

PHÂN TÍCH MỘT SỐ ẢNH HƯỞNG CỦA ARSENATE LÊN RỄ CÂY LÚA *ORYZA SATIVA L.* Ở MỨC ĐỘ SINH HÓA VÀ PHIÊN MÃ

Nguyễn Thị Thúy Quỳnh^{1*}, Hoang Tsai-Lien²

¹Khoa Sư phạm, Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà nội

²Khoa Khoa học sự sống, Trường Đại học Quốc gia Cheng Kung, Taiwan, ROC

TÓM TẮT

Sự ô nhiễm Arsenate (AsV) trong nguồn nước ngầm ảnh hưởng nguy hại đến sức khỏe con người. Bên cạnh đó, AsV gây ức chế chức năng nội bào, phá hủy các quá trình trao đổi chất và làm giảm sự phát triển của thực vật được trồng trên các vùng nhiễm AsV. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích những biến đổi sớm của hệ rễ cây lúa trong 24h đáp ứng với AsV ở nồng độ thấp (10 μ M). Kết quả chỉ ra rằng hoạt tính của một số enzyme chống oxy hóa như catalase, peroxidase và hàm lượng glutathione thay đổi sau 12h và 24h xử lý với AsV. Bằng kỹ thuật microarray, một số lượng lớn các gen thay đổi mức độ biểu hiện đã được phát hiện. Phần lớn các gen có mức độ biểu hiện tăng thuộc các nhóm gen giữ vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất và chức năng phân tử của tế bào thực vật. Các gen có mức độ biểu hiện giảm liên quan đến quá trình chuyển hóa lipid và các hợp chất thực vật thứ sinh. Nhiều gen tham gia vào quá trình khử độc ở thực vật cũng có mức độ biểu hiện tăng như cytochrome P450 (CYP), glutathione-S-transferase (GST) và UDP-glycotranferase (UGT). Một số gen thuộc nhóm gen này đã được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR cho kết quả hoàn toàn tương thích với kết quả phân tích dữ liệu microarray. Kết quả của báo cáo này cung cấp cơ sở phân tử cho những nghiên cứu sâu hơn về chức năng các gen liên quan đến chống chịu AsV ở cây lúa nói riêng và thực vật nói chung.

TỪ KHÓA: Arsenate, glutathione, microarray, *Oryza sativa L.*

MỞ ĐẦU

Arsenate (AsV), một dạng vô cơ của asen (thạch tín), là chất gây ô nhiễm môi trường gây độc cho sức khỏe con người. Nồng độ AsV trong nước ngầm ở nhiều quốc gia trên thế giới đã vượt quá giới hạn cho phép theo tổ chức Y tế thế giới [2]. Nhiều tài liệu cho thấy sự ô nhiễm AsV trong nguồn nước tiềm ẩn nguy hại ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người do việc tiêu thụ các sản phẩm nông nghiệp canh tác trên các vùng nhiễm AsV. AsV là chất cực độc gây ức chế chức năng nội bào, cũng như phá hủy các quá trình trao đổi chất đối với tế bào thực vật [13]. Bên cạnh đó, dưới ảnh hưởng của AsV, thực vật cũng bị biến đổi một số các quá trình hóa sinh và sinh lý như tạo thành các gốc oxy hóa, ức chế sự phát triển của cây và dẫn đến làm giảm sản lượng của cây trồng. Để đáp ứng với quá trình khử các gốc oxy hóa và khử độc kim loại, thực vật thường sản sinh ra các enzyme thuộc nhóm chống oxy hóa như catalase và peroxidase, và glutathione [9, 11]. Một số nghiên cứu trước đây đã đề cập đến cơ chế

phân tử và hóa sinh của cây lúa chịu ảnh hưởng của AsV ở nồng độ cao (25 μM). Tuy nhiên những nghiên cứu này chưa phân tích những thay đổi ở mức độ phân tử mang tính tổng thể. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là phân tích những biến đổi sớm của hệ rễ cây lúa trong môi trường có AsV ở nồng độ thấp (10 μM). Bên cạnh những dẫn chứng về sự thay đổi ở mức độ hóa sinh, những bằng chứng về thay đổi ở mức độ phân tử thông qua việc sử dụng chíp sinh học (RNA microarray) cũng được cung cấp và là cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn nhằm tìm kiếm những gen liên quan đến quá trình chống chịu AsV ở cây lúa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Giống lúa TN-67 (*Oryza sativa* L.) được cung cấp bởi Khoa Khoa học sự sống, Trường đại học Quốc gia Cheng Kung, Đài loan, ROC.

Phương pháp nghiên cứu

Hạt lúa được khử trùng theo Huang và cộng sự [6]. Hạt lúa nảy mầm sau 6 ngày khi chiều dài rễ lúa đạt khoảng 3 cm thì được xử lý với natri arsenate ($\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) với các nồng độ khác nhau (5, 10, 15, 25, 50 và 100 μM), và mẫu đối chứng được xử lý với nước cất trong 24 giờ.

Protein tổng số từ rễ cây lúa sau 0, 12 và 24 giờ xử lý với 10 μM AsV được tách chiết bằng đệm PBS pH 5.8, và được điện di trên gel polyacrylamide (4,5% gel cô và 10% gel tách) với đệm chạy TBE pH 8,5 trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi điện di, bản gel được thực hiện phản ứng kết tủa màu với cơ chất khác nhau để phát hiện các băng isozyme. Đối với catalase (CAT), bản gel được ngâm trong H_2O_2 0,1% và 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid (DAB) ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó bản gel được ủ với FeCl_3 30% và $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 30% cho đến khi nhìn thấy băng. Đối với peroxidase (POD), bản gel được ngâm trong dung dịch natri citrate chứa 0,1% H_2O_2 và 0,1% DAB trong điều kiện tối và ở nhiệt độ phòng cho đến khi băng xuất hiện.

Rễ lúa sau 12 và 24 giờ xử lý với AsV được ủ với 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (1mg/ml) trong 45 phút ở nhiệt độ phòng. Sản phẩm H_2O_2 tạo thành trên mẫu nghiên cứu được nhận biết qua màu nâu đậm.

Hàm lượng glutathione (GSH) được tiến hành phân tích theo Anderson và cộng sự [1]. Rễ cây lúa xử lý với AsV sau 12 và 24 giờ được tách chiết bằng dung dịch axit sulpho-salicylic 5%, và ly tâm trong 10 phút ở 13,000 v/p. Dịch nổi được thu lại và ủ trong dung dịch gồm có 700 μl NADPH 0,3 mM, 100 μl DTNB và 50 μl glutathione reductase (10 units ml^{-1}). Sản phẩm của phản ứng khử GSH được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng 412 nm.

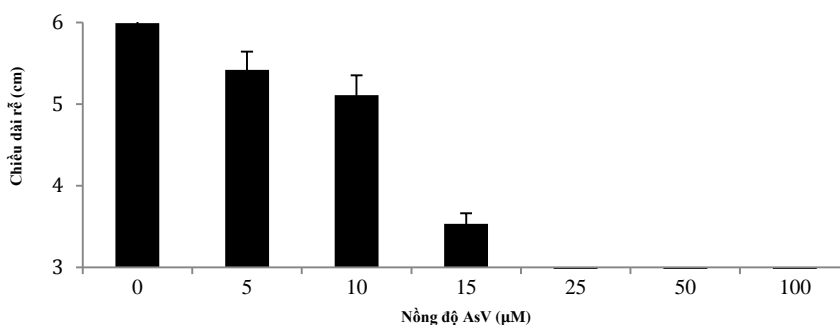
ARN tổng số được tách chiết từ rễ mẫu cây đối chứng và mẫu xử lý với 10 μM AsV trong 24 giờ bằng kit RNAeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Đức). Kỹ thuật microarray được thực hiện tại phòng thí nghiệm ADN microarray - Viện Sinh học,

Taiwan. Dữ liệu microarray được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng như GenSpringGX11 và Rank Products. Phân tích các nhóm gen chức năng bằng các phần mềm chuyên biệt EasyGO [15].

Tiến hành kỹ thuật PCR với một số gen lựa chọn từ kết quả microarray. 0,5 μ g ARN tổng số được sử dụng để tổng hợp cDNA bằng ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, USA) với mỗi oligo (dT)₁₅. Khuếch đại một số gen lựa chọn bằng phản ứng PCR bằng máy luân nhiệt (BioRad) với chu kỳ nhân gen được thiết kế như sau: 94⁰C trong 2 phút; 30-35 chu kỳ: 94⁰C trong 15 giây, 55⁰C trong 30 giây, 72⁰C trong 60 giây; 72⁰C trong 10 phút. Gen tubulin được sử dụng như một đối chứng nội nhằm chứng tỏ mức độ biểu hiện ở các mẫu là như nhau.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá độc tính của AsV thông qua sự ức chế phát triển của rễ cây lúa với nồng độ khác nhau từ 0 đến 100 μ M. Kết quả hình 1 cho thấy rễ cây lúa bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 25 μ M, và chiều dài rễ cây lúa giảm gần một nửa so với mẫu đối chứng ở 10 μ M. Do đó chúng tôi sử dụng nồng độ 10 μ M này cho những nghiên cứu sâu hơn.



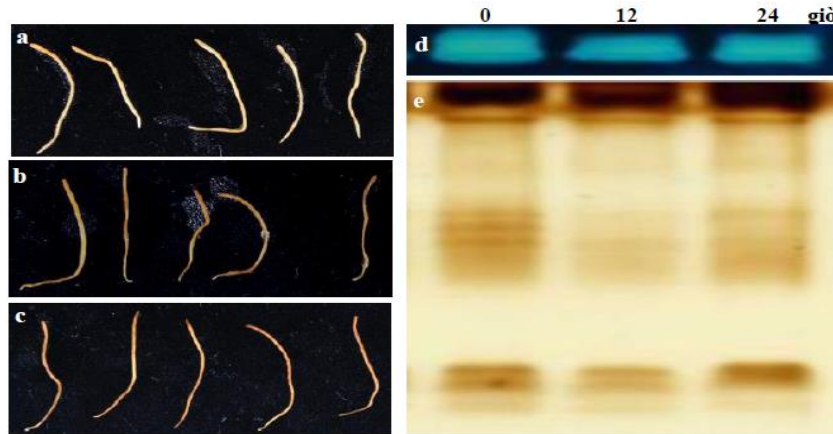
Hình 1. Chiều dài của rễ cây lúa dưới ảnh hưởng của arsenate (AsV)

Trong nghiên cứu này, để đánh giá sự hình thành gốc oxy hóa ở rễ cây lúa dưới tác động của AsV, chúng tôi đã tiến hành nhuộm với 3-3'-diaminobenzidine (DAB). Kết quả cho thấy sau 12 giờ và 24 giờ, rễ lúa bị xử lý với AsV (hình 2 b,c) chuyển thành màu nâu đậm so với mẫu đối chứng (hình 2a). Điều này là do kết quả phản ứng hóa học giữa thuốc nhuộm DAB và H₂O₂.

Ở thực vật, hệ thống bảo vệ chống oxy hóa được thực hiện bởi nhiều enzyme oxy hóa khử như catalase (CAT) và peroxidase (POD). Hai enzyme này giữ vai trò quan trọng trong việc phân hủy H₂O₂ ở nhiều loài thực vật dưới tác dụng của kim loại nặng hoặc các yếu tố gây stress [5, 7].

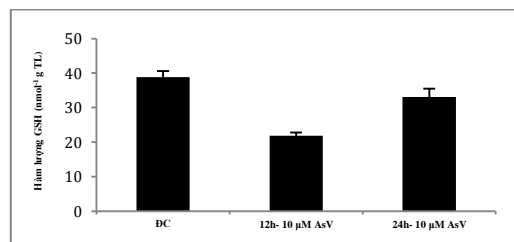
Kết quả phân tích điện di trên gel polyacrylamide cho thấy hoạt tính của CAT và POD của lúa bị giảm sau 12 và 24 giờ đáp ứng với AsV (Hình 2 d,e). Sự giảm hoạt tính

các enzyme này là do sự phá hủy của peroxisomal protease trong thực vật khi bị tác động bởi các kim loại nặng (Sandaglio et al.) [14]. Hơn nữa, hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa này tăng cao khi thực vật chịu tác động bởi kim loại nặng trong thời gian kéo dài [11].



Hình 2. Ảnh hưởng của AsV sau 12 và 24 giờ lên sự hình thành H_2O_2 (a-c) và hoạt tính catalase (d) và peroxidase (e) ở rễ lúa

Bên cạnh đó, hợp chất glutathione (GSH) có vai trò quan trọng trong phản ứng oxy hóa khử trong thực vật như khử độc các kim loại nặng [9]. Hình 3 cho thấy hàm lượng GSH sau 12 và 24 giờ xử lý với AsV giảm so với mẫu đối chứng. Trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi, sự giảm hàm lượng GSH cũng quan sát thấy ở rễ lúa khi tác dụng với $5 \mu M$ AsIII sau 12 và 24 giờ [12]. Li và cộng sự (2005) cũng chỉ ra rằng, hàm lượng GSH của *Arabidopsis* cũng giảm sau 48 giờ xử lý với $75 \mu M$ AsV [8]. Điều này đã được Hartley-Whitker và cộng sự (2001) lý giải, đó là ngay khi As hấp thu vào thực vật hàm lượng GSH có thể giảm nhanh do sự tạo thành phytochelatins (PCs) dẫn đến sự thay đổi nồng độ các gốc oxy hóa và các enzyme chống oxy hóa trong tế bào thực vật [5].



Hình 3. Ảnh hưởng của AsV lên hàm lượng glutathione ở rễ lúa

Trong thập kỷ gần đây, việc sử dụng các chip sinh học (microarray) có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong việc xác định mức độ biểu hiện phiên mã của hàng nghìn gen. Vì vậy, để hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử của cây lúa dưới ảnh hưởng của AsV, chúng tôi

đã tiến hành phân tích hệ phiên mã của chúng với mong muốn tìm kiếm những gen liên quan đến quá trình chống chịu AsV. Kết quả phân tích cho thấy sau 24 giờ đáp ứng với AsV, số lượng các gen có mức độ biểu hiện tăng là 427 và giảm là 187. Chúng tôi đã tiến hành phân loại các nhóm gen giả định bằng phần mềm chuyên biệt EasyGO. Kết quả cho thấy phần lớn các gen có biểu hiện tăng có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất và chức năng phân tử của tế bào (bảng 1). Các gen này mã hóa cho các protein tham gia vào quá trình tổng hợp axit jasmonic, đáp ứng với stress, và quá trình trao đổi chất ở tế bào. Kết quả phân tích cũng cho thấy nhiều gen tham gia vào quá trình khử độc ở thực vật như cytochrome P450 (CYP), glutathione-S- transferase (GST) và UDP-glycotranferase (UGT) cũng tăng cường biểu hiện (bảng 1). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi và một số nghiên cứu khác [2, 4, 12]. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng nhận thấy có một số lượng các gen có mức độ biểu hiện giảm liên quan đến quá trình chuyển hóa lipid và các hợp chất thực vật thứ sinh.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng quá trình khử độc trong tế bào ở nhiều loài sinh vật có sự tham gia của các nhóm gen như Cytochrome P450 monooxygenases (CYP) và UDP-glucosyltransferases (UGT) [9]. Mức độ biểu hiện khác nhau các gen CYP cũng được phát hiện trong rễ cây lúa bị xử lý với 25 μ M AsV [2]. Đặc biệt, các gen mã hóa Glutathione S- transferase (GST) giữ vai trò quan trọng trong việc khử độc các chất ngoại lai, có vai trò như một enzyme có khả năng xúc tác cho phản ứng kết hợp các độc tố với GSH và chuyển những hợp chất này tới không bào thực vật [11]. Kết quả bảng 2 cho thấy hầu hết mức độ biểu hiện của các gen mã hóa GST đều tăng gấp 8 lần so với mẫu đối chứng. Kết hợp với kết quả của những nghiên cứu đã công bố, chúng tôi có thể khẳng định vai trò khử độc sớm của CYPs, UGT, và GST trong rễ cây lúa khi bị xử lý với AsV.

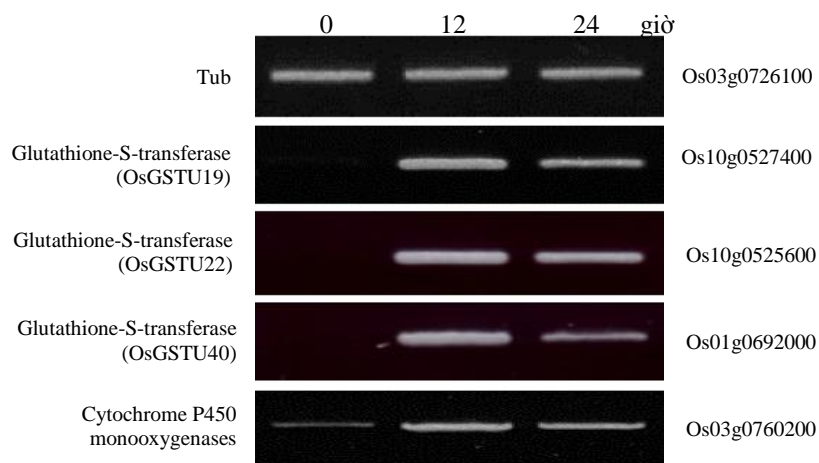
Bảng 1. Kết quả phân tích số lượng các gen ở rễ lúa đáp ứng với AsV

Thuật ngữ gen giả định (GO)	Chức năng gen giả định	Số lượng gen
Tăng mức độ biểu hiện		
GO:0009861	Tổng hợp axit jasmonic	7
GO:0006950	Đáp ứng với stress	52
GO:0044248	Quá trình trao đổi chất ở tế bào	33
GO:0019825	Cytochrome P450 monooxygenases	11
GO:0004364	Hoạt tính Glutathione S- transferase	28
GO:0008194	Hoạt tính UDP-glycosyltransferase (UGT)	14
GO:0003824	Hoạt tính catalytic	225
Giảm mức độ biểu hiện		
GO:0012505	Gen thuộc hệ thống nội màng	53
GO:0008146	Hoạt tính sulfotransferase	8
GO:0006629	Quá trình chuyển hóa lipid	20
GO:0019748	Quá trình chuyển hóa các chất thực vật thứ cấp	11

Bảng 2. Mức độ biểu hiện điều hòa tăng của các gen mã hóa cho GST

Tên gen	Locus gen	Mức độ biểu hiện
OsGSTU5	Os09g0367700	18.36
OsGSTU7	Os01g0949700	13.22
OsGSTU8	Os10g0529700	23.85
OsGSTU19	Os10g0527400	44.80
OsGSTU21	Os10g0525500	11.78
OsGSTU22	Os10g0525600	27.56
OsGSTU24	Os10g0528100	23.20
OsGSTU36	Os01g0949800	10.43
OsGSTU37	Os01g0949900	19.79
OsGSTU39	Os01g0692100	51.15
OsGSTU40	Os01g0692000	9.72
OsGSTU47	Os10g0481300	33.90
OsGSTU48	Os10g0530600	8.29

Để khẳng định kết quả thay đổi mức độ biểu hiện của các gen từ kết quả microarray, chúng tôi tiến hành lựa chọn một số gen có mức độ biểu hiện tăng là Cytochrome P450 monooxygenase (Os03g0760200) và 3 gen mã hóa Glutathione-S-transferase (OsGSTU19 OsGSTU22 và OsGSTU40). Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy mức độ biểu hiện của các gen này hoàn toàn phù hợp với kết quả thu được từ dữ liệu microarray (hình 4).



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phân tích mức độ biểu hiện một số gen ở rễ lúa sau 24 giờ đáp ứng với AsV

KẾT LUẬN

Một số đặc điểm hóa sinh của rễ cây lúa *Oryza Sativa* L. như hoạt tính các chất chống oxy hóa như catalase, peroxidase và glutathione đã bị thay đổi khi bị xử lý với AsV trong 12 và 24 giờ.

Bằng kỹ thuật microarray, đã phát hiện được một số lượng lớn các gen thay đổi mức độ biểu hiện ở rễ lúa dưới ảnh hưởng của AsV trong 24 giờ. Phần lớn các gen mã hóa cho protein tham gia vào các quá trình trao đổi chất và quá trình khử độc AsV như các gen mã hóa cho Cytochrome P450 monooxygenase, UDP-glucosyltransferase và Glutathione-S-transferase. Các gen này có mức độ biểu hiện tăng và đã được kiểm chứng lại bằng kỹ thuật điện di PCR.

Kết quả của báo cáo này là cơ sở phân tử cho những nghiên cứu sâu hơn về chức năng của các gen liên quan đến tính chống chịu arsenate ở cây lúa nói riêng và thực vật nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson M.D, Prasad T.K, Stewart C.R. 1995. *Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings*. Plant Physiology. Vol 109 (4): 1247-1257
2. Chakrabarty D, Trivedi P.K, Mirsa P, Tiwari M. et al. 2009. *Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings*. Chemosphere. Vol 74 (5): 688-702
3. Chakraborti D. 2003. *Arsenic Groundwater Contamination in Middle Ganga Plain, Bihar, India: A Future Danger? Environmental Health Perspectives*. Vol 111(9): 1194-1201
4. Gupta M, Sharma P, Sarin NB, Sinha AK. 2009. *Differential response of arsenic stress in two varieties of Brassica juncea L*. Chemosphere 74 (9): 1201-1208
5. Hartley-Whitker J, Ainsworth G, Meharg AA. 2001. *Copper- and arsenate-induced oxidative stress in Holcus lanatus L. clones with differential sensitivity*. Plant, Cell and Environment. Vol 24 (7): 713-722
6. Huang TL, Nguyen QTT, Fu SF, Lin CY, Chen YC, Huang HJ. 2012. *Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots*. Plant Molecular Biology. Vol. 80 (6): 587-608
7. Li C, Feng S, Shoa Y, Jiang L, Lu X, Hou X. 2007. *Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings*. Journal of Environmental Sciences. Vol 19 (6): 725-732
8. Li Y, Dhankher OP, Carreira L, Balish RS, Meagher RB. 2005. *Arsenic and mercury tolerance and cadmium sensitivity in Arabidopsis plants expressing bacterial γ -glutamylcysteine synthetase*. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol 24 (6): 1376-1386.
9. Marrs KA. 1996. *The function and regulation of Glutathione S-transferase in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. Vol 47: 127-58
10. Meharg A.A., Harley-Whitaker J. 2002. *Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species*. New Phytologist. Vol 154 (1): 29-43

11. Mishara S, Jha AB, Dubey RS. 2011. *Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings*. *Protoplasma*. Vol. 248 (3): 565–577
12. Nguyen T.T.Q., Huang T.L., Huang H.J. 2013. *Analysis of early responses to arsenite stress in rice roots at biochemical and transcriptional level*. National biotechnology conference. No 2: 1022-1026
13. Panda SK, Upadhyay RK, Nath S. 2010. *Arsenic stress in plants*. *Journal of Agronomy and Crop Science*. Vol 196 (3): 161-174
14. Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, Río LA. 2001. *Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants*. *Journal of Experimental Botany*, Vol 52 (364): 2115-2126.
15. Zhou X, Su Z. 2007. *EasyGO: Gene Ontology-based annotation and functional enrichment analysis tool for agronomical species*. *BMC Genomics* 8:246

SUMMARY

ANALYSIS OF SOME INFLUENCES OF ARSENATE TO *ORYZA SATIVA* L. RICE ROOTS AT BIOCHEMICAL AND TRANSCRIPTIONAL LEVEL

Nguyen Thi Thuy Quynh, Hoang Tsai-Lien

¹ *Faculty of teacher education, University of Education, VNU*

² *Department Life Sciences, National Chengkung University, Taiwan, ROC*

Arsenate (AsV) contamination in groundwater resources impacts risky to human health. Besides, it inhibits intracellular functions, destroy the metabolic process and reduces the growth of plants in AsV-contaminated areas. In this study, we analyzed the early changes of the rice roots under AsV environment with low concentration (10 μ M). The results indicated that the activity of some antioxidant enzymes such as catalase and peroxidase, and content of glutathione are reduce after 12h and 24h treatment with AsV. A large number of genes with changed expression levels were detected using microarray technique. Most of the increased genes belong to gene groups that play important role in metabolic process and molecular function of plant cells. The genes related to the lipid metabolic process and secondary metabolism were down-regulated. Many genes involved in the detoxification process in plants has also increased expression level, such as cytochrome P450 (CYP), glutathione S-transferase-(GST) and UDP-glycotranferase (UGT). Several genes which belong to this group were identified by PCR technique with the results compatible to the analyzed microarray data. The results of this report provide the molecular basis for further research on the function of the AsV tolerant-related genes in rice seedlings in particular and in plant general.

Địa chỉ liên hệ:

- **Địa chỉ:** Khoa Sư phạm, Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà nội
- **Điện thoại:** CQ: 043.5539607 ĐD: 0904656493
- **Email:** baokhanh0808@yahoo.com.vn
Quynhntt-bio@vnu.edu.vn