số.
- Mode: giá trị xuất hiện nhiều nhất trên mẫu.
- Phương sai mẫu hay độ lệch chuẩn mẫu (đã hiệu chỉnh): độ phân tán của số liệu quanh giá trị trung bình, nếu các giá trị này càng nhỏ chứng tỏ số liệu càng tập trung.
- Kurtosis: đánh giá đường mật độ phân phối của dãy số liệu có nhọn hơn hay tù hơn đường mật độ chuẩn tắc. Nếu trong khoảng từ -2 đến 2 thì có thể coi số liệu xấp xỉ chuẩn.
- Skewness: đánh giá đường phân phối lệch trái hay lệch phải. Nếu trong khoảng từ -2 đến 2 thì có thể coi số liệu cân đối gần như số liệu trong phân phối chuẩn tắc.
- Confidence Level: được hiểu là nửa độ dài khoảng tin cậy.

12.2. So sánh hai giá trị trung bình

Trong các nghiên cứu về sinh lý của thực vật, dữ liệu thu được phần lớn là dữ liệu định lượng, phần còn lại là dữ liệu định tính (ví dụ như đếm số hạt nảy mầm, đếm một tính trạng nào đó trong quần thể...). Và đại lượng đặc trưng nhất cho dữ liệu định lượng chính là đại lượng trung bình mẫu, phương sai mẫu, sai số chuẩn, khi cần so sánh hai hay nhiều giá trị trung bình, chúng ta có thể sử dụng tiêu chuẩn t-Student, LSD, phân tích ANOVA... nhưng đối với dữ liệu định tính, chúng ta không thể sử dụng

những tiêu chuẩn này để đánh giá mà phải dùng tiêu chuẩn *Khi bình phương* (χ^2). Đối với phần mềm Excel, việc so sánh dữ liệu định tính không được thuận tiện, do vậy vấn đề này chúng tôi sẽ đề cập trong tài liệu khác. Còn vấn đề so sánh giá trị trung bình được chúng tôi tập chung phân tích cả về mặt lí thuyết toán thống kê cũng như ứng dụng Excel để giải quyết.

Giả sử thí nghiệm có hai công thức và theo dõi một chỉ tiêu định lượng (đặc trưng sinh học) X nào đó, như chiều cao cây lúa thu hoạch của hai giống lúa khác nhau, hàm lượng axit amin prolin tích lũy trong lá đậu tương giữa hai công thức gây hạn khác nhau... Để đánh giá sự khác biệt giữa hai quần thể (số cá thể trong mỗi công thức thực nghiệm), dựa vào mẫu được rút ra từ hai tổng thể đó có kích thước mẫu lần lượt n_1 và n_2 qua đó ước lượng để đánh giá cho tổng thể. Cuối cùng kết luận μ_1 và μ_2 có khác nhau ở mức ý nghĩa α hay không?

- Đối với mẫu lớn thường sử dụng tiêu chuẩn u của phân phối chuẩn.

- Đối với mẫu nhỏ (ít nhất một trong hai kích thước mẫu ≤ 30) thường sử dụng tiêu chuẩn t của phân phối Student.

12.2. 1. So sánh hai số trung bình mẫu lớn, độc lập ($n > 30$)

* *Phương pháp so sánh:* Trong nghiên cứu các đặc trưng sinh lý của thực vật, thường các chỉ tiêu sinh lý như chiều dài thân mầm, chiều dài rễ mầm, diện tích lá, khối lượng tươi, khô của thân mầm và rễ mầm, hàm lượng diệp lục, các giá trị huỳnh quang diệp lục, số quả/cây, diện tích lá... thường là mẫu lớn.

Nếu kích thước của hai mẫu n_1 và n_2 đều lớn hơn 30 (tốt nhất là n_1, n_2 lớn hơn 100), thì theo luật số lớn, phân phối xác suất của \bar{X} xấp xỉ phân phối chuẩn $\bar{X} \sim N(\mu_1, \frac{\sigma^2}{n})$. Việc kiểm định sự bằng nhau của đại lượng trung bình được thực hiện bằng tiêu chuẩn U của phân phối chuẩn:

- Đặt giả thuyết $H_0: \mu_1 = \mu_2$ (hay $\mu_1 - \mu_2 = 0$), đối thiết: $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$
- Tính U thực nghiệm (U_m) của phân phối chuẩn với mức ý nghĩa α , thay $\sigma_1^2 \sim s_1^2, \sigma_2^2 \sim s_2^2$:

$$U_m = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}}$$

- Tra bảng U lí thuyết ở mức ý nghĩa α , kí hiệu U_α (tra bảng theo hàm $\Phi = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-\frac{x^2}{2}} dx$)

+ Nếu $|U_m| < U_\alpha \rightarrow$ chấp nhận giả thuyết H_0 nghĩa là hai giá trị trung bình khác nhau không có ý nghĩa thống kê, hay hai mẫu đó được rút ra từ một tổng thể.

+ Nếu $|U_m| \geq U_\alpha \rightarrow$ bác bỏ giả thuyết H_0 nghĩa là hai giá trị trung bình khác nhau có ý nghĩa thống kê, hay hai mẫu đó được rút ra từ hai tổng thể khác nhau.

* **Cách tiến hành trong Excel 2010:** Khi so sánh hai giá trị trung bình của hai mẫu lớn, người ta thường dùng hàm Z-test thay cho hàm U.

- Nhập giá trị theo hàng hoặc cột
- Tính phương sai mẫu 1, 2 theo công thức: =VAR (miền dữ liệu)
- Data analysis \rightarrow z-test: Two Sample For Means \rightarrow khai báo
 - + Variable 1 range: vùng dữ liệu của đặc trưng 1 (gồm cả nhãn)
 - + Variable 2 range: vùng dữ liệu của đặc trưng 2 (gồm cả nhãn)
 - + Hypothesized Mean Diffirence: ghi 0 (giả thuyết $H_0: \mu_1 = \mu_2$)
 - + Variable 1 variance (known): nhập giá trị phương sai mẫu 1
 - + Variable 2 variance (known): nhập giá trị phương sai mẫu 2
 - + Output: vùng kết quả.

* *Ví dụ:* So sánh chiều dài thân mầm (mm) của hai giống đậu tương DT84 và VX93 sau 3 ngày, dữ liệu cho ở bảng 12.1.

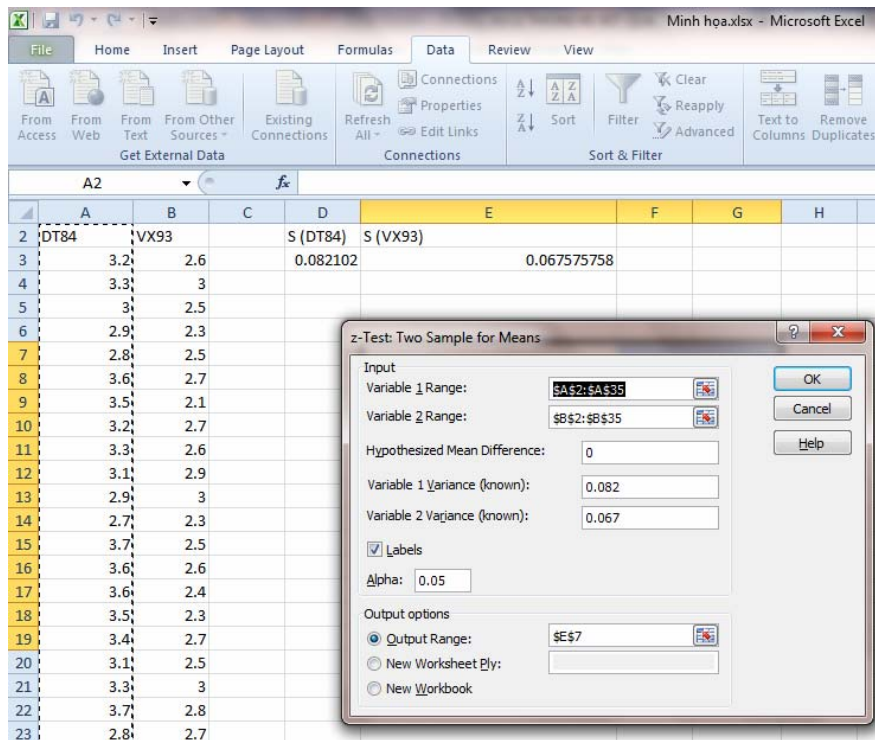
Bảng 12.1. Chiều dài thân của giống đậu tương DT84 và VX93 sau 3 ngày

DT84			VX93		
2.7	3.2	3.5	2.3	2.6	2.9
3.7	3.3	3.3	2.5	3.0	3.0
3.6	3.0	3.6	2.6	2.5	3.0
3.6	2.9	3.2	2.4	2.3	2.9
3.5	2.8	3.2	2.3	2.5	2.9
3.4	3.6	3.6	2.7	2.7	3.0
3.1	3.5	3.6	2.5	2.1	2.8
3.3	3.2	3.3	3.0	2.7	2.9
3.7	3.3	3.2	2.8	2.6	3.0
2.8	3.1	3.5	2.7	2.9	2.3
2.9	2.9	3.5	2.5	3.0	2.7

Nhập số liệu vào bảng tính Excel theo cột

Tính phương sai mẫu của từng cột dữ liệu trong Excel theo lệnh: =VAR (miền dữ liệu)

Data analysis → z-test: Two Sample For Means → khai báo bao gồm cả nhãn. (trong đó Hypothesized Mean Difference: 0, có nghĩa là kiểm định giả thuyết $H_0: \mu_1 = \mu_2$ (hay $\mu_1 - \mu_2 = 0$))



Hình 12.3. So sánh hai số trung bình mẫu lớn bằng Excel 2010

- Kết quả

z-Test: Two Sample for Means		
	DT84	VX93
Mean	3.290909	2.68484848
Known Variance	0.082	0.067
Observations	33	33
Hypothesized Mean Difference	0	
z	9.019447	
P(Z<=z) one-tail	0	
z Critical one-tail	1.644854	
P(Z<=z) two-tail	0	
z Critical two-tail	1.959964	

- Phân tích: từ bảng trên ta thấy giá trị tuyệt đối của z (=9,01) > z Critical two-tail (=1,95) → Bác bỏ H_0 chấp nhận H_1 có nghĩa là

chiều dài thân mầm của hai giống DT84 và VX93 khác nhau có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

12.2.2. So sánh hai số trung bình mẫu nhỏ, độc lập (n_1 hoặc/ và $n_2 \leq 30$)

* **Phương pháp so sánh:** Thông thường các đặc trưng trong sinh lý thực vật là các chỉ tiêu hóa sinh như hàm lượng prolin, hàm lượng protein, đường khử... thường được tiến hành thí nghiệm với kích thước mẫu nhỏ (<30) nên không dùng phương sai mẫu để ước lượng cho phương sai tổng thể, xảy ra hai trường hợp hoặc phương sai hai mẫu bằng nhau hoặc phương sai hai mẫu khác nhau.

Bài toán phụ:

Kiểm định giả thiết về sự bằng nhau của hai phương sai mẫu bằng kiểm định Fisher, sau đó kiểm định sự bằng nhau của hai giá trị trung bình mẫu theo từng trường hợp.

- Gọi 2 phương sai của hai mẫu lần lượt là: S_1^2, S_2^2 giả sử $S_1^2 > S_2^2$

- Đặt giả thuyết $H_0: \sigma_1 = \sigma_2$ hay $\frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} = \frac{\sigma_2^2}{\sigma_2^2} = 1$, đối thuyết $H_1: \sigma_1 \neq \sigma_2$

- Tính F thực nghiệm (F_{tn}): $F_{tn} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$

- Tra bảng $F_{(p, df_1, df_2)}$ (với $df_1 = n_1 - 1, df_2 = n_2 - 1$)

+ Nếu $F_{tn} < F_{it} \rightarrow$ chấp nhận giả thuyết H_0 nghĩa là hai phương sai khác nhau không có ý nghĩa thống kê (1).

+ Nếu $F_{tn} \geq F_{it} \rightarrow$ bác bỏ giả thuyết H_0 nghĩa là hai phương sai khác nhau có ý nghĩa thống kê (2).

- Cách giải bài toán phụ trong Excel, bài toán này được kiểm định bằng tiêu chuẩn FTEST.

+ Nhập dữ liệu vào bảng tính

+ Tính giá trị trung bình và phương sai mẫu theo công thức mục 1

+ Tính biến sai $d = \overline{x_1} - \overline{x_2}$, nếu $d \neq 0$ thì sang bước tiếp theo

+ Dùng chuột chọn Formulas \rightarrow gọi hàm fx (hoặc nhấp chuột vào Insert Function)

\rightarrow chọn mục Or select a category: Statistical, chọn Select a function: FTEST

+ Khai báo dữ liệu (**chú ý:** không nhập nhãn)

+ Kết quả: so sánh giá trị p tính được với 0,05, nếu $p > 0,05$ thì chấp nhận phương sai hai mẫu bằng nhau, nếu $p < 0,05$ thì phương sai hai mẫu khác nhau.

** Với trường hợp (1): phương sai của hai mẫu bằng nhau, việc so sánh giữa hai mẫu theo tiêu chuẩn t của phân phối Student:

- Đặt giả thuyết $H_0: \mu_1 = \mu_2$ (hay $\mu_1 - \mu_2 = 0$), đối thiết: $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

- Tính t thực nghiệm (t_{tn}) của phân phối Student với mức ý nghĩa α , với $s_1^2 = s_2^2 = s_c^2$

$$t_{tn} = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\left(\frac{s_c^2}{n_1} + \frac{s_c^2}{n_2}\right)}}$$

- Tra bảng t lí thuyết ở mức ý nghĩa α và bậc tự do $df = n_1 + n_2 - 2$. Kí hiệu $t_{(\alpha, df)}$

+ Nếu $|t_{tn}| < t_{(\alpha, df)} \rightarrow$ chấp nhận giả thuyết H_0 nghĩa là hai giá trị trung bình khác nhau không có ý nghĩa thống kê, hay hai mẫu đó được rút ra từ một tổng thể.

+ Nếu $|t_{tn}| \geq t_{(\alpha, df)} \rightarrow$ bác bỏ giả thuyết H_0 nghĩa là hai giá trị trung bình khác nhau có ý nghĩa thống kê, hay hai mẫu đó được rút ra từ hai tổng thể khác nhau.

** Với trường hợp (2): phương sai của hai mẫu khác nhau, việc so sánh giữa hai mẫu theo tiêu chuẩn t của phân phối Student:

- Đặt giả thuyết $H_0: \mu_1 = \mu_2$ (hay $\mu_1 - \mu_2 = 0$), đối thiết: $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

- Tính t thực nghiệm (t_{tn}) của phân phối Student với mức ý nghĩa α .

$$t_{tn} = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}}$$

- Tra bảng t lí thuyết ở mức ý nghĩa α được tính theo công thức:

$$t_{\alpha}^* = \frac{\left[t_{(\alpha, df1)} \frac{s_1^2}{n_1} \right] + \left[t_{(\alpha, df2)} \frac{s_2^2}{n_2} \right]}{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

+ Nếu $|t_{\text{tn}}| < t_{\alpha}^*$ → chấp nhận giả thuyết H_0 nghĩa là hai giá trị trung bình khác nhau không có ý nghĩa thống kê, hay hai mẫu đó được rút ra từ một tổng thể.

+ Nếu $|t_{\text{tn}}| \geq t_{\alpha}^*$ → bác bỏ giả thuyết H_0 nghĩa là hai giá trị trung bình khác nhau có ý nghĩa thống kê, hay hai mẫu đó được rút ra từ hai tổng thể khác nhau.

*** Cách thực hiện trong Excel 2010:**

- Kiểm định phương sai hai mẫu bằng FTEST.

- Kiểm định giả thuyết về giá trị trung bình hai mẫu.

+ Trường hợp phương sai hai mẫu bằng nhau ta sử dụng hàm t-Test: Two Sample Assuming Equal Variances trong Data analysis để kiểm định giả thuyết về giá trị trung bình hai mẫu.

+ Trường hợp phương sai hai mẫu khác nhau ta sử dụng hàm t-Test: Two Sample Assuming Unequal Variances trong Data analysis để kiểm định giả thuyết về giá trị trung bình hai mẫu.

*** Ví dụ:** So sánh hàm lượng prolin ($\mu\text{g/g}$) trong lá cà chua Grandeera ở hai công thức: đủ nước (đối chứng) và thiếu nước (thí nghiệm), với dữ liệu như bảng 12.2.

Bảng 12.2. Hàm lượng prolin trong lá cà chua Grandeera ở hai công thức thí nghiệm và đối chứng

Công thức	Nhắc lại 1	Nhắc lại 2	Nhắc lại 3	Nhắc lại 4
Đối chứng	4.038	4.0312	4.0448	4.0448
Thí nghiệm	4.0652	4.0992	4.0652	4.0856

Nhập dữ liệu vào bảng tính

- Tính giá trị trung bình, phương sai của hai mẫu theo công thức mục 1, tính d

- Kiểm định phương sai mẫu bằng hàm FTEST:

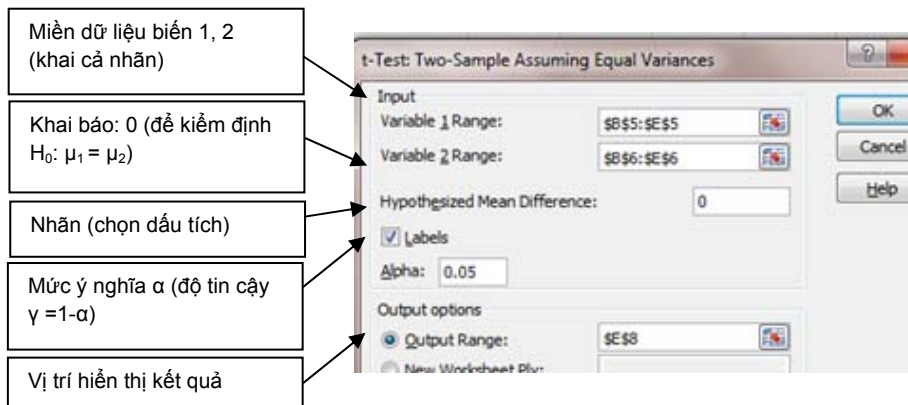
+ Formulas → Insert Function → FTEST → Khai báo dữ liệu (*chú ý:* không nhập nhãn) → được giá trị $p = 0,15$

+ So sánh $p (= 0,15) > 0,05 \rightarrow$ Chấp nhận hai phương sai mẫu bằng nhau

- Kiểm định giả thuyết về giá trị trung bình hai mẫu theo hàm t-Test: Two Sample Assuming Equal Variances

+ Data analysis \rightarrow t-Test: Two Sample Assuming Equal Variances

+ Khai báo mục Input:



- Kết quả:

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
	<i>ĐC</i>	<i>TN</i>
Mean	4.0397	4.0788
Variance	4.23867E-05	0.00027744
Observations	4	4
Pooled Variance	0.000159913	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	6	
t Stat	-4.372697329	
P(T<=t) one-tail	0.002352631	
t Critical one-tail	1.943180281	
P(T<=t) two-tail	0.004705261	
t Critical two-tail	2.446911851	

- Phân tích kết quả: giá trị tuyệt đối t Stat $> t$ Critical two-tail (hoặc so sánh $P(T \leq t)$ two-tail với 0,05) \rightarrow giá trị trung bình giữa hai công thức khác nhau có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa $\alpha=0,05$. Cụ thể là hàm lượng prolin ở công thức thí nghiệm cao hơn so với hàm lượng prolin ở công thức đối chứng.

12.2.3. So sánh hai số trung bình mẫu liên hệ (mẫu cặp đôi):

* **Khái niệm mẫu liên hệ:** Nếu ta đem hai giống lúa cấy trên một số ruộng, mỗi ruộng chia đôi, một nửa cấy giống A, một nửa cấy giống B thì cũng có hai mẫu cặp đôi để so sánh. Tương tự, nếu đo một chỉ số sinh lý hoặc sinh hoá của cây trồng trước khi tiến hành biện pháp kỹ thuật (chẳng hạn như phun bổ sung phân vi lượng...) và đo lại chỉ số đó sau một thời gian xử lý đó thì có hai mẫu quan sát cặp đôi để đánh giá hiệu quả của biện pháp đó. Chú ý rằng, khi rút hai mẫu cặp đôi ta có hai mẫu cùng số quan sát n , các số liệu sắp xếp thành cặp đứng ở hai cột cạnh nhau. Để so sánh hai giá trị trung bình trong trường hợp này ta dùng tiêu chuẩn t của phân phối Student.

* **Phương pháp so sánh:**

- Đặt giả thuyết $H_0: \mu_x \neq \mu_y$, đối thiết $H_1: \mu_x = \mu_y$.
- Tính các hiệu sai: $d_i = y_i - x_i$ (hiệu của hai mẫu)
- Tính độ lệch chuẩn của hiệu sai theo công thức sau:

$$|t_m| = \frac{|\bar{d}|}{s_d} = \frac{|\bar{d}|}{\sqrt{\frac{\sum d_i^2 - (\frac{\sum d_i^2}{n})}{n(n-1)}}$$

với $\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n}$, $s_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - \frac{(\sum d_i)^2}{n}}{n-1}$, sai số chuẩn $s_d = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$

(độ lệch chuẩn hiệu sai bình quân).

+ Nếu $|t_{tn}| < t_{(\alpha, n-1)} \rightarrow$ chấp nhận H_0 .

+ Nếu $|t_{tn}| \geq t_{(\alpha, n-1)} \rightarrow$ bác bỏ H_0 .

* *Cách tiến hành trong Excel 2010*: Tiến hành và nhận xét tương tự như kiểm định t-test cho hai mẫu độc lập, tuân theo luật phân phối chuẩn nhưng thay bằng hàm t-Test: Paired Two Sample for Means.

12.3. So sánh nhiều giá trị trung bình

Khi cần so sánh đại lượng trung bình của hơn hai công thức, chúng ta không thể dùng một loạt kiểm định t cho từng cặp một, vì như vậy dễ gặp phải sai lầm loại I (xem thêm giáo trình xác suất thống kê). Để giải quyết vấn đề này, chúng ta sử dụng phân tích phương sai - ANOVA (Analysis of variance), đây là một công cụ thống kê mạnh, thường được thực hiện nhờ các gói phần mềm thống kê, phân tích ANOVA cho phép kết luận ảnh hưởng của nhân tố thí nghiệm đến kết quả thực nghiệm, sau đó để kiểm tra sự sai khác giữa các giá trị trung bình thì chúng ta có thể sử dụng phương pháp giới hạn sai khác nhỏ nhất của Fisher (Fisher's least significance difference - LSD).

Trong giáo trình này đề cập đến phân tích phương sai một nhân tố và hai nhân tố, cho ví dụ minh họa đối với từng trường hợp, các tính toán được thực hiện bằng tay để người đọc tiện theo dõi (còn phần ứng dụng các gói phần mềm để phân tích phương sai chúng tôi sẽ đề cập trong tài liệu khác).

12.3.1. Phân tích phương sai đối với thí nghiệm một nhân tố

* *Phương pháp phân tích*: Để phân tích phương sai một nhân tố cần thiết kế thí nghiệm kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi mức lặp lại một số lần, số lần lặp của các mức của nhân tố không cần phải bằng nhau.

- Đặt giả thuyết H_{0A} : tất cả các mẫu thực nghiệm đều không khác biệt nhau về căn bản, chỉ là những mẫu rút bất kỳ và độc lập trong tổng thể chung (nghĩa là các trung bình mẫu x_1, x_2, \dots, x_a là thuần nhất) - Hay nhân tố A không ảnh hưởng hoặc ảnh hưởng như nhau đối với tất cả các công thức thí nghiệm, Đối thiết H_1 : tác động của nhân tố A là không đều đến tất cả các công thức thí nghiệm.

- Thiết lập bảng các giá trị quan sát: giả sử khảo sát ảnh hưởng của nhân tố A với k mức (nhóm thí nghiệm) ($i = 1, 2, \dots, k$) khác nhau, mỗi mức tiến hành n thí nghiệm song song, rồi đánh số $j = 1, 2, \dots, n$

+ Các tính toán và kết luận dựa trên mô hình toán học: $x_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$, ($i = 1 \dots k$ và $j = 1 \dots n_i$), x_{ij} là giá trị trung bình của mức i, lần lặp thứ j, μ là trung bình chung, α_i là ảnh hưởng của mức i của nhân tố, ε_{ij} là sai số ngẫu nhiên hay còn gọi là sai số trong nội bộ một công thức.

+ Lập bảng ghi kết quả x_{ji} và tính thêm các dữ liệu:

$j \backslash i$	1	2	..i..	k	Tổng
1	x_{11}	x_{21}	x_{i1}	x_{k1}	$n = \sum_{i=1}^k n_i$
2	x_{12}	x_{22}	x_{i2}	x_{k2}	
..j..	.. x_{1j} x_{2j} x_{ij} x_{kj} ..	
n	x_{1n1}	x_{2n2}	x_{ini}	x_{knk}	
Kích thước mẫu mỗi cấp k	n_1	n_2	n_i	n_k	
$T_i = \sum_{j=1}^n x_{ij}$	T_1	T_2	T_i	T_k	$T = \sum_{i=1}^k T_i$
$x_i^2 = \sum_{j=1}^n x_{ij}^2$	x_1^2	x_2^2	x_i^2	x_k^2	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n x_{ij}^2$

+ Từ bảng này ta có:

$$\text{Tổng số quan sát: } n = \sum_{i=1}^k n_i = n_1 + n_2 + \dots + n_i + n_k.$$

Trung bình của mỗi nhóm thứ i : $\bar{x}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}$, gọi

$$T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} = \sum_{i=1}^k T_i, \text{ khi đó tính Trung bình mẫu chung:}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}}{n} = \frac{T}{n}$$

Tính các đại lượng:

$$SST = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}^2 - \frac{T^2}{n}, \quad SSA = \sum_{i=1}^k \left(\frac{T_i^2}{n_i} \right) - \frac{T^2}{n}, \quad SSE = SST - SSA$$

+ Thiết lập bảng phân tích phương sai:

Nguồn gốc của biến sai	Tổng bình phương(SS)	Bậc tự do	Bình phương trung bình (MS)	Tỉ số F
Tổng bình phương giữa các nhóm-SSA	SSA	k-1	$MSA = \frac{SSA}{k-1}$	$F_{tn} = \frac{MSA}{MSE}$
Tổng bình phương trong nhóm-SSE	SSE = SST-SSA	n-k	$MSE = \frac{SSE}{n-k}$	
Tổng bình phương chung-SST	SST	n-1		

- So sánh F_{tn} và $F_{(\alpha, k-1, n-k)}$:

+ Nếu $F_{tn} \geq F_{(\alpha, k-1, n-k)}$: H_0 bị bác bỏ. Nếu cần so sánh trung bình người dùng có thể tính theo phương pháp LSD (Least Significance Difference).

+ Nếu $F_{tn} < F_{(\alpha, k-1, n-k)}$: H_0 được chấp nhận.

* **Cách thực hiện trong Excel 2010:**

- Nhập số liệu theo hàng hoặc cột của bảng tính

- Data analysis → Anova: Single Factor → Khai báo
- + Input range: miền dữ liệu vào (gồm cả nhãn)
- + Grouped by: dữ liệu theo hàng (rows) hoặc cột (columns)
- + Label in the first row: nhãn
- + Alpha: mức ý nghĩa α
- + Output range: vị trí hiển thị kết quả

* *Ví dụ:* Phân tích ảnh hưởng của sự thiếu nước đến huỳnh quang diệp lục ổn định (F_0) của giống đậu tương DT84. Kết quả cho ở bảng 12.3:

Bảng 12.3. Giá trị F_0 của đậu tương DT84 trong điều kiện thiếu nước

Nhắc lại	CT1	CT2	CT3	CT4
1	282	295	288	265
2	300	324	299	287
3	272	304	327	239
4	280	281	290	263

Chú thích:

CT1: thiếu nước sau 2 ngày gây hạn nhân tạo

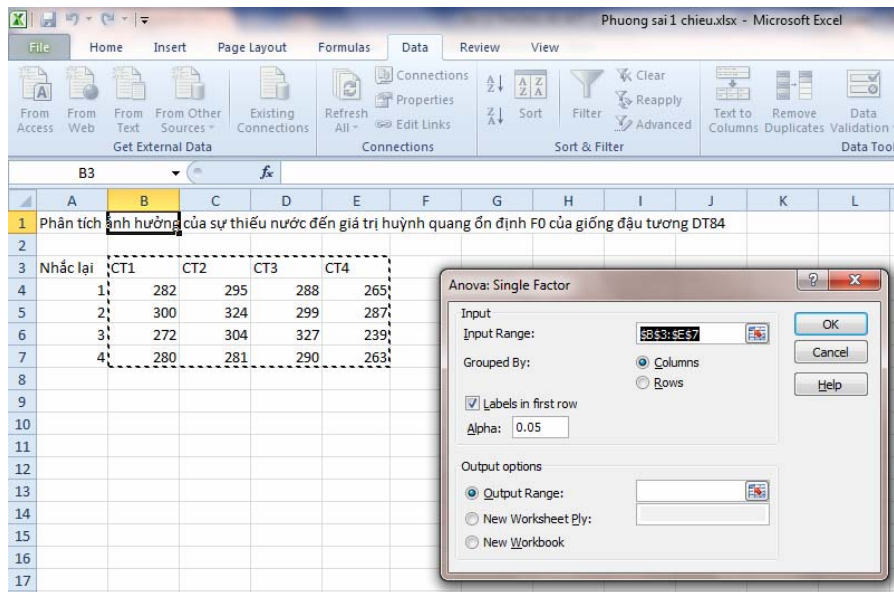
CT2: thiếu nước sau 3 ngày gây hạn nhân tạo

CT3: thiếu nước sau 4 ngày gây hạn nhân tạo

CT4: thiếu nước sau 5 ngày gây hạn nhân tạo

Vấn đề đặt ra là ta phải xem xét sự thiếu nước có ảnh hưởng đến F_0 không?

- Nhập dữ liệu vào bảng tính (giả sử theo cột)
- Data analysis → Anova: Single Factor → Khai báo



Hình 12.4. Phân tích phương sai một nhân tố

- Kết quả:

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
CT1	4	1134	283.5	139.6667		
CT2	4	1204	301	324.6667		
CT3	4	1204	301	323.3333		
CT4	4	1054	263.5	385		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	3825	3	1275	4.349062	0.027193	3.490295
Within Groups	3518	12	293.1667			
Total	7343	15				

- Phân tích kết quả:

+ Bảng ANOVA: source of Variation Between Groups là sai số giữa các công thức (giữa các mức khác nhau của nhân tố)-SSA, source of Variation Within Groups là sai số ngẫu nhiên trong công thức-SSE.

+ F tính được (= 4,349) > F crit (= 3,490) (hoặc P-value < 0,05) → bác bỏ H_0 nghĩa là sự thiếu nước có ảnh hưởng đến giá trị huỳnh quang diệp lục ổn định.

- Để so sánh các giá trị trung bình, có thể sử dụng phương pháp LSD của Fisher

LSD của Fisher là một phương pháp dùng để so sánh các giá trị trung bình sau khi giả thuyết H_0 (đặt các giá trị trung bình bằng nhau) bị bác bỏ bằng kiểm định F-test ANOVA. Nếu cần so sánh trung bình x_i (với n_i lần lặp) với trung bình x_j (n_j lần lặp), ta tính thêm LSD_α theo công thức:

$$LSD_\alpha = t_{(\alpha,df)} \cdot \sqrt{\left(\frac{s_c^2}{n_i} + \frac{s_c^2}{n_j}\right)}$$

trong đó s_c^2 : là phương sai chung được ước lượng bởi trung bình sai số bình phương trong nội bộ nhóm MSE (MS within groups), $\alpha = 1 - p$, và $t_{(\alpha,df)}$ là giá trị t của bảng Student ứng với mức ý nghĩa α và bậc tự do df. $t_{(\alpha,df)}$ có thể tìm được bằng cách tra bảng số hay bằng hàm TINV trong Excel.

+ tính trị tuyệt đối biến sai $|x_i - x_j|$

+ $t_{(\alpha,df)} = \text{TINV}(\alpha,df)$

+ tính LSD_α trong Excel theo công thức

$$LSD_\alpha = t_{(\alpha,df)} \cdot \text{SQRT}\left(\frac{\text{MSE}}{n_i} + \frac{\text{MSE}}{n_j}\right)$$

+ So sánh LSD với $d_{ij} = |x_i - x_j|$

Nếu $LSD \leq |d_{ij}| \rightarrow$ hai công thức sai khác.

Nếu $LSD > |d_{ij}| \rightarrow$ hai công thức không sai khác.

+ Thêm cột CTi - CT1, tính $t(0.05,12)$, $LSD_{0.05}$ như sau:

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	CTi-CT1	t(α ;df)
CT1	4	1134	283.5	139.6667		2.178813
CT2	4	1204	301	324.6667	17.5	Tính LSD α 26.37624
CT3	4	1204	301	323.3333	17.5	
CT4	4	1054	263.5	385	-20	
ANOVA						
Source of Variator	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	3825	3	1275	4.349062	0.027193	3.490295
Within Groups	3518	12	293.1667			
Total	7343	15				

+ So sánh $LSD_{0.05}$ với giá trị tuyệt đối CTi - CT1 để kết luận sai khác giữa các công thức CTi với CT1. Tiến hành tương tự cho tìm ra sai khác giữa công thức với CT2, CT3, CT4.

Chú ý: do có rất nhiều phương pháp khác nhau để tìm ra sự sai khác giữa các giá trị trung bình như phương pháp LSD đã trình bày ở trên, ngoài ra có thể sử dụng kiểm định đa biên độ Duncan, kiểm định Turkey và các phương pháp kiểm định khác nhau có thể cho kết quả giống hoặc khác nhau, do vậy khi trình bày kết quả so sánh giá trị trung bình, chúng ta phải ghi rõ là dùng kiểm định nào.

12.3.2. Phân tích phương sai đối với thí nghiệm hai nhân tố không lặp

Trong nghiên cứu thí nghiệm thực nghiệm hoặc thực địa (vườn ươm, đồng ruộng, phòng thí nghiệm...) người ta thường so sánh và phân tích sự tác động đồng thời của hai nhân tố lên kết quả thí nghiệm (như năng suất của cây trồng, địa hình với các phương thức tía thưa cây rừng v.v...)

Có rất nhiều kiểu thiết kế thí nghiệm để phân tích phương sai hai nhân tố tương tác, đơn giản nhất là thiết kế thí nghiệm trực

giao (hai nhân tố chéo nhau). Giả sử nhân tố A có k mức là A1, A2, ..., Ak và nhân tố B có r mức là B1, B2, ... Br. Số công thức là $k \cdot r$, mỗi công thức được lặp lại n lần. Như vậy chúng ta có tất cả $k \cdot r \cdot n$ ô thí nghiệm. Các công thức đó có thể được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD) hoặc theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD hoặc RCB).

- Thiết kế theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên:

+ Số ô thí nghiệm $k \cdot r \cdot n$, chuẩn bị các mẫu giấy, đánh số từ 1 $\rightarrow k \cdot r \cdot n$

+ Gấp thăm ngẫu nhiên n mảnh cho công thức 1 (không bỏ lại mẫu đã gấp thăm), gấp n mảnh tiếp theo cho công thức 2... cho đến khi còn lại n mảnh cho công thức cuối cùng.

- Thiết kế theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ

+ Chuẩn bị n là số khối

+ Trong mỗi khối chia thành $k \cdot r$ ô, các công thức được bố trí vào các ô theo kiểu CRD

Việc phân tích các thí nghiệm như vậy thường chia hai trường hợp: Trường hợp hai nhân tố với n lần lặp lại (trường hợp a); Trường hợp hai nhân tố với một lần lặp lại (trường hợp b).

12.3.2.1. Nhân tố A và B với n lần lặp lại

* **Phương pháp so sánh:** Giả sử thí nghiệm chịu tác động đồng thời của hai nhân tố A và B, nhân tố A được phân thành r cấp (theo hàng), nhân tố B được phân thành s cấp (theo cột), mỗi một cấp của A và B được thực hiện n quan sát. $x_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$. Với μ : trung bình chung, α_i : tham số đặc trưng cho ảnh hưởng của A đến x_{ijk} , β_j : tham số đặc trưng cho ảnh hưởng của B đến x_{ijk} , ε_{ijk} sai số ngẫu nhiên của quan sát.

- Bảng các giá trị quan sát:

A \ B	B ₁	B ₂	B _j	B _s	Tổng
A ₁	X ₁₁₁ X ₁₁₂ ... X _{11n}	X ₁₂₁ X ₁₂₂ ... X _{12n}	X _{1j1} X _{1j2} ... X _{1jn}	X _{1s1} X _{1s2} ... X _{1sn}	T _{1*}
.....
A _i	X _{i11} X _{i12} ... X _{i1n}	X _{i21} X _{i22} ... X _{i2n}	X _{ij1} X _{ij2} ... X _{ijn}	X _{is1} X _{is2} ... X _{isn}	T _{i*}
.....
A _r	X _{r11} X _{r12} ... X _{r1n}	X _{r21} X _{r22} ... X _{r2n}	X _{rj1} X _{rj2} ... X _{rjn}	X _{rs1} X _{rs2} ... X _{rsn}	T _{r*}
Tổng	T _{*1}	T _{*2}	T _{*j}	T _{*s}	T

- Tính các tham số sau:

+ T_{i*} là tổng của ns phần tử trong hàng thứ i hay T_{i*} là tổng của mỗi cấp theo dấu hiệu A

+ T_{*j} là tổng của nr phần tử trong hàng thứ j hay T_{*j} là tổng của mỗi cấp theo dấu hiệu B

$$T = \sum_{i=1}^r T_{i*} = \sum_{j=1}^s T_{*j}$$

- Đặt các giả thuyết:

+ H_{0A}: α_i = 0 nghĩa là nhân tố A không ảnh hưởng tới thí nghiệm hay các giá trị quan sát theo nhân tố A bằng nhau (khác nhau một cách ngẫu nhiên không có ý nghĩa thống kê).

+ H_{0B}: β_j = 0 nghĩa là nhân tố B không ảnh hưởng tới thí nghiệm hay các giá trị quan sát theo nhân tố B bằng nhau (khác nhau một cách ngẫu nhiên không có ý nghĩa thống kê).

+ H_{OAB} : không có sự tương tác giữa hai nhân tố A và B đến thí nghiệm.

- Bảng phân tích phương sai hai nhân tố:

Nguồn gốc biến sai	Tổng bình phương (SS)	Bậc tự do (df)	Bình phương trung bình (MS)	Tỉ số F
Nhân tố A (theo hàng)	$SSA = \sum_{i=1}^r \frac{T_{i.}^2}{ns} - \frac{T^2}{nrs}$	r-1	$MSA = \frac{SSA}{r-1}$	$F_A = \frac{MSA}{MSE}$
Nhân tố B (theo cột)	$SSB = \sum_{j=1}^s \frac{T_{.j}^2}{nr} - \frac{T^2}{nrs}$	s-1	$MSB = \frac{SSB}{s-1}$	$F_B = \frac{MSB}{MSE}$
Tương tác hai nhân tố A và B	$SSAB = SST - SSA - SSB - SSE$	(r-1)(s-1)	$MSAB = \frac{SSAB}{(r-1)(s-1)}$	$F_{AB} = \frac{MSAB}{MSE}$
Sai số	$SSE = (\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s \sum_{k=1}^n x_{ijk}^2) - (\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s \frac{(\sum_{k=1}^n x_{ijk})^2}{n})$	rs(n-1)	$MSE = \frac{SSE}{rs(n-1)}$	
Tổng chung	$SST = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s \sum_{k=1}^n x_{ijk}^2 - \frac{T^2}{nrs}$	nrs-1		

- Kết luận:

+ F_A dùng để kiểm tra giả thuyết H_{O_A} . Nếu $F_A \geq F_{\alpha, r-1, rs(n-1)}$ thì bác bỏ H_{O_A} .

+ F_B dùng để kiểm tra giả thuyết H_{O_B} . Nếu $F_B \geq F_{\alpha, s-1, rs(n-1)}$ thì bác bỏ H_{O_B} .

+ F_{AB} dùng để kiểm tra giả thuyết $H_{O_{AB}}$. Nếu $F_{AB} \geq F_{\alpha, (r-1)(s-1), rs(n-1)}$ thì bác bỏ $H_{O_{AB}}$.

* **Ví dụ và cách thực hiện trong Excel 2010:**

- Ví dụ: Có một thí nghiệm 2 nhân tố trong thiết kế kiểu RCB với 5 tỷ lệ đạm, 3 giống lúa với 4 lần nhắc lại. Năng suất được trình bày như bảng 12.4:

Bảng 12.4. Năng suất 3 giống lúa V₁, V₂ và V₃ với 4 lần nhắc lại trong kiểu thí nghiệm RCB

Mức phân Giống lúa	N0	N1	N2	N3	N4
V1	3.852	4.788	4.576	6.034	5.874
	2.206	4.396	4.454	5.267	5.916
	3.144	4.562	4.884	5.906	5.984
	2.894	4.608	3.924	5.652	5.518
V2	2.846	4.956	5.928	5.664	5.458
	3.794	5.128	5.698	5.362	5.546
	4.108	4.15	5.81	6.458	5.786
	3.444	4.99	4.308	5.474	5.932
V3	4.192	5.25	5.822	5.888	5.864
	3.754	4.582	4.848	5.524	6.264
	3.738	4.896	5.678	6.042	6.056
	3.324	4.286	4.932	4.756	5.362

Nhân tố A: phân đạm (có 5 mức hay chính là 5 công thức được kí hiệu N0, N1, N2, N3, N4), Nhân tố B: giống lúa (có 3 giống lúa, kí hiệu V1, V2, V3).

- Đặt giả thuyết:

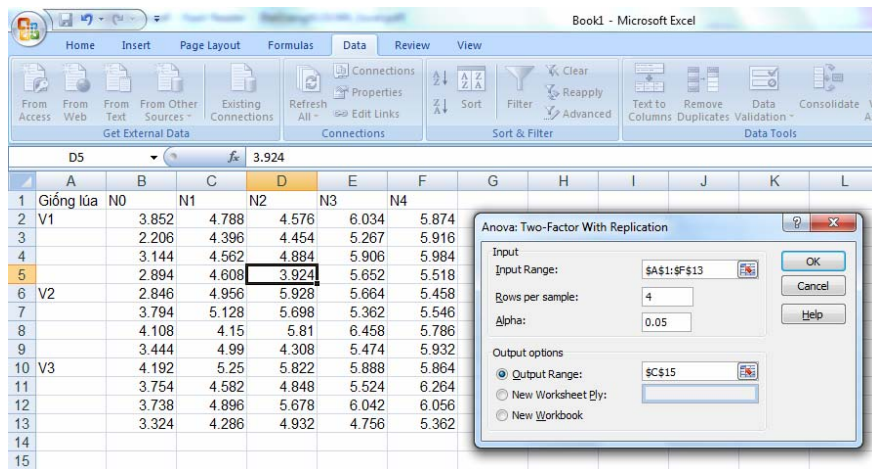
+ H_{0A}: năng suất lúa với các mức phân đạm khác nhau ngẫu nhiên (không phụ thuộc vào nhân tố phân đạm)

+ H_{0B}: năng suất với các giống lúa khác nhau là khác nhau ngẫu nhiên (không phụ thuộc vào giống)

+ H_{AB}: nhân tố đạm và giống *không ảnh hưởng đồng thời* tới năng suất lúa

- Nhập số liệu vào bảng tính Excel

- Thực hiện phân tích phương sai hai nhân tố với 4 lần nhắc lại: Menu Data → Data analysis → Anova: Two-Factor With Replication → khai báo như hình 12.5.



Hình 12.5. Phân tích phương sai hai nhân tố có lặp

- Kết quả

Anova: Two-Factor With Replication						
SUMMARY	N0	N1	N2	N3	N4	Total
V1						
Count	4	4	4	4	4	20
Sum	12.096	18.354	17.838	22.859	23.292	94.439
Average	3.024	4.5885	4.4595	5.71475	5.823	4.72195
Variance	0.462003	0.02598	0.160188	0.114305	0.043399	1.215177
V2						
Count	4	4	4	4	4	20
Sum	14.192	19.224	21.744	22.958	22.722	100.84
Average	3.548	4.806	5.436	5.7395	5.6805	5.042
Variance	0.29257	0.19679	0.57432	0.24498	0.04732	0.91666
V3						
Count	4	4	4	4	4	20
Sum	15.008	19.014	21.28	22.21	23.546	101.058
Average	3.752	4.7535	5.32	5.5525	5.8865	5.0529
Variance	0.125661	0.171596	0.251165	0.329132	0.148948	0.751092
Total						

Count	12	12	12	12	12	
Sum	41.296	56.592	60.862	68.027	69.56	
Average	3.441333	4.716	5.071833	5.668917	5.796667	
Variance	0.342633	0.116923	0.475787	0.195254	0.073459	
ANOVA						
Source of Variation	SS	Df	MS	F	P-value	F crit
Sample	1.413858	2	0.706929	3.325812	0.044967	3.204317
Columns	42.94499	4	10.73625	50.50966	4.45E-16	2.578739
Interaction	2.265626	8	0.283203	1.332356	0.252525	2.152133
Within	9.565124	45	0.212558			
Total	56.1896	59				

- Phân tích kết quả:

+ $F_{\text{sample}} (= 3.325812) > F_{\text{crit}} (= 3.204317)$ hay $P_{\text{sample}} (= 0.044967) < 0,05 \rightarrow$ Bác bỏ H_{0A} hay các mức phân đạm khác nhau ảnh hưởng tới năng suất lúa.

+ $F_{\text{columns}} (= 50.50966) > F_{\text{crit}} (= 2.578739)$ hay $P_{\text{sample}} (= 4.45E-16) < 0,05 \rightarrow$ Bác bỏ H_{0B} hay các giống khác nhau ảnh hưởng tới năng suất lúa.

+ $F_{\text{interaction}} < F_{\text{crit}} \rightarrow$ chấp nhận H_{AB} nghĩa là ảnh hưởng của đạm và giống lúa là không đồng thời lên năng suất, do đó để so sánh năng suất trung bình theo mức phân đạm hoặc theo giống cần sử dụng phương pháp LSD như trường hợp trên.

12.3.2.2. Nhân tố A và B không lặp

* **Phương pháp so sánh:** Thí nghiệm tương tự với trường hợp hai nhân tố A và B lặp lại n lần, ở đây mỗi cấp của A và B chỉ có một quan sát: $x_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$

- Đặt các giả thuyết: tương tự trường hợp a.

- Bảng quan sát:

B \ A	A	B ₁	B ₂	B _j	B _s	Tổng
A ₁		x ₁₁	x ₁₂	x _{1j}	x _{1s}	T _{1*}
A ₂		x ₂₁	x ₂₂	x _{2j}	x _{2s}	T _{2*}
A _i		x _{i1}	x _{i2}	x _{ij}	x _{is}	T _{i*}
A _r		x _{r1}	x _{r2}	x _{rj}	x _{rs}	T _{r*}
Tổng		T _{*1}	T _{*2}	T _{*j}	T _{*s}	T

- Bảng phân tích phương sai:

Nguồn gốc biến sai	Tổng bình phương (SS)	Bậc tự do (df)	Bình phương trung bình (MS)	Tỉ số F
Nhân tố A (theo hàng)	$SSA = \sum_{i=1}^r \frac{T_{i*}^2}{s} - \frac{T^2}{sr}$	r-1	$MSA = \frac{SSA}{r-1}$	$F_A = \frac{MSA}{MSE}$
Nhân tố B (theo cột)	$SSB = \sum_{j=1}^s \frac{T_{*j}^2}{r} - \frac{T^2}{sr}$	s-1	$MSB = \frac{SSB}{s-1}$	$F_B = \frac{MSB}{MSE}$
Sai số	$SSE = SST - SSA - SSB$	(r-1)(s-1)	$MSE = \frac{SSE}{(r-1)(s-1)}$	
Tổng chung	$SST = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s x_{ij}^2 - \frac{T^2}{rs}$	rs-1		

- Kết luận:

+ F_A dùng để kiểm tra giả thuyết H_{0A}. Nếu F_A ≥ F_{α,r-1,(r-1)(s-1)} thì bác bỏ H_{0A}.

+ F_B dùng để kiểm tra giả thuyết H_{0B}. Nếu F_B ≥ F_{α,s-1,(r-1)(s-1)} thì bác bỏ H_{0B}.

* Ví dụ và cách thực hiện trong Excel 2010:

- Ví dụ: Kết quả khảo sát về năng suất sản lượng của 4 giống lúa được thiết kế thí nghiệm cách tác trên 5 khu vực (5 lô đất khác nhau về nông hoá thổ nhưỡng) lặp lại theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ cho trong phần dữ liệu của bảng 12.5 từ kết quả này hãy:

1. Kiểm tra xem các giống lúa có khác nhau về năng suất hay không (nhân tố A) ?

2. Kiểm tra tính thuần nhất của khối (5 lô đất làm thí nghiệm có ảnh hưởng đến năng suất lúa hay không) ?

Bảng 12.5. Năng suất thí nghiệm của 4 loại lúa mạch

Giống \ Lô	Lô				
	1	2	3	4	5
1	32,3	34,0	34,3	35,0	36,5
2	33,3	30,0	36,3	36,8	34,5
3	30,8	34,3	35,3	32,3	35,8
4	29,3	26,0	29,8	28,8	28,8

- **Cách thực hiện:**

Nhân tố A: giống lúa (có 4 giống), nhân tố B: đất (có 5 lô), số công thức: $4 \times 5 = 20$. Giả thuyết được đặt ra trong trường hợp này là:

- Đặt các giả thuyết:

+ H_{0A} : Năng suất của các giống lúa khác nhau ngẫu nhiên.

+ H_{0B} : Năng suất của lúa ở các lô đất khác nhau ngẫu nhiên.

- Nhập dữ liệu vào bảng tính → Data analysis → Anova: Two-Factor Without Replication → khai báo.

Anova: Two-Factor Without Replication						
SUMMARY	Count	Sum	Average	Variance		
1	5	172.1	34.42	2.337		
2	5	170.9	34.18	7.427		
3	5	168.5	33.7	4.425		
4	5	142.7	28.54	2.188		
Lô 1	4	125.7	31.425	3.0625		
Lô 2	4	124.3	31.075	15.28917		
Lô 3	4	135.7	33.925	8.229167		
Lô 4	4	132.9	33.225	12.1225		
Lô 5	4	135.6	33.9	12.24667		

Anova: Two-Factor Without Replication						
SUMMARY	Count	Sum	Average	Variance		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Rows	117.27	3	39.09	13.18381	0.000417	3.490295
Columns	29.928	4	7.482	2.52344	0.096045	3.259167
Error	35.58	12	2.965			
Total	182.778	19				

- Phân tích kết quả:

+ Từ bảng này theo kết quả phân ANOVA thì H_{0A} bị bác bỏ vì $F_A = 13,1838 > F_{0,05} = 3,49$; hoặc so sánh giữa $P (= 0,000417) < 0,05$; các giống lúa này cho năng suất khác nhau. Giả thuyết H_{0B} được chấp nhận, vì $F_B (= 2,523) < F_{0,05} (= 3,259)$. Như vậy năng suất của 5 giống lúa chỉ phụ thuộc phẩm giống của chúng mà không phụ thuộc 5 lô đất canh tác trong thí nghiệm này, khi đó việc phân tích phương sai hai nhân tố trở thành bài toán phân tích phương sai một nhân tố.

+ Theo kết quả phân summary thì giống lúa G1 có năng suất cao nhất và khá ổn định (năng suất trung bình = 34,42 đơn vị trọng lượng, phương sai = 2,3370). Giống lúa G4 cho năng suất thấp nhất và năng suất này là ổn định vì phương sai của mẫu khá nhỏ (= 2,188). Hai giống còn lại không phải là giống đã ổn định vì phương sai khá lớn. Giống G1 được sử dụng cho sản xuất.

12.4. Phân tích tương quan, hồi qui

Một trong những nhiệm vụ của phân tích dữ liệu xem xét sự liên quan giữa hai biến (đặc trưng sinh học) (giả sử X và Y). Sự liên quan này có thể là một sự tương quan (correlation) để xem xét nếu hai đặc trưng khác nhau hoặc sự hồi qui (regression) để xem xét cách thức một đặc trưng này ảnh hưởng tới đặc trưng còn lại.

12.4.1. Phân tích sự tương quan

* Phương pháp phân tích:

- Quan hệ giữa biến số độc lập và số trung bình của những trị số của biến phụ thuộc gọi là quan hệ tương quan. Khác với quan hệ giữa hai biến trong hàm số, đó là từ một giá trị của biến độc lập có duy nhất một giá trị của biến phụ thuộc, còn đối với quan hệ tương quan thì mỗi giá trị của biến độc lập có thể có nhiều giá trị của biến phụ thuộc và ta có thể lấy trung bình của các trị số của biến phụ thuộc để làm đại diện tương ứng với biến độc lập.

- Kiểm định phổ biến nhất cho sự tương quan là hệ số tương quan Pearson (r) cho dữ liệu phân phối chuẩn và hệ số tương quan thứ hạng Spearman (r_s). Hệ số tương quan có thể dao động từ +1 (tương quan hoàn toàn chặt) và 0 (không có sự tương quan hay hai biến hoàn toàn độc lập) và -1 (tương quan nghịch hoàn toàn chặt).

- Giả sử hai biến ngẫu nhiên (hai đặc trưng sinh học) X và Y có n cặp giá trị quan sát (x_i, y_i). Hệ số tương quan mẫu được tính theo công thức sau:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n \cdot S_x \cdot S_y}$$

Trong đó: n là kích thước mẫu nghiên cứu, \bar{x} , \bar{y} là trung bình mẫu của hai biến ngẫu nhiên X và Y.

Giá trị r	Ý nghĩa
0	X và Y không tương quan
$\pm 0,01 \rightarrow \pm 0,1$	mối tương quan quá thấp, không đáng kể
$\pm 0,2 \rightarrow \pm 0,3$	mối tương quan thấp
$\pm 0,3 \rightarrow \pm 0,5$	mối tương quan trung bình
$\pm 0,6 \rightarrow \pm 0,7$	mối tương quan cao
$\pm 0,8$ trở lên	mối tương quan rất cao

*** Cách thực hiện trong Excel 2010**

- Nhập số liệu vào bảng tính (theo cột hoặc theo hàng)

- Data analysis → Correlation → Khai báo (Input range: miền dữ liệu vào gồm cả nhãn, Grouped by: theo hàng hoặc cột, Labels in the first line: khai báo nhãn, Output: vị trí hiển thị kết quả).

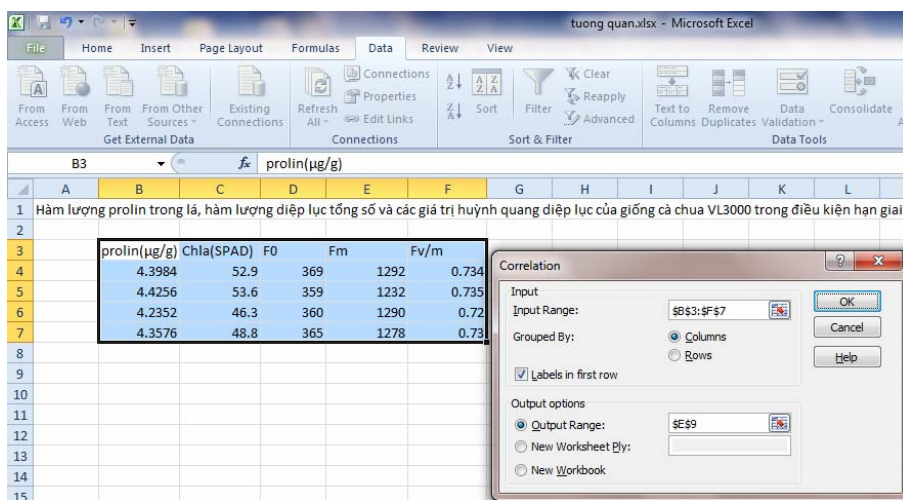
* **Ví dụ:** Tiến hành gây hạn nhân tạo ở giống cà chua VL3000 giai đoạn ra hoa, xác định các chỉ tiêu: hàm lượng prolin, điệp lục tổng số, F_0 , F_m và $F_{v/m}$ kết quả cho ở bảng 12.6.

Bảng 12.6. Một số chỉ tiêu sinh lý của giống cà chua VL3000 khi gây hạn nhân tạo

Prolin($\mu\text{g/g}$)	Chla(SPAD)	F_0	F_m	$F_{v/m}$
4.3984	52.9	369	1292	0.734
4.4256	53.6	359	1232	0.735
4.2352	46.3	360	1290	0.72
4.3576	48.8	365	1278	0.73

- Nhập số liệu vào bảng tính theo hàng hoặc cột

- Data analysis → Correlation → Khai báo



Hình 12.6. Phân tích tương quan

- Kết quả:

	<i>prolin</i> ($\mu\text{g/g}$)	<i>Chla</i> (SPAD)	<i>F0</i>	<i>Fm</i>	<i>Fv/m</i>
<i>prolin</i> ($\mu\text{g/g}$)	1				
<i>Chla</i> (SPAD)	0.94157615	1			
<i>F0</i>	0.29293088	0.234506	1		
<i>Fm</i>	-0.5788986	-0.55528	0.606793	1	
<i>Fv/m</i>	0.9973496	0.943073	0.35877	-0.51923	1

- Phân tích kết quả:

+ Đối chiếu với giá trị r trong bảng tương quan để kết luận tương quan từng cặp biến.

+ Dấu “-” thể hiện tương quan âm, dấu “+” thể hiện tương quan dương.

12.4.2. Phương trình hồi qui

* Phương pháp phân tích

- Phương trình toán học biểu diễn mối tương quan giữa hai đặc trưng sinh học X và Y gọi là phương trình hồi qui.

- Đơn giản nhất trong phân tích hồi qui là tuyến tính bậc nhất, nghĩa là sự phụ thuộc giữa biến X và Y được biểu diễn bằng đường thẳng bậc nhất có dạng $y = ax + b$, đây cũng là dạng hồi qui tuyến tính phổ biến trong các nghiên cứu về sinh lý thực vật chẳng hạn như hồi qui tuyến tính giữa diện tích lá và năng suất cây trồng, hàm lượng diệp lục và cường độ quang hợp, hay diện tích lá và hiệu suất quang hợp... hay thường xây dựng đường hồi qui tuyến tính giữa nồng độ một chất mang màu với mật độ quang OD mà chất đó hấp thụ. (thường gọi là xây dựng đường chuẩn).

* **Bài toán:** Phân tích hồi qui đơn tính giữa hai đặc trưng sinh học X và Y:

- Cho phương trình hồi qui tuyến tính:

$$y = a + bx, a = r \cdot \frac{S_x}{S_y} \cdot b = \bar{y} - a\bar{x}$$

- Kiểm định hai hệ số a, b:
- + Giả thuyết H_0 : hệ số hồi qui không có ý nghĩa ($=0$)
- + Kiểm tra: nếu $t < t_{\alpha, n-2} \rightarrow$ chấp nhận H_0 .
- Kiểm định phương trình hồi qui
- + Giả thuyết H_0 : Phương trình hồi qui tuyến tính không thích hợp
- + Kiểm tra: nếu $F < F_{\alpha, 1, n-2} \rightarrow$ chấp nhận H_0 .
- * **Cách thực hiện trong Excel 2010:**
- Nhập số liệu vào bảng tính
- Data analysis \rightarrow Regression \rightarrow Khai báo.
- + Input y range: miền dữ liệu biến y.
- + Input x range: miền dữ liệu các biến x.
- + Label: đánh dấu vào ô này nếu có nhãn ở hàng đầu.
- + Confidence level : 95% (độ tin cậy 95%).
- + Constant in zero: đánh dấu \checkmark nếu hệ số tự do $a = 0$.
- + Output range: miền xuất kết quả.
- + Residuals: đánh dấu \checkmark vào ô này để hiện phần dư hay sai lệch giữa y thực nghiệm và y theo hồi quy.
- + Standardized residuals: đánh dấu \checkmark để hiện phần dư đã chuẩn hoá.
- + Residuals plot: đánh dấu \checkmark để hiện đồ thị phần dư.
- + Line fit plots: đánh dấu \checkmark để hiện đồ thị các đường dự báo.
- + Normal probability plot: đánh dấu \checkmark để hiện đồ thị phần dư đã chuẩn hoá.
- * **Ví dụ:** Lập phương trình hồi qui và xác định mối liên hệ giữa đường kính tán cây (Y) với đường kính thân đến ngang ngực (X) của 10 cây thông đuôi ngựa 8 tuổi tại Vườn thực vật quốc gia theo số liệu bảng 12.7:

Bảng 12.7. Đường kính thân và đường kính tán của 10 cây thông đuôi ngựa tại Vườn quốc gia

STT	X (đường kính thân)	Y (đường kính tán)
1	2.5	7.6
2	2.8	8.8
3	3.0	8.9
4	3.4	9.3
5	3.7	9.7
6	4.0	10.6
7	4.5	11.0
8	4.9	11.8
9	5.2	11.9
10	5.7	12.3

- Nhập dữ liệu vào bảng tính
- Data analysis → Regression → Khai báo.
- Kết quả:

SUMMARY OUTPUT							
Regression Statistics							
Multiple R		0.98417828					
R Square		0.968606886					
Adjusted R Square		0.964682747					
Standard Error		0.294681655					
Observations		10					
ANOVA							
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>		
Regression	1	21.43430178	21.4343	246.833	2.68982E-07		
Residual	8	0.694698223	0.086837				
Total	9	22.129					
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i> <i>Upper 95.0%</i>
Intercept	4.523476856	0.372517943	12.14298	1.96E-06	3.664448938	5.3825048	3.66444894 5.382504774
X (đường kính thân)	1.427335805	0.090849929	15.71092	2.69E-07	1.217835494	1.6368361	1.21783549 1.636836115

- Phân tích kết quả:
- + Regression Statistic:
 - o Multiple R: hệ số tương quan
 - o R Square: hệ số tương quan bình phương

- Adjusted R square: R bình phương hiệu chỉnh
- Standar Error: sai số của hệ số tương quan (S)
- Observations: kích thước mẫu quan sát (n)

+ Anova: Phân tích phương sai hồi qui

- df (degree of freedom): là bậc tự do tương ứng với từng chỉ tiêu Anova.
- Sum Square of Regression (SS): tổng bình phương các hiệu biến sai giữa các trị số lý thuyết của phương trình hồi qui với trị số trung bình chung của biến phụ thuộc Y.
- Mean Square of Regression (MS): trung bình của tổng bình phương các hiệu biến a_i giữa các trị số lý thuyết của phương trình hồi qui với trị số trung bình chung của biến phụ thuộc Y.
- Sum Square of Residual (SS): tổng bình phương các hiệu biến sai giữa các trị số quan sát của biến Y so với trị số lý thuyết của phương trình hồi qui.
- Mean Square of Residual (MS): trung bình của tổng bình phương các hiệu sai giữa các trị số quan sát của biến Y so với trị số lý thuyết của phương trình hồi qui y
- F là tỉ số của Mean Square of Regression với Mean Square of Residual
- Significance F: mức ý nghĩa của F
- Coefficients of Intercept: là hệ số tự do a của phương trình $y = a + bx$
- Coefficients of X Variable 1: là hệ số b của phương trình $y = a + bx$
- Standard Error of Intercept: sai số chuẩn của hệ số tự do a (Sa)

- Standard Error of X Variable 1: sai số chuẩn của hệ số hồi qui b (S_b)
 - t- Stat of Intercept: tiêu chuẩn kiểm tra sự tồn tại của tham số a (t_a)
 - t- Stat of X Variable 1: tiêu chuẩn kiểm tra sự tồn tại của hệ số quy hồi b (t_b).
 - p- Value: mức ý nghĩa của các tiêu chuẩn kiểm tra sự tồn tại của các tham số.
 - Lower 95% và Upper 95%: là các cận dưới và cận trên của khoảng ước lượng đối với các tham số a và b ứng với độ tin cậy 95% hay mức ý nghĩa 5%.
- Vậy, phương trình hồi qui: $y = 1,42x + 4,52$ ($R^2 = 0,968$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

* Tiếng Việt

1. Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền, Phùng Gia Tường (1997). *Thực hành hóa sinh học*, Nxb Giáo dục.
2. Chu Văn Mẫn, Đào Hữu Hồ (2001). *Thống kê sinh học*, Nxb Khoa học Kỹ thuật.
3. Chu Văn Mẫn (2009). *Tin học trong công nghệ sinh học*, Nxb Giáo dục.
4. Nguyễn Duy Minh, Nguyễn Như Khanh (1982). *Thực hành sinh lý thực vật*, Nxb Giáo dục.
5. Nguyễn Văn Mùi (2002). *Xác định hoạt độ enzym*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật.
6. Nguyễn Thị Lan (Chủ biên), Phạm Tiến Dũng. *Phương pháp thí nghiệm* (2005), Trường ĐHNN I Hà Nội.
7. Nguyễn Hải Thanh, Đỗ Đức Lực (2008). *Xử lý dữ liệu thống kê nông nghiệp với phần mềm Excel và SAS (Bài giảng cho dự án CNTT)*, trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội.
8. Nguyễn Quang Vinh, Bùi Phương Thuận, Phan Tuấn Nghĩa (2007). *Thực tập hóa sinh học*, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội.
9. Vũ Văn Vụ, Vũ Thanh Tâm, Trần Dụ Chi, Hoàng Quý Lý, Lê Hồng Điệp (2004). *Thực hành sinh lý thực vật*, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội.
10. Vũ Văn Vụ (1999). *Sinh lý thực vật ứng dụng*, NXB Giáo dục.

* Tiếng Anh

1. Gaya U.I., Alimi S (2006). *Spectrophotometric determination of nitrate in vegetables using phenol*. J. Appl. Sci. Environ. vol.10(1)79-82. full-text available online at www.bioline.org.br/ja.
2. Grieve CM, Grattan SR (1983). *Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds*. Plant and Soil 70, 303-307.
3. Neil Millar (2001). *Biology statistics made simple using Excel*. School Science Review. 83 (303).
4. Reigosa Roger M.J (2001). *Handbook of plant ecophysiology techniques*. ©2003Kluwer Academic Publishers.
5. Reed R.H, Holmes D, Weyers J, Jones A (2007). *Practical Skills in Biomolecular Sciences*. Pearson Education Canada. 552pp.
6. Lichtenthaler, HK and AR Wellburn (1983), *Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*. Biochemical Society Transactions 11: 591 - 592.
7. Richardson A.D, Duigan S.P, Berlyn G.P. (2001). "An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content". © New Phytologist. 153: 185 – 194 www.newphytologist.com

* Tiếng Nga

1. Веретеников А. В. (2006). *Физиология растений*. Москва. Акад. Проект. 480 с.
2. Волкова А. М., Кожушко Н. Н., Макаров Б.И. (1984). *Определение относительной жаростойкости и засухоустойчивости образцов Зернобобовых культур способом проращивания семян в растворах сахарозы и после прогревания*. Лен. 17 с.
3. Гунар И. И. (1972) *Практикум по физиологии растений*. Москва. Колос. 123 с.

4. Иванов В. Б. (2001). *Практикум по физиологии растений*. Академия. Москва. 139 с.
5. Кожушко Н.Н. (1984). *Определение засухоустойчивости зерновых культур по изменению параметров водного режима*. Ленинград. 123 с.
6. Миллер М.С. (1973). *Летние практические занятия по физиологии растений. Полевая практика*. Москва. Просвещение. 207 с.
7. Тетюрев В. А. (1980). *Методика эксперимента по физиологии растений*. Москва. Просвещение. 183 с.
8. Удовенко Г. В. (1976). *Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды*. Ленинград. Колос. 123 с.
9. Якушкина Н. И. (1993). *Физиология растений*. Москва.

*** Tài liệu Internet**

1. <http://www.eplantscience.com>, tham khảo ngày 13/3/2013.
2. <http://www.sigmaaldrich.com>, tham khảo ngày 13/3/2013.
3. <http://statistics.vn/>
4. <http://www.nature.com/nature/journal/v200/n4908/abs/200814a0.html>
5. <http://www.rauhoaquavietnam.vn>

CHUẨN BỊ MỘT SỐ DUNG DỊCH ĐỆM**- Đệm kali photphat 1M**

pH cân pha	1M K_2HPO_4	1M KH_2PO_4
5,8	8,5ml	91,5ml
6,0	13,2ml	86,8ml
6,2	19,2ml	80,8ml
6,4	27,8ml	72,2ml
6,6	38,1ml	61,9ml
6,8	49,7ml	50,3ml
7,0	61,5ml	38,5ml
7,2	71,7ml	28,3ml
7,4	80,2ml	19,8ml
7,6	86,6ml	13,4ml
7,8	90,8ml	9,2ml
8,0	94,0ml	6,0ml

- Đệm natri photphat 1M

pH	1M Na_2HPO_4	1M NaH_2PO_4
5,8	7,9ml	92,1ml
6,0	12,0ml	88,0ml
6,2	17,8ml	82,2ml
6,4	25,5ml	74,5ml
6,6	35,2ml	64,8ml
6,8	46,3ml	53,7ml

7,0	57,7ml	42,3ml
7,2	68,4ml	31,6ml
7,4	77,4ml	22,6ml
7,6	84,5ml	15,5ml
7,8	89,6ml	10,4ml
8,0	93,2ml	6,8ml

(theo Ruzin, 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*)

- **Đệm Glycin - HCl**, pH 2,2-3,6: cho 25ml 0,2 M glycin và xml HCl vào 100ml nước để ion (theo Dawson, và cộng sự., 1969).

pH	2,2	2,4	2,6	2,8	3,0	3,2	3,4	3,6
x (ml)	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0

- **Đệm natri axetat**: kết hợp các tỷ lệ sau đây của axit axetic 0,1N và natri axetat 0,1N (theo Pearse, 1980).

Axit axetic	Natri axetat	pH
185	15	3,6
176	24	3,8
164	36	4,0
147	53	4,2
126	74	4,4
102	98	4,6
80	120	4,8
59	141	5,0
42	158	5,2
29	171	5,4
19	181	5,6

- Đệm PBS (Phosphate buffered saline) - PBS 1X

(Theo http://wiki.answers.com/Q/PBS_buffer_composition)

Thành phần	Khối lượng
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

- Thêm đến mức 800ml bằng nước cất.
- Điều chỉnh pH tới 7,4 bằng HCl.
- Bổ sung nước tới 1000ml
- Khử trùng.

- Đệm citrat (theo Gomori, 1955)

Dung dịch gốc: **A**: axit citric 0,1 M; **B**: natri citrat 0,1 M.
Dùng xml A + yml B và pha loãng tới 100ml bằng 50ml nước cất.

Axit citric 0,1M	Natri citrat 0,1M	pH
46,5	3,5	3,0
43,7	6,3	3,2
40,0	10,0	3,4
37,0	13,0	3,6
35,0	15,0	3,8
33,0	17,0	4,0
31,5	18,5	4,2
28,0	22,0	4,4
25,5	24,5	4,6
23,0	27,0	4,8
20,5	29,5	5,0
18,0	32,0	5,2
16,0	34,0	5,4

13,7	36,3	5,6
11,8	38,2	5,8
9,5	41,5	6,0
7,2	42,8	6,2

- Đệm photphat - citrat (*theo Pearse, 1980*)

Bổ sung các thành phần sau theo thể tích (ml) để được 100ml đệm

Na₂HPO₄ 0,2 M(ml)	Citrat 0,1M (ml)	pH
5,4	44,6	2,6
7,8	42,2	2,8
10,2	39,8	3,0
12,3	37,7	3,2
14,1	35,9	3,4
16,1	33,9	3,6
17,7	32,3	3,8
19,3	30,7	4,0
20,6	29,4	4,2
22,2	27,8	4,4
23,3	26,7	4,6
24,8	25,2	4,8
25,7	24,3	5,0
26,7	23,3	5,2
27,8	22,2	5,4
29,0	21,0	5,6
30,3	19,7	5,8
32,1	17,9	6,0
33,1	16,9	6,2
34,6	15,4	6,4
36,4	13,6	6,6
40,9	9,1	6,8
43,6	6,5	7,0