

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

HỒ BÍCH LIÊN

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG HẤP THỤ, TÍCH LŨY
CHÌ (Pb) VÀ SỰ BIỂU HIỆN GEN LIÊN QUAN ĐẾN
TÍNH CHỊU CHÌ (Pb) CỦA CÂY PHÁT TÀI
(*Dracaena sanderiana*)**

**Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học
Mã số: 9.42.02.01**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH-Năm 2022

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

HỒ BÍCH LIÊN

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG HẤP THỤ, TÍCH LŨY
CHÌ (Pb) VÀ SỰ BIỂU HIỆN GEN LIÊN QUAN ĐẾN
TÍNH CHỊU CHÌ (Pb) CỦA CÂY PHÁT TÀI
(*Dracaena sanderiana*)**

**Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 9.42.02.01**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Bùi Cách Tuyến
TS. Huỳnh Văn Biết**

TP. HỒ CHÍ MINH-Năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tác giả cam đoan đây là công trình nghiên cứu của chính tác giả. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận án này là trung thực và không sao chép từ bất kỳ một người nào và dưới bất kỳ hình thức nào. Việc tham khảo các nguồn tài liệu đã được thực hiện trích dẫn và ghi nguồn tài liệu tham khảo đúng quy định.

Tác giả luận án

Hồ Bích Liên

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian học tập, thực hiện và hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ tận tình của tập thể Quý Thầy Cô, các cơ quan, các anh chị và các bạn. Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn chân thành đến:

GS. TS. Bùi Cách Tuyến và TS. Huỳnh Văn Biết đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, truyền đạt nhiều kinh nghiệm và kiến thức quý báu giúp tôi hoàn thành tốt luận án.

TS. Bùi Minh Trí đã tận tình giúp đỡ, hỗ trợ thiết bị đo đạc lục tổ và chia sẻ nhiều tài liệu chuyên môn quý báu.

Ban Giám Hiệu Trường Đại học Thủ Dầu Một, Lãnh đạo Khoa Tài nguyên Môi trường, Khoa Khoa học quản lý, Viện Phát triển Ứng dụng, tập thể Giảng viên Bộ môn Khoa học Môi trường đã hỗ trợ và tạo mọi điều kiện để tôi học tập, thực hiện và hoàn thành tốt luận án.

Ban Giám Hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM, Phòng Đào tạo Sau Đại học, Khoa Khoa học Sinh học, Viện Công nghệ sinh học và Môi trường Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Tất cả bạn bè và đồng nghiệp những người luôn đồng viên, giúp đỡ chân thành tôi trong quá trình làm luận án.

Ba Mẹ và những người thân trong gia đình, chồng và các con đã luôn ủng hộ, đồng viên và là điểm tựa tinh thần cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Nghiên cứu sinh

Hồ Bích Liên

TÓM TẮT

Đề tài “Nghiên cứu khả năng hấp thụ, tích lũy chì (Pb) và sự biểu hiện gen liên quan đến tính chịu chì (Pb) của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)” được thực hiện trên loài thực vật *Dracaena sanderiana*. Mục tiêu của đề tài là đánh giá khả năng sinh trưởng, tích lũy Pb và biểu hiện gen chống oxy hóa liên quan đến tính chịu Pb của *D. sanderiana* trong môi trường thí nghiệm nhiễm Pb nhân tạo, nhằm có cơ sở khoa học về cơ chế đáp ứng ở mức độ phân tử và tế bào của tính chống chịu Pb để ứng dụng *D. sanderiana* trong xử lý ô nhiễm Pb. Đề tài với các nội dung sau đã được thực hiện: (1) Xác định cơ sở khoa học của việc chọn lựa vật liệu sinh học và pH của môi trường thích hợp cho nghiên cứu; (2) Nghiên cứu khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của *D. sanderiana* ở các thời gian xử lý và nồng độ Pb khác nhau; (3) Đánh giá mức độ biểu hiện của 3 gen chống oxy hóa *glutathione S-transferase (GST)*, *Cyt-Cu/Zn superoxide dismutase (Cyt-Cu/Zn SOD)* và *glutathione peroxidase (GPX)* ở các thời gian và nồng độ Pb khác nhau. Kết quả cho thấy:

Loài thực vật sử dụng nghiên cứu thích hợp nhất trong 3 loài thuộc chi *Dracaena* là Phát tài (*Dracaena sanderiana*) và pH dung dịch Pb thích hợp là 4,5.

Sự sinh trưởng của *D. sanderiana* bị ảnh hưởng không đáng kể ở nồng độ Pb 200 - 800 ppm. *D. sanderiana* ít có bị ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và có khả năng chống chịu tốt với Pb ở khoảng nồng độ 200 - 800 ppm (khả năng chống chịu đạt 80,38 - 114,47%). Nhưng khi nồng độ Pb trong môi trường vượt ngưỡng gây độc (1000, 2000, 3000 và 4000 ppm) sinh trưởng của cây sẽ kém hẳn. Các chỉ tiêu về chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và khô, hàm lượng diệp lục tổng và hàm lượng nước giảm đáng kể so với đối chứng.

D. sanderiana có khả năng hấp thụ và tích lũy trong cây một lượng Pb lên đến 39235 mg/kg TLK trong môi trường có nồng độ Pb = 800 ppm. Ngưỡng nồng độ gây độc của Pb trong nước đối với cây *D. sanderiana* được xác định là 1000 ppm. Biểu hiện ngộ độc của Pb ở *D. sanderiana* xuất hiện khi cây tiếp xúc

với nước ô nhiễm Pb vượt ngưỡng chịu đựng của cây. Các triệu chứng điển hình như cây không tăng trưởng chiều cao, héo khô cả lá và thân, rễ co ngắn lại.

Phần lớn Pb hấp thụ được cây tích lũy chủ yếu trong rễ (chiếm 97,5%). Càng lên cao sự dịch chuyển Pb càng chậm. Sự tích lũy Pb trong cây giảm dần theo thứ tự rễ > thân > lá.

D. sanderiana có thể được xem là cây siêu tích lũy Pb vì cây có khả năng hấp thụ Pb cao hơn 500 lần, tích lũy Pb cao hơn 1% trọng lượng cây. Hàm lượng Pb tích lũy chủ yếu trong rễ nên *D. sanderiana* chỉ phù hợp cho cơ chế phytofiltration hoặc phytostabilization để xử lý Pb trong môi trường ô nhiễm.

Pb phân bố chủ yếu trong gian bào và vách tế bào. Ở mức độ tế bào, *D. sanderiana* có thể đã có một số phản ứng để đối phó với độc tính Pb: Loại bỏ Pb ra khỏi tế bào chất bằng cách cô lập Pb trong gian bào; Liên kết Pb với các thành phần trên vách tế bào hoặc kết tủa trong gian bào; Làm dày vách tế bào, trung trụ và làm tăng đường kính ống mạch.

Trên cây *D. sanderiana*, lần đầu tiên đoạn trình tự của các gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* với kích thước tương ứng lần lượt là 362, 221 và 202 bp đã được xác định. Mức độ biểu hiện gen *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* bị ức chế ở nồng độ Pb vượt ngưỡng chịu đựng của cây (1000 ppm). Sự tăng biểu hiện gen xảy ra ở các nồng độ Pb 200, 400, 600 và 800 ppm có thể là nguyên nhân giúp cây chống chịu tốt hơn với các tác động bất lợi của Pb. Gen *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* biểu hiện sớm và mạnh ở bộ phận rễ nơi có hàm lượng Pb tích lũy cao nhất nhằm đáp ứng kịp thời với độc tố Pb. Gen *GST* biểu hiện mạnh ở thân và lá của *D. sanderiana* đáp ứng cho sự vận chuyển Pb. Gen *GST* biểu hiện mạnh ở thân hơn lá có thể là lý do dẫn đến hàm lượng Pb tích lũy trong thân nhiều hơn trong lá.

Từ khóa: Biểu hiện gen, cây Phát tài, chì, gen chống oxy hóa, sự tích lũy chì.

SUMMARY

The thesis “Study on the lead absorption, accumulation and expression profiles of lead tolerant genes in *Dracaena sanderiana*” was conducted on Lucky bamboo plant (*Dracaena sanderiana*). The objective of the research aimed to evaluate the growth, the capacity of Pb tolerance, Pb accumulation, and antioxidant gene expression of *D. sanderiana* under artificial Pb poisoning experimental environment to supply scientific footing on molecular and cellular mechanisms of Pb induced plant stress responses to apply *D. sanderiana* in lead pollution treatment. Contents of the thesis were carried out: 1) Determining the scientific basis for the selection of suitable biological materials and the pH for research; 2) Examination of the growth and the capacity of Pb absorption and accumulation of *D. sanderiana* under different times and Pb concentrations conditions; 3) Evaluation of expression level of 3 antioxidant genes *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD*, and *GPX* under time, and Pb concentration dependent conditions. The results showed that:

D. sanderiana was the most appropriate plant among three species of *Dracaena* genus. pH 4.5 was the most suitable value for this study.

The growth of the *D. sanderiana* was not significantly affected at Pb concentrations 200 - 800 ppm. *D. sanderiana* had not much influence on growth and had Pb tolerance capacity at 200 - 800 ppm was from 80.38 to 114.47%. However, when the concentrations of Pb in the medium were higher than the tolerance limit of the plant (1000, 2000, 3000 and 4000 ppm), the growth of *D. sanderiana* could be inhibited. Plant height, root length, fresh and dry biomass, chlorophyll content and water content were significantly reduced compared with the control.

D. sanderiana can accumulate up to 39235 mg/kg Pb in the presence of Pb at 800 ppm. The threshold limit of *Dracaena sanderiana* was recorded at 1000 ppm of Pb in water. When the concentrations of Pb in the medium were higher than the tolerance limit of the plant, poisoning expressions in *Dracaena sanderiana*

appeared. Typical symptoms included reducing plant height growth, withering both leaves and stems, and shortened roots.

The lead was accumulated mainly in the roots (approximately 97.5%), and only a small fraction was translocated to aerial plant parts. Pb content in *D. sanderiana* plants decreased in the order of roots > stems > leaves. *D. sanderiana* can be considered as a hyperaccumulator plant species because its capacity of Pb absorption was 500 times higher than control, and the Pb accumulation was 1% higher than its weight. The Pb content accumulated mainly in the roots, so *D. sanderiana* is suitable for phytofiltration or phytostabilization to treat lead in polluted environments.

The lead was deposited mainly in extracellular spaces and the cell wall. At the cellular level, *D. sanderiana* could have several various lead detoxification mechanisms to which plants may respond, such as removing Pb from the cytoplasm, sequestering of Pb in extracellular spaces, binding of Pb to components of the cell wall, or precipitation of Pb in extracellular spaces;

For the first time, the sequences of the antioxidant genes *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* and *GPX* with sizes of 362, 221 and 202 bp, respectively, were identified in *D. sanderiana*. The expression levels of antioxidant genes *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* and *GPX* were inhibited at Pb concentrations above a tolerance limit of the plants (1000 ppm). The enhancement of gene expression at Pb 200 - 800 ppm may have evolved as part of the system protecting the cell from oxygen toxicity. *Cyt-Cu/Zn SOD* and *GPX* genes were early and strongly expressed in the root where accumulation and deposition of Pb were highest. This helps *D. sanderiana* respond promptly to lead. The significant enhancement of *GST* expression in stems and leaves of *D. sanderiana* that may be the way to transport lead to aerial plant parts. The overexpression of the *GST* gene may help the Pb concentration on stems greater than in leaves.

Keywords: Antioxidant gene, Dracaena sanderiana, gene expression, lead, lead accumulation

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
TÓM TẮT	iii
SUMMARY	v
MỤC LỤC.....	vii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	xii
DANH MỤC BẢNG.....	xiv
DANH MỤC HÌNH.....	xv
MỞ ĐẦU	1
1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI	1
2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI	3
3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU.....	4
4. Ý NGHĨA KHOA HỌC, THỰC TIỄN, TÍNH MỚI CỦA ĐỀ TÀI.....	4
5. LUẬN ĐIỂM BẢO VỆ.....	5
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	6
1.1. Các đặc tính của chì (Pb) và tình hình ô nhiễm Pb.....	6
1.1.1. Các đặc tính của Pb	6
1.1.2. Tình hình ô nhiễm Pb trên thế giới và ở Việt Nam.....	7
1.1.2.1. Tình hình ô nhiễm Pb trên thế giới	7
1.1.2.2. Tình hình ô nhiễm Pb ở Việt Nam	8
1.2. Phương pháp sử dụng thực vật xử lý ô nhiễm (Phytoremediation)	9
1.2.1. Định nghĩa	9
1.2.2. Phân loại	10
1.2.2.1. Phương pháp hấp thụ và tích lũy (Phytoextraction)	10
1.2.2.2. Phương pháp lọc độc chất (Rhizofiltration).....	11
1.2.2.3. Phương pháp bay hơi (Phytovolatilization)	11
1.2.2.4. Phương pháp cố định độc chất (Phytostabilization)	12

1.3. Khả năng hấp thụ, tích lũy, phân bố và chống chịu Pb của thực vật	13
1.3.1. Khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của thực vật.....	13
1.3.1.1. Cơ chế hấp thụ Pb của thực vật.....	13
1.3.1.2. Thực vật siêu hấp thụ	14
1.3.1.3. Khả năng tích lũy Pb ở thực vật.....	16
1.3.2. Khả năng phân bố Pb của thực vật	17
1.3.3. Khả năng chống chịu Pb của thực vật	18
1.3.3.1. Cơ chế làm dày vách tế bào	18
1.3.3.2. Cơ chế cô lập Pb	19
1.3.3.3. Cơ chế chống oxy hóa	21
1.3.3.4. Cơ chế dẫn truyền tín hiệu trong chống chịu Pb của thực vật	24
1.3.4. Ảnh hưởng của Pb đến thực vật.....	24
1.4. Giới thiệu cây Phát tài (<i>Dracaena sanderiana</i>)	29
1.4.1. Phân loại thực vật và nguồn gốc phân bố	29
1.4.2. Đặc điểm hình thái, sinh thái và sinh sản của Phát tài.....	30
1.4.3. Đặc tính đặc biệt của cây Phát tài	30
1.5. Gen, sự biểu hiện gen liên quan đến chống chịu Pb ở thực vật và kỹ thuật phân tử nghiên cứu biểu hiện gen	31
1.5.1. Các gen có liên quan đến chống chịu Pb ở thực vật	31
1.5.2. Sự biểu hiện gen liên quan đến chống chịu Pb ở thực vật	33
1.5.3. Kỹ thuật phân tử nghiên cứu biểu hiện gen	35
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.1. Tiến trình nghiên cứu.....	38
2.2. Vật liệu, trang thiết bị, dụng cụ và hóa chất nghiên cứu	39
2.2.1. Vật liệu nghiên cứu	39
2.2.2. Trang thiết bị và dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu	40
2.2.3. Hóa chất nghiên cứu	40
2.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu	41
2.3.1. Nội dung 1: cơ sở chọn lựa đối tượng và ph thích hợp cho nghiên cứu	41

2.3.1.1. Thí nghiệm 1: Sự tăng trưởng và khả năng tích lũy Pb của 3 loài thực vật trong chi <i>Dracaena</i> trong điều kiện nhiễm độc Pb	41
2.3.1.2. Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của cây Phát tài (<i>Dracaena sanderiana</i>)	43
2.3.2. Nội dung 2: khả năng hấp thụ và tích lũy pb của cây phát tài (<i>Dracaena sanderiana</i>)	45
2.3.2.1. Thực vật và pH sử dụng cho thí nghiệm.....	45
2.3.2.2. Bố trí thí nghiệm	46
2.3.2.3. Tiến hành thí nghiệm	46
2.3.2.4. Chỉ tiêu khảo sát và phương pháp phân tích các chỉ tiêu	46
2.3.3. Nội dung 3: sự biểu hiện gen chống oxy hóa của cây phát tài trong điều kiện nhiễm độc pb	49
2.3.3.1. Bố trí thí nghiệm xử lý Pb	50
2.3.3.2. Ly trích RNA tổng số và tổng hợp cDNA	50
2.3.4.3. Khuếch đại trình tự gen chống oxy hoá và gen <i>Actin (ACT)</i>	50
2.3.3.4. Tạo dòng gen chống oxy hoá <i>GST</i> , <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> , <i>GPX</i> và <i>ACT</i> trên vi khuẩn <i>Escherichia coli</i> DH5 α	51
2.3.3.5. Ly trích DNA plasmid và giải trình tự gen	53
2.3.3.6. Xây dựng đường chuẩn cho phản ứng Real-time PCR	53
2.3.3.7. Phân tích và đánh giá kết quả	55
2.4. Phân tích số liệu	55
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	56
3.1. Cơ sở chọn lựa đối tượng và ph thích hợp cho nghiên cứu	56
3.1.1. Sự tăng trưởng và khả năng tích lũy chì (pb) của ba loài thực vật thuộc chi <i>Dracaena</i> trong điều kiện nhiễm độc chì (pb)	56
3.1.1.1. Sự tăng trưởng của ba loài thực vật chi <i>Dracaena</i>	56
3.1.1.2. Khả năng hấp thụ và tích lũy Pb trong ba loài thực vật chi <i>Dracaena</i>	58
3.1.1.3. Khả năng loại bỏ Pb trong nước của ba loài thực vật chi <i>Dracaena</i>	59
3.1.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp thụ và tích lũy pb của cây phát tài.....	62

3.1.2.1. Ảnh hưởng của pH đến sự tăng trưởng của cây Phát tài ở nồng độ Pb 100 ppm.....	62
3.1.2.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp thu và tích lũy Pb trong cây <i>Dracaena sanderiana</i>	64
3.2. Khả năng hấp thu, tích lũy và phân bố chì (pb) của cây phát tài trong môi trường nhiễm độc pb	66
3.2.1. Sự sinh trưởng của cây Phát tài	66
3.2.1.1. Sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài.....	66
3.2.1.2. Sự tăng trưởng chiều dài rễ của cây Phát tài.....	68
3.2.1.3. Sự tăng trưởng sinh khối tươi và khô của cây Phát tài	69
3.2.1.4. Sự tổng hợp diệp lục tố trong lá của cây Phát tài	71
3.2.1.5. Hàm lượng nước trong cây Phát tài	73
3.2.1.6. Khả năng chống chịu độc tố Pb của cây Phát tài	74
3.2.2. Khả năng tích lũy Pb trong cây Phát tài.....	75
3.2.2.1. Hàm lượng Pb trong rễ, thân và lá của cây Phát tài.....	75
3.2.2.2. Khả năng vận chuyển Pb từ rễ lên thân lá của cây Phát tài	80
3.2.2.3. Sự cân bằng Pb trong nước và trong cây và hiệu quả loại bỏ Pb của cây Phát tài	82
3.2.3. Sự phân bố Pb trong phạm vi tế bào của cây Phát tài	85
3.2.3.1. Sự phân bố Pb trong rễ.....	85
3.2.3.2. Sự phân bố Pb trong thân.....	88
3.2.3.3. Sự phân bố Pb trong lá.....	90
3.2.4. Phản ứng của mô thực vật Phát tài trong điều kiện nhiễm độc Pb	91
3.2.4.1. Phản ứng của các mô ở rễ	91
3.2.4.2. Phản ứng của các mô ở thân	95
3.2.4.3. Phản ứng của các mô ở lá	99
3.3. Sự biểu hiện gen chống oxy hóa ở cây phát tài trong môi trường nhiễm độc pb.....	104
3.3.1. Kiểm tra sản phẩm RNA ly trích của các mẫu nghiên cứu.....	104

3.3.2. Khuếch đại trình tự gen chống oxy hóa của cây Phát tài.....	104
3.3.3. Tạo dòng gen chống oxy hóa	105
3.3.4. Ly trích DNA tái tổ hợp	108
3.3.5. Giải trình tự các gen chống oxy hóa	108
3.3.5.1. Trình tự gen <i>GST</i>	108
3.3.5.2. Trình tự gen <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i>	111
3.3.5.2. Trình tự gen <i>GPX</i>	113
3.3.6. Đánh giá mức độ biểu hiện gen chống oxy hóa của cây Phát tài.....	116
3.3.6.1. Đánh giá mức độ biểu hiện gen <i>GST</i>	116
3.3.6.2. Đánh giá mức độ biểu hiện gen <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i>	120
3.3.6.3. Đánh giá mức độ biểu hiện gen <i>GPX</i>	124
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	133
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN	
LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ	135
TÀI LIỆU THAM KHẢO	136
PHỤ LỤC	148

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ACT		Gen <i>Actin</i>
AsA	Acid ascorbic	
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Diseases Registry	Cơ quan đăng ký các chất độc hại và dịch bệnh
Bp	Base pair	Cặp base
CCI	Chlorophyll content index	Chỉ số hàm lượng diệp lục tố
Chl	Chlorophyll	Diệp lục tố
DNA	Deoxyribo nucleic acid	Axit nucleic
EPA	Environmental Protection Agency	Cơ quan bảo vệ môi trường
EEA	European Environment Agency	Cơ quan môi trường Châu âu
KCN		Khu công nghiệp
KLN		Kim loại nặng
KL		Kim loại
LLL		Lần lặp lại
NT		Nghiệm thức
GPX	Glutathione peroxidase	
GST	Glutathione S-transferase	
MAPKs	Mitogen-activated protein kinase	
MDHA	Monodehydroascorbate	
MDHAR	Monodehydroascorbate reductase	
MTs	Metallothioneins	
PCs	Phytochelatin	

PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PMU	Percentage of metal ion uptake	Phần trăm hấp thụ ion kim loại
QCVN 43:2012/BTNMT		Quy chuẩn Việt Nam 43:2012/Bộ tài nguyên môi trường
ROS	Reactive oxygen species	Chất oxy hóa
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
SOD	Superoxide dismutase	
TCE	Trichloroethylene	
TCCP		Tiêu chuẩn cho phép
TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
TF	Translocation factor	Hệ số vận chuyển
TI	Tolerance index	Chỉ số chống chịu
TLK		Trọng lượng khô
TNT	Trinitrotoluene	
USEPA	United States Environmental Protection Agency	Cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các loài thực vật có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb.....	15
Bảng 2.1 Trình tự các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu	40
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng nối DNA vào vector pGEM-T Easy	51
Bảng 3.1. Hàm lượng Pb tích lũy trong <i>D. sanderiana</i> , <i>D. deremensis</i> và <i>D. reflexa</i>	58
Bảng 3.2. Hiệu quả loại bỏ Pb trong nước của <i>D. sanderiana</i> , <i>D. deremensis</i> và <i>D. reflexa</i>	60
Bảng 3.3. Khả năng loại bỏ sinh học Pb của <i>D. sanderiana</i> , <i>D. deremensis</i> và <i>D. reflexa</i>	60
Bảng 3.4. Hàm lượng Pb tích lũy trong các bộ phận của <i>D. sanderiana</i> ở các pH khác nhau	65
Bảng 3.5. Khả năng chống chịu Pb của cây Phát tài	74
Bảng 3.6. Sự thay đổi biểu hiện gen <i>GST</i> theo thời gian của các mẫu ở các nồng độ Pb.....	119
Bảng 3.7. Sự thay đổi biểu hiện gen <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> theo thời gian của các mẫu ở các nồng độ Pb	124
Bảng 3.8. Sự thay đổi biểu hiện gen <i>GPX</i> theo thời gian của các mẫu ở các nồng độ Pb	128

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cơ chế chống chịu Pb ở thực vật bậc cao	20
Hình 1.2. Hoạt động của chất chống oxy hóa SOD, GPX	22
Hình 1.3. Sự tác động của Pb đối với tế bào thực vật.....	26
Hình 1.4. Đặc điểm hình thái của cây Phát tài.....	29
Hình 2.1. Sơ đồ tiến trình nghiên cứu.....	38
Hình 2.2. Loài Phát tài <i>Dracaena sanderiana</i> dùng trong nghiên cứu.....	45
Hình 2.3. Quy trình thực hiện nghiên cứu biểu hiện gen.....	49
Hình 3.1. Sự tăng trưởng chiều cao cây của ba loài thực vật chi <i>Dracaena</i>	57
Hình 3.2. Sự tăng trưởng sinh khối khô của ba loài thực vật chi <i>Dracaena</i>	57
Hình 3.3. Tỷ phần Pb trong cây và trong nước sau 30 ngày thí nghiệm	61
Hình 3.4. Sự tăng trưởng chiều dài rễ của cây Phát tài ở các pH khác nhau	63
Hình 3.5. Sự tăng trưởng diện tích lá của cây Phát tài ở các pH khác nhau	63
Hình 3.6. Sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài ở các pH khác nhau	64
Hình 3.7. Sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau	67
Hình 3.8. Sự tăng trưởng chiều dài rễ cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau	69
Hình 3.9. Sự tăng trưởng sinh khối tươi của cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau	70
Hình 3.10. Sự tăng trưởng sinh khối khô của cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau	71
Hình 3.11. Sự biến động hàm lượng diệp lục tố trong lá cây Phát tài ở các nồng độ Pb khác nhau	72
Hình 3.12. Sự biến động hàm lượng nước trong cây Phát tài ở các nồng độ Pb khác nhau	73
Hình 3.13. Hàm lượng Pb tích lũy trong rễ của cây Phát tài	75
Hình 3.14. Hàm lượng Pb tích lũy trong thân của cây Phát tài	76
Hình 3.15. Hàm lượng Pb tích lũy trong lá của cây Phát tài	76

Hình 3.16. Sự tích lũy Pb trong các bộ phận của cây Phát tài ở 60 ngày thí nghiệm	79
Hình 3.17. Hệ số vận chuyển Pb (TF) ở cây Phát tài	81
Hình 3.18. Sự cân bằng Pb trong môi trường nước và cây.....	83
Hình 3.19. Hiệu suất loại bỏ Pb của cây Phát tài	84
Hình 3.20. Cấu trúc giải phẫu chung của rễ cây Phát tài	85
Hình 3.21. Sự bắt màu thuốc nhuộm của Pb.....	86
Hình 3.22. Sự phân bố của Pb ở mô biểu bì, vỏ ngoài và mô mềm vỏ của rễ cây Phát tài	86
Hình 3.23. Sự phân bố của Pb ở nội bì của rễ cây Phát tài	87
Hình 3.24. Chỉ phân bố Pb trong mô rễ ở nồng độ 4000ppm	88
Hình 3.25. Cấu trúc chung của thân cây Phát tài	89
Hình 3.26. Sự phân bố Pb trong mô thân Phát tài	89
Hình 3.27. Cấu trúc giải phẫu của lá Phát tài	90
Hình 3.28. Sự phân bố Pb trong lá Phát tài ở một số nồng độ xử lý	91
Hình 3.29. Kích thước các lớp mô của rễ ở các nồng độ Pb.....	92
Hình 3.30. Sự thay đổi độ dày biểu bì rễ của cây phát tài khi tiếp xúc với Pb ở các nồng độ khác nhau.....	93
Hình 3.31. Sự thay đổi độ dày mô mềm rễ của cây phát tài khi tiếp xúc với Pb ở các nồng độ khác nhau	94
Hình 3.32. Sự thay đổi đường kính ống mạch gỗ ở rễ của cây Phát tài khi tiếp xúc với Pb ở các nồng độ khác nhau	95
Hình 3.33. Kích thước các lớp mô của thân ở các nồng độ Pb.....	96
Hình 3.34. Sự thay đổi độ dày lớp mô mềm vỏ ở thân cây Phát tài khi tiếp xúc ở các nồng độ Pb khác nhau	96
Hình 3.35. Sự thay đổi đường kính bó mạch của thân ở các nồng độ Pb	97
Hình 3.36. Độ dày lớp mô mềm vỏ ở thân cây phát tài ở các nồng độ Pb	98
Hình 3.37. Kích thước các lớp mô của lá Phát tài ở các nồng độ Pb	100
Hình 3.38. Kích thước nhu mô và bó mạch của lá Phát tài ở các nồng độ Pb.....	100

Hình 3.39. Độ dày lớp nhu mô lá phát tài ở các nồng độ Pb	101
Hình 3.40. Kết quả PCR gen chống oxy hoá từ mẫu cDNA cây Phát tài.....	105
Hình 3.41. Khuẩn lạc <i>E. coli</i> đã tạo dòng gen trên môi trường LB	106
Hình 3.42. Kết quả PCR gen <i>GST</i> (a), <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> (b) và <i>GPX</i> (c) từ khuẩn lạc vi khuẩn	107
Hình 3.43. Kết quả ly trích DNA tái tổ hợp.....	108
Hình 3.44. Kết quả tìm kiếm trình tự gen <i>GST</i> của cây Phát tài trên ngân hàng gen	110
Hình 3.45. Kết quả so sánh trình tự gen <i>GST</i> trên <i>Dracaena sanderiana</i> và <i>Dracaena cambodiana</i> (KU565013.1) được công bố trên Genbank.....	111
Hình 3.46. Kết quả tìm kiếm trình tự gen <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> của cây Phát tài trên ngân hàng gen	112
Hình 3.47. Kết quả so sánh trình tự gen <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> trên <i>Dracaena sanderiana</i> với trình tự gen của <i>Elaeis guinensis</i> và <i>Asparagus officinalis</i>	113
Hình 3.48. Kết quả tìm kiếm trình tự gen <i>GPX</i> của cây Phát tài trên ngân hàng gen	115
Hình 3.49. Kết quả BLAST nucleotide trong ngân hàng gen NCBI	115
Hình 3.50. Mức độ biểu hiện gen <i>GST</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ Phát tài.....	116
Hình 3.51. Mức độ biểu hiện gen <i>GST</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân Phát tài.....	117
Hình 3.52. Mức độ biểu hiện gen <i>GST</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá Phát tài.....	117
Hình 3.53. Mức độ biểu hiện gen <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ Phát tài.....	121
Hình 3.54. Mức độ biểu hiện gen <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân Phát tài	121
Hình 3.55. Mức độ biểu hiện gen <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá Phát tài	122

Hình 3.56. Mức độ biểu hiện gen <i>GPX</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ Phát tài	125
Hình 3.57. Mức độ biểu hiện gen <i>GPX</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân Phát tài	126
Hình 3.58. Mức độ biểu hiện gen <i>GPX</i> theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá Phát tài	126

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Hiện nay, một trong những vấn đề lớn được con người quan tâm nhiều nhất là sự ô nhiễm môi trường đất, nước và không khí do nhiều yếu tố độc hại gây ra. Trong đó, vấn đề ô nhiễm kim loại nặng như Chì (Pb), Đồng (Cu), Cadimi (Cd), Asen (As) trong môi trường ngày càng được quan tâm ở nhiều quốc gia trên thế giới vì các chất ô nhiễm này đã làm ảnh hưởng xấu trực tiếp đến sức khỏe con người, động vật và cây trồng.

Các kim loại nặng (KLN) có thể thâm nhập vào môi trường bằng nhiều con đường khác nhau, trong đó các hoạt động sinh hoạt và sản xuất của con người đóng vai trò rất quan trọng. Khi xâm nhập vào môi trường, chúng có thể gây ô nhiễm nguồn nước và ô nhiễm đất trồng. Điều đáng nói là nhiều KLN có khả năng tích tụ trong đất, trong cơ thể động, thực vật và rất khó phân giải hay đào thải. Điều này có thể ảnh hưởng đến sức khỏe con người khi sử dụng nguồn thức ăn từ những động, thực vật sinh trưởng trong những vùng bị ô nhiễm.

Cho đến nay, nói đến ô nhiễm KLN, người ta thường nghĩ đến Pb vì mức độ ô nhiễm phổ biến và độc tính cao đối với cơ thể sống. Trong 4 loại KLN được đánh giá là những chất gây nguy hiểm nhất cho môi trường sinh thái (As, Hg (thủy ngân), Pb và Cd), mức độ nguy hiểm của Pb được xếp đứng thứ 2 (sau As) (ATSDR, 2007). Thống kê của Hiệp hội chì quốc tế năm 2012 cho biết, thế giới sử dụng khoảng 10 triệu tấn Pb cho các loại hình công nghiệp mỏ và chế biến khoáng chất, sản xuất kim loại màu, pin, acquy, công nghiệp gia công kim loại, nhưng có đến 1 triệu tấn Pb con người thải vào môi trường (Cơ quan môi trường Châu âu (EEA), 2019). Điều này đã gây ô nhiễm Pb trong môi trường đất và nước ngày càng nặng hơn. Pb không thể được phân hủy sinh học và nó gây độc đối với sinh vật sống ngay cả ở nồng độ thấp. Nếu không có biện pháp khắc

phục, mức độ Pb trong môi trường cao sẽ không bao giờ trở lại bình thường (Traunfeld và Clement, 2001).

Chính vì vậy việc nghiên cứu tìm ra phương pháp xử lý KLN nói chung và Pb nói riêng trong môi trường là vô cùng quan trọng. Những phương pháp truyền thống và hiện đại được áp dụng để xử lý KLN bao gồm các phương pháp vật lý, hóa học, xử lý nhiệt hay phương pháp chôn lấp, hầu hết các phương pháp này đều ứng dụng những công nghệ tiên tiến, tuy tốc độ xử lý chất ô nhiễm nhanh nhưng ngược lại chúng khá tốn kém về chi phí (EPA, 2000). Theo Matthew (2019), để làm sạch ô nhiễm Pb ở Mỹ trong 10 năm thì mỗi năm Mỹ phải bỏ ra 10 tỷ USD.

Trong những thập niên gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã tìm ra được phương pháp sinh học mới để xử lý KLN là phytoremediation. Đây là phương pháp dùng thực vật để loại bỏ ô nhiễm KLN trong môi trường bằng cách trồng các cây siêu hấp thụ (hyperaccumulator). Phương pháp này dựa trên cơ chế hấp thụ, chuyển hóa, chống chịu và loại bỏ các chất ô nhiễm của một số loài thực vật (EPA, 2000). Việc ứng dụng thực vật xử lý ô nhiễm Pb trong môi trường đã đạt được nhiều thành tựu khoa học và thực tiễn, đã thống kê một số loại cây có khả năng tích lũy Pb như cây Hướng dương (*Helianthus annuus* L.), Lục bình (*Eichhornia crassipes* S.), Mù tạt trắng (*Helianthus annuus* L.), Bắp (*Zea mays* L.) (Henry, 2000). Tuy nhiên, hiện nay việc sử dụng công nghệ phytoremediation để giải ô nhiễm Pb đang ít được quan tâm hơn so với các kim loại khác vì hai nhược điểm lớn là số loài thực vật được phát hiện có khả năng siêu hấp thụ chỉ rất ít và sự hiểu biết về các cơ chế phân tử liên quan đến tính chống chịu Pb của thực vật chưa nhiều (Florence và ctv 2013). Vì vậy việc nghiên cứu tìm ra một loại thực vật và tìm hiểu khả năng chịu Pb ở mức độ phân tử của nó là một hướng đi đầy triển vọng và cần thiết.

Cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*), có nguồn gốc ở châu Phi, ngay sau khi được du nhập vào Việt Nam, nó được trồng và phân bố khắp Việt Nam. Với ý nghĩa mang lại may mắn cho gia chủ trong cuộc sống và công việc, cây Phát

tài được ưa chuộng và từ đó giá trị kinh tế cũng được nâng cao. Ngoài giá trị tinh thần và kinh tế, những năm gần đây cây Phát tài được phát hiện có giá trị trong xử lý môi trường. Khả năng hấp thụ được nhiều kim loại nặng Cu, Cr (Crom), Ni (Niken), Hg, Cd, Pb của Phát tài đã được phát hiện bởi nhiều nhà khoa học (Ten Yi Hao, 2011; Sereshi và ctv, 2014), tuy nhiên các nghiên cứu này chỉ thực hiện ở thời gian ngắn, ở ngưỡng nồng độ Pb thấp và không đánh giá sâu ở mức độ biểu hiện gen, cơ chế đáp ứng phân tử của thực vật nên kết quả còn hạn chế.

Xuất phát từ những lý do trên, đề tài **“Nghiên cứu khả năng hấp thụ, tích lũy chì (Pb) và sự biểu hiện gen liên quan đến tính chịu chì (Pb) của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)”** đã được thực hiện nhằm tìm ra một loài thực vật có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb để ứng dụng công nghệ phytoremediation giải quyết vấn đề ô nhiễm Pb, minh chứng và bổ sung đầy đủ hơn vào cơ sở di truyền về khả năng đáp ứng ở mức độ phân tử với môi trường nhiễm độc Pb của thực vật.

2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

Mục tiêu tổng quát

Đánh giá được khả năng sinh trưởng, tích lũy Pb và biểu hiện gen liên quan đến tính chống chịu Pb của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) trong môi trường nhiễm độc Pb nhằm có cơ sở khoa học về sự đáp ứng ở mức độ phân tử của tính chống chịu Pb để ứng dụng cây Phát tài trong xử lý ô nhiễm Pb.

Mục tiêu cụ thể

- Xác định được ngưỡng Pb gây độc cho cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*).
- Đánh giá được khả năng sinh trưởng, hấp thụ và tích lũy Pb trong các bộ phận rễ, thân và lá của cây Phát tài.
- Xác định được vị trí phân bố Pb ở phạm vi tế bào và phản ứng của mô thực vật trong điều kiện nhiễm độc Pb.
- Đánh giá được mức độ biểu hiện của 3 gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn* *SOD* và *GPX* ở cây Phát tài trong điều kiện nhiễm độc Pb.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

- Loài Phát tài (*Dracaena sanderiana*): thường có tên gọi là Phát tài lộc, Phát dụ xanh, một số người địa phương còn gọi là Phát tài quan âm, là một loài thực vật thân bụi có hoa lâu năm, thuộc họ *Asparagaceae*, có nguồn gốc từ Trung Phi (Phạm Hoàng Hộ, 2003).

Phạm vi và địa điểm nghiên cứu

- Nghiên cứu khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của giống Phát tài ở quy mô phòng thí nghiệm, với dãy nồng độ Pb gây nhiễm 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 4000 ppm trong thời gian 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày.
- Mức độ biểu hiện 3 gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* được khảo sát ở 5 nồng độ Pb 200, 400, 600, 800 và 1000 ppm trong thời gian 0, 1, 2 và 24 giờ trên 3 bộ phận rễ, thân và lá của cây.
- Đề tài được thực hiện tại trường Đại học Thủ Dầu Một - Bình Dương và Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường - Trường ĐH Nông Lâm, TP. HCM.

4. Ý NGHĨA KHOA HỌC, THỰC TIỄN VÀ TÍNH MỚI CỦA ĐỀ TÀI

Ý nghĩa khoa học của đề tài

- Kết quả của luận án sẽ cung cấp những cơ sở dữ liệu đầu tiên về khả năng hấp thụ, tích lũy Pb và sự đáp ứng ở mức độ phân tử dựa vào mức độ biểu hiện của 3 gen chống oxy hóa liên quan đến tính chống chịu Pb của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*), góp phần bổ sung cơ sở khoa học cho những nghiên cứu khảo sát khả năng chống chịu stress Pb của các loài thực vật.
- Kết quả của luận án cũng sẽ cung cấp cơ sở lý luận cho việc lựa chọn cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) xử lý Pb, ứng dụng vào công nghệ phytoremediation góp phần giải quyết ô nhiễm môi trường.

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

- Đề tài tìm ra một loài thực vật có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb ở nồng độ cao có thể ứng dụng để giải quyết tình trạng ô nhiễm Pb đang ngày càng tăng, góp phần bảo vệ môi trường.

Tính mới của đề tài

- Việc nghiên cứu về khả năng hấp thụ, tích lũy và biểu hiện gen có liên quan đến tính chịu Pb đã được thực hiện trên nhiều loài thực vật, tuy nhiên việc nghiên cứu khả năng hấp thụ và biểu hiện gen chống oxy hóa liên quan đến tính chống chịu Pb trên cây Phát tài vẫn chưa được thực hiện ở Việt Nam và cả trên thế giới.
- Trình tự một phần của 3 gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* của cây Phát tài đã được xác định.

5. LUẬN ĐIỂM BẢO VỆ

- Ngưỡng chịu độc tố Pb của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*).
- Sự hấp thụ, tích lũy và phân bố Pb trong cây Phát tài.
- Sự biểu hiện gen chống oxy hóa *Cyt-Cu/Zn SOD*, *GPX* và *GST* trong cây Phát tài.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. CÁC ĐẶC TÍNH CỦA CHÌ (Pb) VÀ TÌNH HÌNH Ô NHIỄM Pb

1.1.1. Các đặc tính của Pb

Chì là một nguyên tố hóa học thuộc nhóm 14 trong bảng tuần hoàn hóa học, có số nguyên tử là 82 và khối lượng nguyên tử là 207, viết tắt là Pb (Latin: Plumbum). Pb có hóa trị phổ biến là II, có khi là IV. Pb tồn tại ở 2 dạng oxy hóa là 2 và 4. Pb là một KLN có độc tính cao, có ảnh hưởng nghiêm trọng trong môi trường sinh thái. Trong tất cả KLN gây độc, mức độ gây độc của Pb được xếp thứ 2 (ATSDR, 2007).

Trong đất, Pb có thể tồn tại ở dạng ion KL tự do, tạo phức với các thành phần vô cơ (HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} và Cl^-), kết hợp với các acid hữu cơ (như acid amin, acid fulvic và acid humic), hoặc có thể hấp phụ trên bề mặt các hạt (Fe-oxide, vật liệu sinh học và các hạt đất sét) (Vega và ctv, 2010). Sự di động của Pb trong đất thường bị hạn chế bởi sự hấp phụ của sét, Fe, oxide mangan và hình thành các hợp chất có tính di động thấp như PbSO_4 , PbCO_3 và $\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$. Pb thường tích tụ chủ yếu ở tầng đất mặt với nồng độ giảm dần theo độ sâu. Trong môi trường đất ở khu công nghiệp Bayonne - New Jersey, hàm lượng Pb được xác định trong đất bề mặt (0 - 15 cm) là 2.300 mg/kg; ở độ sâu 15 - 30 cm là 1.280 mg/kg và ở độ sâu 30 - 45 cm là 1.055 mg/kg (Kabata, 2001).

Trong môi trường nước, Pb có thể liên kết với các anion hữu cơ, chloride và hydroxide tạo các hợp chất không tan hoặc kết hợp với sulphite, sulphate, hydroxy carbonate và anion phosphate tạo các hợp chất ít tan. Độ hòa tan của Pb trong nước phụ thuộc vào giá trị pH của nước, pH càng thấp thì khả năng hòa tan của Pb càng cao, khi pH trung tính thì Pb sẽ bị kết tủa (Kabata, 2001).

Pb không có chức năng sinh học và gây độc đối cho sinh vật sống ở nồng độ rất thấp. Khi tiếp xúc Pb ở nồng độ 25 - 30 g, nạn nhân thấy vị ngọt rồi chất, nghẹn ở cổ, nôn ra chất trắng, đau bụng dữ dội, mạch yếu, tê chân tay, co giật và

tử vong. Khi cơ thể nhiễm độc Pb, thận bị tổn thương nặng, hemoglobin hồng cầu bị thoái hóa, gây viêm não dẫn đến co giật, liệt và hôn mê. Phụ nữ mang thai khi tiếp xúc với Pb thường đẻ non, trẻ chết khi mới sinh. Ở nam giới, Pb gây tổn thương tinh hoàn, vô sinh, liệt dương (Trịnh Thị Thanh, 2007).

Pb được dùng phổ biến trong cuộc sống và nhất là trong công nghiệp. Pb được dùng trong sơn công nghiệp, ắc quy Pb, nguyên liệu trong luyện kim Pb, làm chất xúc tác trong sản xuất polymer. Sự ứng dụng rộng rãi của Pb đã gây ra ô nhiễm cho môi trường sinh thái, đặc biệt là môi trường đất. Trong môi trường, Pb tồn tại rất lâu dài và bền vững. Pb có thể được lưu giữ trong môi trường khoảng 150 - 5000 năm. Pb không thể được phân hủy sinh học, nếu không có biện pháp khắc phục, mức độ Pb trong môi trường cao sẽ không bao giờ trở lại bình thường (Vega và ctv, 2010).

1.1.2. Tình hình ô nhiễm Pb trên thế giới và ở Việt Nam

1.1.2.1. Tình hình ô nhiễm Pb trên thế giới

Nhiều nước trên thế giới đang phải đối mặt với ô nhiễm KLN. He và ctv (2015) đã cho biết trên 10 triệu khu vực ô nhiễm thì có đến hơn 50% khu vực ô nhiễm KLN. Phần lớn các khu vực ô nhiễm KLN nằm ở các nước phát triển như Mỹ, Úc, Đức, Thụy Điển và Trung Quốc. Trong 91 mẫu đất nông nghiệp ở San Francisco, có trên 62% mẫu đất nhiễm Pb. Ở các khu vực luyện kim, khai thác Pb ở Mỹ, hàm lượng Pb trong đất khoảng 1500 $\mu\text{g/g}$, gấp 15 lần so với mức bình thường. Hàm lượng Pb trong đất ở khu vực xung quanh nhà máy luyện kim ở Galena, Kansas (Mỹ) là 7600 $\mu\text{g/g}$.

Hàm lượng Pb > 100 mg/kg trong đất ở nhiều nơi của Anh đã phản ánh tình trạng ô nhiễm Pb, hầu hết các mẫu đất ở 53 thành phố, thị xã có lượng Pb tổng > 200 mg/kg. Đất ở nhiều vùng công nghiệp > 500 mg/kg (Meers và ctv, 2010). Ở Pháp, 11400 mẫu đất nông nghiệp đã được phát hiện ô nhiễm Pb. 700 km² đất khu vực Campine ở Hà Lan và Bỉ bị ô nhiễm bởi sự lắng đọng của Pb (Meers và ctv, 2010). Các nước ở Châu Á cũng có tình trạng ô nhiễm Pb cao trên thế giới, trong đó đặc biệt là Trung Quốc với hơn 10% đất bị ô nhiễm Pb. Ở Thái Lan,

154 cánh đồng lúa thuộc tỉnh Tak đã nhiễm Pb cao gấp 94 lần so với tiêu chuẩn (Lê Văn Khoa và ctv, 2003).

1.1.2.2. Tình hình ô nhiễm Pb ở Việt Nam

Ở Việt Nam, tình hình ô nhiễm Pb đã và đang diễn ra ngày càng trầm trọng. Theo kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy Pb có mặt ở khắp nơi với nồng độ khá cao như trong đất nông nghiệp, nước mặt, trầm tích, nước ngầm.

Khi tiến hành khảo sát 39 mẫu đất và nước ở khu vực Đông Anh, Hà Nội (29 địa điểm thuộc 14 xã), Đỗ Thị Thanh Tâm và ctv (2011) đã phát hiện có 12 mẫu đất và 27 mẫu nước nhiễm Pb.

Trong các mẫu nước ngầm khảo sát, có nhiều mẫu có hàm lượng Pb vượt Quy chuẩn về nước ngầm. Điều này chắc chắn gây ra những ảnh hưởng xấu đến sức khỏe của người dân nơi đây nếu như họ vẫn sử dụng chúng để ăn, uống hàng ngày vì Pb là một KL có khả năng tích lũy cao. Nhiều vị trí trên sông Nhuệ bị ô nhiễm Pb. Nồng độ Pb trong trầm tích sông Nhuệ vượt giới hạn của QCVN 43:2012/BTNMT đối với chất lượng trầm tích (Nguyễn Thị Lan Hương, 2014).

Theo Trung tâm quan trắc và kỹ thuật môi trường tỉnh Đồng Nai (2015), môi trường đất ở một số khu vực tiếp nhận nguồn thải của khu công nghiệp (KCN) và khu vực phụ cận các bãi chôn lấp chất thải rắn trên địa bàn tỉnh Đồng Nai bị ô nhiễm Pb. Hàm lượng Pb trong đất (cả 3 tầng 30 cm, 60 cm và 90 cm) ở KCN Biên hòa 1 vượt 3,3 - 4 lần và ở KCN Hố Nai vượt 2 lần so với tiêu chuẩn (Tạp chí môi trường – Tổng cục môi trường, 2015).

Nói đến ô nhiễm Pb ở Việt Nam, nhiều người sẽ nghĩ ngay đến các làng nghề tái chế KL vì đây là những nơi góp phần làm tăng thêm tình trạng ô nhiễm Pb trong nhiều năm nay. Đông Mai được xem là 1 trong 4 làng nghề gây ô nhiễm Pb trầm trọng nhất tỉnh Hưng Yên. Nước bề mặt tại các con kênh, rạch quanh làng có nồng độ Pb cao gấp hàng nghìn lần so với tiêu chuẩn. 100% số mẫu đất khảo sát ở khu tái chế Pb ở thôn Đông Mai, Văn Lâm, Hưng Yên có hàm lượng Pb vượt quá tiêu chuẩn cho phép (TCCP là 100 ppm), hàm lượng Pb trong đất dao động từ 125,4 - 2166 ppm (Nguyễn Khánh Tân, 2016). Hàm lượng Pb trong

các mẫu đất nông nghiệp ở làng nghề tái chế Pb Xã Chỉ Đạo (Hưng Yên) rất cao (964 ppm - 7070 ppm), vượt hơn 100 lần so với TCVN 7209:2002 (70 ppm) (Đặng Thị An và ctv, 2008). Hàm lượng Pb trong đất tại làng nghề cơ kim khí Phùng Xá (Hà Tây) là 304,59 mg/kg (Nguyễn Khánh Tân, 2016). Ở khu vực khai thác và chế biến Zn - Pb làng Hích (Thái Nguyên), hàm lượng Pb trong bãi thải cao nhất (5.300 - 9.200 ppm), tiếp đến là đất ruộng lúa (1271 - 3.953 ppm), bãi liên kề (164 - 904 ppm), (Đặng Thị An và ctv, 2008).

Nước thải tại các làng nghề tái chế KL cũng có hàm lượng Pb cao. Hàm lượng Pb trong nước thải ở một số làng nghề tái chế KL như Chỉ Đạo-Bắc Ninh; Vân Chàng - Nam Định; Phước Kiều - Quảng Ninh; Xuân Tiến - Nam Định theo thứ tự là 0,35 ppm liên; 0,9 ppm; 0,6 ppm; 0,44 ppm đều vượt so với tiêu chuẩn (TCVN 5845-1995 - 0,1ppm).

Việc sản xuất có quan đến Pb của các nhà máy, công ty đã làm cho môi trường đất, nước và không khí ở Việt Nam ô nhiễm ngày càng nghiêm trọng. Để giải quyết vấn nạn này, việc tìm ra giải pháp hiệu quả trong xử lý Pb là vấn đề cấp bách.

1.2. PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG THỰC VẬT XỬ LÝ Ô NHIỄM (PHYTOREMEDIATION)

1.2.1. Định nghĩa

Phương pháp sử dụng thực vật xử lý ô nhiễm ra đời vào năm 1991 với tên gọi là phytoremediation. Ngay từ khi ra đời, phương pháp này được mô tả ngắn gọn trong nhiều bài viết với nhiều định nghĩa khác nhau. Tuy nhiên, nhìn chung, nó được định nghĩa là một phương pháp sử dụng thực vật để loại bỏ các chất ô nhiễm (chất vô cơ và chất hữu cơ) ra khỏi các môi trường bị ô nhiễm (đất, nước mặt, nước ngầm, nước thải, bùn thải và cả môi trường không khí) (EPA, 2000). Định nghĩa này bao gồm tất cả các quá trình sinh học, hóa học, và vật lý ảnh hưởng đến việc hấp thụ, cô lập, phân hủy, và chuyển hóa các chất ô nhiễm bởi thực vật.

1.2.2. Phân loại

Phương pháp sử dụng thực vật xử lý ô nhiễm có thể được phân loại dựa trên cơ chế xử lý chất ô nhiễm của thực vật. Thực vật hấp thụ các chất ô nhiễm từ đất và tích lũy trong cây gọi là phương pháp hấp thụ và tích lũy (**Phytoextraction**); Thực vật tiết ra các hợp chất sinh học kết hợp với chất ô nhiễm và làm giảm khả năng di động và độc tính của chất ô nhiễm gọi là phương pháp cố định độc chất (**Phytostabilization**); Thực vật sản sinh các hợp chất sinh học phân hủy chất ô nhiễm gọi là phương pháp phân hủy chất ô nhiễm (**Phytodegradation**); Thực vật hấp thụ chất ô nhiễm đưa vào bên trong cây, sau đó biến đổi sang trạng thái hơi rồi giải phóng ra không khí theo quá trình thoát hơi nước gọi là phương pháp bay hơi (**Phytovolatilization**); Thực vật hấp thụ chất ô nhiễm và tích lũy trong vùng rễ gọi là phương pháp lọc độc chất (**Rhizofiltration**).

Đối với chất ô nhiễm là KLN, các phương pháp thích hợp sử dụng để loại bỏ là phương pháp hấp thụ và tích lũy; phương pháp lọc độc chất, phương pháp bay hơi và phương pháp cố định độc chất.

1.2.2.1. Phương pháp hấp thụ và tích lũy (**Phytoextraction**)

Là phương pháp sử dụng thực vật có khả năng hấp thụ và tích lũy chất ô nhiễm trong thân lá của cây để loại bỏ các chất ô nhiễm ra khỏi khu vực ô nhiễm thường là đất (EPA, 2000). Những thực vật có thể tích lũy nồng độ KLN cao trong mô của chúng thường được sử dụng trong phương pháp hấp thụ và tích lũy. Nếu thực vật là loài có sinh khối lớn và khả năng tích lũy cao, thì một lượng KLN đáng kể có thể được loại bỏ từ môi trường đất thông qua việc hấp thụ và tích lũy của thực vật.

Việc phát hiện ra các loài siêu hấp thụ (hyperaccumulator) đã chứng minh rằng thực vật có khả năng hấp thụ, tích lũy và loại bỏ KL ra khỏi môi trường ô nhiễm. Hầu hết thực vật siêu hấp thụ là những loài siêu hấp thụ Ni trong khi một số khác là siêu hấp thụ Cd, Co (Coban), Cu, Zn (Kẽm), Pb. Số lượng các loài thực vật được xác định có khả năng tích lũy KLN As, Cd, Co, Cu, Pb, Ni, Se $\geq$ 1000 mg/kg TLK theo thứ tự là 4, 1, 34, 34, 14, > 320 và 20 (Reeves, 2003).

Nhiều loài trong chi *Brassica* như *B. juncea* L., *B. Czern* L., *B. napus* L. và *B. rapa* L. Đã được phát hiện có khả năng hấp thụ nhiều Zn và Cd. *Thlaspi* sp., *Arabidopsis* sp., *Sedum alfredii* sp. cũng đã được phát hiện là các loài thực vật siêu hấp thụ KLN, trong đó *Thlaspi* sp. là loài siêu hấp thụ Cd, Ni, Pb, Zn, *T. geosingense* và *T. ochroleuca* siêu hấp thụ Ni và Zn, và *T. rotundifolium* siêu hấp thụ Ni, Pb và Zn (Prasad và Freitas, 2003). Trong số các loài thực vật thuộc chi *Thlaspi*, *Thlaspi caerulescens* có thể loại bỏ trên 60 kg Zn/ha và 8,4 kg Cd/ha. *T. caerulescens* cũng có thể loại bỏ 22% Cd ra khỏi các vùng đất bị ô nhiễm. Trong số các loài thuộc chi *Pteris*, bốn loài *P. vitta*, *P. cretica*, *P. longifolia* và *P. umbrosa* là các loài siêu tích lũy As (Prasad và Freitas, 2003).

1.2.2.2. Phương pháp lọc độc chất (Rhizofiltration)

Tương tự phương pháp hấp thụ và tích lũy, phương pháp lọc độc chất cũng là một phương pháp hấp thụ và tích lũy chất ô nhiễm, nhưng khác ở chỗ chất ô nhiễm được tích lũy ở rễ và sử dụng kỹ thuật trồng thủy canh. Phương pháp lọc độc chất được sử dụng chủ yếu để xử lý nước ngầm, nước mặt và nước thải và đã được áp dụng để xử lý Pb, Cd, Cu, Ni, Zn và Cr (Prasad và Freitas, 2003).

Một số loài thực vật thủy sinh đã được xác định thích hợp cho phương pháp lọc độc chất để loại bỏ KLN ra khỏi môi trường nước ô nhiễm như *Polygonum amphibium* L., cỏ chân vịt (*Lemna minor* L.), lục bình (*Eichhornia crassipes*), bèo cái (*P. stratiotes*), cỏ muỗi nước (*Oenanthe javanica*) (Prasad và Freitas, 2003). Một số loài thực vật trên cạn khi trồng thủy canh cũng có thể loại bỏ KLN ra khỏi dung dịch. Mù tạt Ấn Độ có hiệu quả trong việc loại bỏ Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, và hướng dương loại bỏ được Pb, U (Urani), Cs (Xesi) - 137 và Sr (Stronti) - 90. Trong số các loài dương xỉ, *Pteris vitta* được xác định là cây siêu hấp thụ As trong môi trường nước bị ô nhiễm (Prasad và Freitas, 2003).

1.2.2.3. Phương pháp bay hơi (Phytovolatilization)

Là phương pháp sử dụng thực vật để hút các chất ô nhiễm. Chất ô nhiễm sẽ được biến đổi và chuyển vào trong thân, lên lá và cuối cùng được bài tiết ra ngoài qua lỗ khí khổng cùng với quá trình thoát hơi nước của cây. Các chất ô

nhễm có thể được biến đổi trước khi vào trong cây do tác dụng của enzyme được sản sinh bởi rễ cây, hoặc có thể được biến đổi sau khi đi vào trong cây. Phương pháp bay hơi áp dụng cho việc xử lý đất ô nhiễm các KL độc dễ bay hơi như Se, Hg và As.

Phương pháp bay hơi đã được áp dụng để xử lý ô nhiễm thủy ngân (Hg). Trong môi trường, thủy ngân tồn tại chủ yếu ở dạng Hg^{2+} . Hg^{2+} được thực vật hấp thụ, sau khi vào trong thân được biến đổi thành dạng khí và thoát ra ngoài qua khí khổng. Các loài thực vật như *Arabidopsis thaliana* hoặc *Nicotiana tabacum* là những cây hấp thụ Hg (II) và MeHg từ đất rồi biến đổi thành dạng hơi Hg (0) trong lá và phóng thích ra ngoài không khí.

Sự phóng thích Se vào khí quyển ở thực vật cũng là một cơ chế giải độc Se. Hợp chất Se được phóng thích từ loài *Astragalus racemosus* được xác định là dimethyl diselenide. Sự bay hơi Se trong cây là quá trình đồng hóa Se vô cơ thành các hợp chất hữu cơ chứa Se như seleno-aminoacids, seleno-cysteine, seleno-methionine có thể bị methyl hóa chuyển sang dạng dimethyl diselenide, chất này ở thể hơi có thể thoát ra ngoài không khí. *Brassica juncea* và các cây khác trong họ cải cũng đã được phát hiện có khả năng hấp thụ Se trong đất, chuyển thành dạng khí rồi giải phóng vào không khí (EPA, 2000).

1.2.2.4. Phương pháp cố định độc chất (Phytostabilization)

Phương pháp cố định độc chất chủ yếu được sử dụng cho xử lý đất, trầm tích và bùn (EPA, 2000). Thực vật cố định các chất ô nhiễm trong đất bằng cách hấp phụ chúng lên bề mặt rễ hoặc cố định lại trong vùng rễ, đồng thời sử dụng hệ rễ thực vật để ngăn cản sự di chuyển của chất ô nhiễm dưới tác dụng của gió, xói mòn do nước, thấm sâu và phân tán vào đất. Với phương pháp này, thực vật có nhiều vai trò quan trọng: (1) Làm giảm lượng nước thấm qua đất gây ô nhiễm nước ngầm. (2) Hệ thống thảm thực vật che phủ ngăn ngừa xói mòn đất và ngăn chặn sự phát tán kim loại sang khu vực khác. (3) Làm rào cản ngăn chặn tiếp xúc trực tiếp với đất ô nhiễm theo (Raskin và Ensley, 2000).

Phương pháp cố định độc chất thích hợp xử lý các vùng đất ô nhiễm kim loại do hoạt động khai thác khoáng sản như Pb, As, Cd, Cr, Cu và Zn (EPA, 2000). Hai loại cỏ đã được thương mại hóa sau khi thử nghiệm đồng ruộng ở Liverpool, Anh, cỏ *Agrostis tenuis* xử lý Cu; cỏ *Festuca rubra* xử lý Pb và Zn.

1.3. KHẢ NĂNG HẤP THỤ, TÍCH LŨY, PHÂN BỐ VÀ CHỐNG CHỊU Pb CỦA THỰC VẬT

1.3.1. Khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của thực vật

1.3.1.1. Cơ chế hấp thụ Pb của thực vật

Hầu hết KLN có tính di động thấp trong đất và không dễ dàng bị hấp thụ bởi rễ thực vật. Tuy nhiên, đối với thực vật có khả năng hấp thụ và chống chịu Pb, chúng có cơ chế chuyên biệt để hấp thụ được Pb vào rễ. Rễ thực vật sản sinh ra các proton H^+ , acid hữu cơ, phytochelatin, acid amin và enzyme tạo môi trường acid ở vùng rễ và làm gia tăng tính hòa tan và di động của Pb, do đó tăng sự hấp thụ của rễ. Pb trong dung dịch đất được hấp phụ trên bề mặt rễ, Pb có thể gắn kết vào nhóm cacboxylic của các acid uronic trên vách tế bào hoặc gắn kết trực tiếp với polysaccharide ở bề mặt vách tế bào biểu bì rễ và được hấp thụ vào hệ thống rễ (Pourrut và ctv, 2011). Pb có thể được đưa vào trong rễ nhờ vào sự vận chuyển không chọn lọc của một số kênh hoặc chất vận chuyển khi điện thế âm trên màng của các tế bào biểu bì rễ cao (trên 200 mV). Mặc dù sự hấp thụ Pb ở rễ thực vật chủ yếu là sự hấp thụ thụ động, nhưng tế bào rễ cũng cần có năng lượng để duy trì dòng điện âm này thông qua sự bài tiết các proton H^+ vào môi trường bên ngoài của các bơm $H^+/ATPase$. Điều này đã được chứng minh bởi White và ctv (2012), khi bổ sung chất vanadate (chất ức chế các bơm $H^+/ATPase$) vào rễ của lúa mì và cho cây tiếp xúc với Pb, có sự hạn chế hấp thụ Pb ở rễ xảy ra. Trong số các kênh cation không chọn lọc, các kênh canxi được cho là một trong những tuyến đường chính để đưa Pb vào rễ.

Một số nhóm protein xuyên màng trên màng tế bào biểu bì rễ cũng có vai trò trong vận chuyển Pb. Protein HvCBT1 trong cây lúa mạch; các protein từ AtCNGC1 đến AtCNGC6 trong cây *Arabidopsis thaliana*; và protein NtCBP4

trong cây thuốc lá có vai trò vận chuyển Pb (Pourrut và ctv, 2011). Das và ctv (2012) đã cho biết có sự biểu hiện của gen *BjYSL* mã hóa protein xuyên màng trong cây *Brassica juncea* bị nhiễm Pb cũng có liên quan trong hấp thụ Pb.

1.3.1.3. Thực vật siêu hấp thụ

Một số loài thực vật không chỉ có khả năng sống được trong môi trường ô nhiễm KLN mà còn có khả năng hấp thụ và tích lũy KLN trong các bộ phận của chúng. Henry và ctv (2000) đưa ra khái niệm rằng các loài thực vật có khả năng tích lũy KLN ở mức độ cao hơn 1000 mg/kg chất khô được gọi chung là “thực vật siêu hấp thụ”. Thuật ngữ “thực vật siêu hấp thụ” đầu tiên được sử dụng để chỉ các loại cây có khả năng hấp thụ Ni trong các bộ phận sinh dưỡng với nồng độ lớn hơn 1000 mg/kg trọng lượng khô.

Cho đến nay, có khoảng 750 loài thực vật thuộc 101 họ có khả năng hấp thụ và tích lũy KLN. Khả năng siêu hấp thụ KLN đã được phát hiện ở 450 loài thực vật thuộc 34 họ khác nhau, chiếm 0,2% tổng số loài thực vật đã được biết. Trong số đó, các loài thực vật họ *Brassicaceae* chiếm nhiều nhất, đặc biệt là chi *Alyssum* và *Thlaspi* (Kramer, 2010). Loài siêu tích lũy Zn được phát hiện đầu tiên vào năm 1865 ở loài *Noccaea caerulea* thuộc họ *Brassicaceae*. Loài siêu tích lũy Ni lần đầu tiên được báo cáo vào năm 1948 ở *Alyssum bertolonii* cũng thuộc họ *Brassicaceae*. Siêu tích lũy As đã được phát hiện trong hai loài của *Brassicaceae*. *B. juncea* thuộc họ *Brassicaceae* cũng được phát hiện là siêu tích lũy Pb (Kramer, 2010).

Nhiều công bố cho thấy, có nhiều loài thực vật có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb, trong số này cũng có nhiều loài thực vật là siêu tích lũy Pb (bảng 1.1). Theo số liệu thống kê của Kumar và ctv (2018) về số loài thực vật có khả năng hấp thụ Pb từ năm 2012 đến 2018 cho thấy, số loài thực vật có khả năng siêu hấp thụ Pb là 20 loài (nồng độ trên 1000 mg/kg), trong đó, số loài có khả năng tích lũy Pb trên 1000 mg/kg trong thân lá chiếm 30% (loài siêu tích lũy Pb). Điều này cho thấy, 70% loài khảo sát tích lũy Pb chủ yếu trong bộ phận rễ.

Bảng 1.1. Các loài thực vật có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb
(Hàm lượng Pb > 1000 mg/kg) (Nguồn: Kumar và ctv, 2018)

Tên loài	Rễ (mg/kg)	Thân (mg/kg)	Lá (mg/kg)	Tác giả và năm công bố
<i>Chrysopogon zizanioides</i>	18.500	93	-	Pidatala và ctv, 2018
<i>Brachiaria mutica</i>	8.880	1.290	-	Khan và ctv, 2018
<i>Ricinus communis</i>	49.860	352	-	Khan và ctv, 2018
<i>Coronopus didymus</i>	3.684	863	-	Sidhu và ctv, 2016
<i>Conyza canadensis</i>	6.000	10	30	Li và ctv, 2016
<i>Oryza sativa</i>	5.245	256	-	Chen và ctv, 2016
<i>Iris lactea</i>	5.245	408	-	Yuan và ctv, 2015
<i>pisum sativum</i>	-	-	18.700	Wioleta và ctv, 2015
<i>Dodonaea viscosa</i>	33.759	847	-	Rojas, 2014
<i>Gossypium sp.</i>	14.000	700	350	Bharwana, 2014
<i>Pfaffia glomerata</i>	2.129	46,9	-	Gupta và ctv, 2013
<i>Jatropha curcas</i>	3.900	-	18,2	Vesely và ctv, 2012
<i>Pluchea sagittalis</i>	8.031	1.650	1.400	Rossato và ctv, 2012
<i>Spirodela polyrhiza</i>	19.223	-	-	Qiao và ctv, 2012
<i>Cajanus cajan</i>	4.000	-	-	Nautiyal và Sinha, 2012
<i>Elsholtzia splendens</i>	6.250	460	77	Huang và ctv, 2012
<i>Tritium aestivum</i>	45.184	1.658	381	Zhang và ctv, 2011
<i>Helianthus annuus</i>	67.130	783	-	Strubinska và Hanaka, 2011
<i>Acacia farnesiana</i>	51.928	979	-	Maldonado và ctv, 2011
<i>Sesbania drummondii</i>	58,590	1.268	-	Israr và ctv, 2011

1.3.1.4. Khả năng tích lũy Pb ở thực vật

Nhiều loài thực vật đã được phát hiện có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb cao. *B. juncea* (Mù tạc Ấn độ) có khả năng tích lũy Pb, đã làm giảm nồng độ Pb trong đất từ 2300 xuống còn 420 mg/kg (Kumar và ctv, 2018). Cây củ cải (*Raphanus sativus* L.) có khả năng tích lũy Pb trong các bộ phận rễ, thân và lá. Hàm lượng Pb tích lũy tăng khi nồng độ Pb xử lý tăng 250 ppm, 500 ppm và 750 ppm và khả năng tích lũy Pb theo thứ tự rễ > thân > lá. Hàm lượng Pb tích lũy trong rễ ở nồng độ xử lý 750 ppm cao nhất là 332 mg/kg và tổng hàm lượng Pb tích lũy trong cây là 843 mg/kg (Nadia và ctv, 2012). 2 loài thực vật bản địa *Tagetes minuta* L. và *Bidens pilosa* L. có khả năng tích lũy nồng độ Pb cao trong lá (thứ tự là 380,5 µg/g TLK và 100,6 µg/g TLK). *Sorghum halepense* đã được phát hiện có khả năng tích lũy Pb trong rễ khá cao (1406,8 µg/g TLK) (Salazar, 2014). Hàm lượng Pb tích lũy trong cây của hướng dương (*Helianthus annuus*), đậu castor (*Ricinus communis* L.), *Fagopyrum esculentum* và cỏ vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) lần lượt là 22,8 mg/cây; 45,8 mg/cây; 3,56 mg/cây; và 60,6 mg/cây (nồng độ Pb xử lý 200 mg/l).

Khi khảo sát thực địa về các loài thực vật trên cạn sống ở vùng mỏ Pb Bo Ngam, Thái Lan (nồng độ Pb trong đất bề mặt dao động từ 325 đến 142.400 mg/kg), Rotkittikhun và ctv (2006) đã phát hiện ra 26 loài thực vật có nồng độ Pb > 1000 mg/kg trong chồi của chúng. Trong đó 3 loài (*Microstegium ciliatum*, *Polygala umbonata*, *Spermacoce mauritiana*) có nồng độ Pb cực cao trong chồi (12.200 - 28.370 mg/kg) và rễ (14.580 - 128.830 mg/kg).

Một vài loài thực vật được biết đến là loài siêu tích lũy Pb là *B. juncea*, *B. napus*, *T. alspres*, *T. rotundifolium*, *Alyssum wulfenianum*, *Lemna minor*, *Vallisneria Americana*, *Hydrilla verticillata*, *Salvinia molesta*. *B. juncea* có khả năng loại bỏ 1550 kg Pb trên một mẫu Anh. 1,7 là hệ số phytoextraction của *B. juncea* (Sharma, 2016).

Nhiều loài thực vật thủy sinh cũng có hiệu quả trong việc loại bỏ Pb. Khả năng loại bỏ Pb ra khỏi môi trường nước của rau diếp nước (*Pistia stratiotes*),

Hydrilla verticillata (Hydrilla) và Cỏ ba lá-Duckweed (*Lemnaceae minor*) theo thứ tự là 99,28%, 98%, 90% (Singh, 2012). Lục bình (*Eichhornia crassipes*) có khả năng xử lý Pb trong nước thải công nghiệp và tích lũy Pb cao trong rễ và lá. Nồng độ Pb tích lũy nhiều nhất trong rễ là 438 mg/kg, trong lá là 27 mg/kg và cuống lá là 7 mg/kg. Cây hướng dương (*Helianthus annuus* L.) đã được nhóm nghiên cứu Usha và ctv (2011) thí nghiệm trên nước thải công nghiệp nhiễm Pb ở nồng độ Pb 5, 10, 15, 20, 25 và 30 ppm trong thời gian 1, 2, 3, 4 và 5 tuần. Sự tích lũy Pb cao nhất được tìm thấy trong rễ. Sự tích lũy Pb trong hướng dương ở nồng độ Pb ô nhiễm 15ppm là 37 mg/g ở rễ, 30 mg/g ở lá và 29 mg/g ở thân (Usha và ctv, 2011).

Ở Việt Nam, nhiều loài thực vật cũng đã được phát hiện có khả năng tích lũy Pb. Cây Thơm ổi (*Lantana camara* L.) có thể sống trên đất ô nhiễm Pb từ 1000 - 4000 ppm và hấp thụ Pb trong rễ gấp 470 - 4908 lần so với thực vật thông thường (Diệp Thị Mỹ Hạnh và Garnier Zarli, 2007). Dương xỉ (*Pteris vittata*) có khả năng chống chịu Pb trong đất đến nồng độ 3000 mg/kg đất (Trần Văn Tựa và ctv, 2011). Cây sậy (*Phragmites australis*) hấp thụ được nhiều loại KLN như As, Cd trong đó có Pb. Hàm lượng KLN tích lũy chủ yếu trong rễ và tích lũy trong thân nhiều hơn trong lá. Hàm lượng Pb tích lũy trong rễ của cây sậy là 196,21 mg/kg (Đàm Xuân Vận, 2013). Cây cỏ voi (*Pennisetum purpureum*) có khả năng hấp thụ tốt Pb trong đất, sau 90 ngày thí nghiệm hàm lượng Pb trong đất giảm khoảng 20,50 - 56,67% so với hàm lượng ban đầu là 250 - 1500 mg/kg. Hàm lượng Pb tích lũy trong rễ cỏ voi cao hơn trong thân và lá tương ứng là 31,932 - 198,598 mg/kg trong rễ và 9,385 - 69,833 mg/kg trong thân và lá (Nguyễn Thị Hồng Hạnh và Bùi Thị Thu, 2017).

1.3.2. Khả năng phân bố Pb của thực vật

Khả năng phân bố Pb trong mô thực vật liên quan đến sự di chuyển của Pb từ rễ đến các bộ phận bên trên của cây. Mức độ di chuyển Pb được thể hiện bằng hệ số vận chuyển KLN (Translocation factor) (Bhatti và ctv, 2018). Đây là một trong những chỉ số quan trọng để xác định mức độ di chuyển KLN trong mô thực

vật và được tính là tỷ lệ giữa hàm lượng Pb trong phần trên cây và hàm lượng Pb trong rễ. Thông thường, giá trị khá thấp (< 1) cho Pb (Buscaroli, 2017).

Không giống như hầu hết các KLN khác, Pb ít di chuyển trong hầu hết thực vật. Phần lớn Pb hấp thụ phân bố chủ yếu trong rễ (95%) và chỉ một lượng nhỏ (5%) được chuyển đến các bộ phận trên mặt đất (Zhou và ctv, 2016). Điều này đã được báo cáo ở các loài *Vicia faba*, *Pisum sativum*, và *Phaseolus vulgaris*, *V. unguiculata*, *Lathyrus sativus*, *Zea mays* (Dogan và ctv, 2018) và *Avicennia marina* (Yan và ctv, 2010). Có nhiều yếu tố làm hạn chế sự di chuyển của Pb từ rễ lên thân lá là Pb dễ liên kết với lignin và pectin hoặc liên kết với nhóm carboxylic của acid uronic trong vách tế bào ở rễ (Arias và ctv, 2010) hoặc kết tủa trong các gian bào ở rễ (Malecka và ctv, 2009). Ngoài ra, nội bì cũng là rào cản vật lý ngăn chặn sự di chuyển của Pb (Kaur và ctv, 2012).

Ở phạm vi tế bào, Pb chủ yếu phân bố ở bên ngoài tế bào, sự phân bố của Pb chủ yếu là trong gian bào và liên kết với vách tế bào, đây là đặc điểm chuyên biệt của Pb. Nguyên nhân có thể là do Pb có ái lực cao với các nhóm cacboxyl, lignin, pectin, hemicellulose và cellulose (Krzeslowska, 2011). Sự hấp phụ Pb trên vách tế bào đóng vai trò chủ chốt trong việc hạn chế độc tính của Pb (Krzeslowska, 2011). Vách tế bào đóng một vai trò quan trọng trong giải độc Pb ở tế bào thực vật. Hơn 90% Pb trong rễ ở dạng không hòa tan ở gian bào và liên kết chặt với vách tế bào. Bên trong tế bào, Pb được phân bố trong một số bào quan như không bào và các túi của mạng lưới nội chất (Jiang và Liu, 2010).

1.3.3. Khả năng chống chịu Pb của thực vật

1.3.3.1. Cơ chế làm dày vách tế bào

Sự hấp phụ Pb trên các thành phần tế bào đóng vai trò chủ chốt trong việc hạn chế độc tính của Pb. Khi tế bào thực vật tiếp xúc với Pb, quá trình tổng hợp polysaccharide tăng dẫn đến làm dày lên đáng kể của vách tế bào, làm tăng kích thước của rào cản vật lý được tạo thành bởi vách tế bào và do đó hạn chế sự xâm nhập của Pb qua màng tế bào. Krzeslowska (2011) nhận thấy rằng vách tế bào dày lên là một rào cản vật lý nhằm hạn chế sự xâm nhập của Pb qua màng tế bào

ở *F. hygrometrica protonemata*. Ngoài ra, việc dày lên của vách tế bào cũng sẽ tạo ra các vị trí mới để gắn kết Pb và do đó tăng khả năng cô lập ngoại bào. Thực vật cũng tạo ra các mảng callose trong vách tế bào, được biết đến là không thấm đối với các ion kim loại, ngăn cản các ion kim loại xâm nhập vào trong tế bào.

1.3.3.2 Cơ chế cô lập Pb

a. Cơ chế cô lập Pb trong gian bào

Màng tế bào đóng vai trò quan trọng trong việc bơm Pb từ tế bào chất ra bên ngoài tế bào. Các chất tham gia vào quá trình này thuộc nhóm HMAs (Heavy Metal ATPases) và ABC (ATP binding cassette). Nhóm HMAs sử dụng năng lượng từ sự phân hủy ATP để vận chuyển nhiều ion KLN qua màng tế bào. Việc bơm các ion KLN của HMAs từ tế bào chất ra ngoài vách tế bào hoặc vào không bào phụ thuộc vào gradient điện thế. HMAs được chia 2 nhóm: (1) tham gia vào vận chuyển các ion hóa trị 1 như Cu, Ag; và (2) tham gia vào vận chuyển các cation hóa trị 2 như Zn, Cu, Cd, Pb (Pourrut và ctv, 2014). Nhóm chất mang ABC cũng tham gia vào việc vận chuyển kim loại ra khỏi màng tế bào. Ví dụ: AtBDR8 định vị trên màng tế bào lông hút và tế bào biểu bì của cây *A. Thaliana* giúp tăng cường khả năng chịu KL của cây. AtBDR8 được sinh ra nhiều trong môi trường ô nhiễm Cd và Pb và tham gia vào việc bơm suất ion KL này ra khỏi tế bào chất (Singh và ctv, 2016).

b. Cơ chế cô lập Pb trong không bào

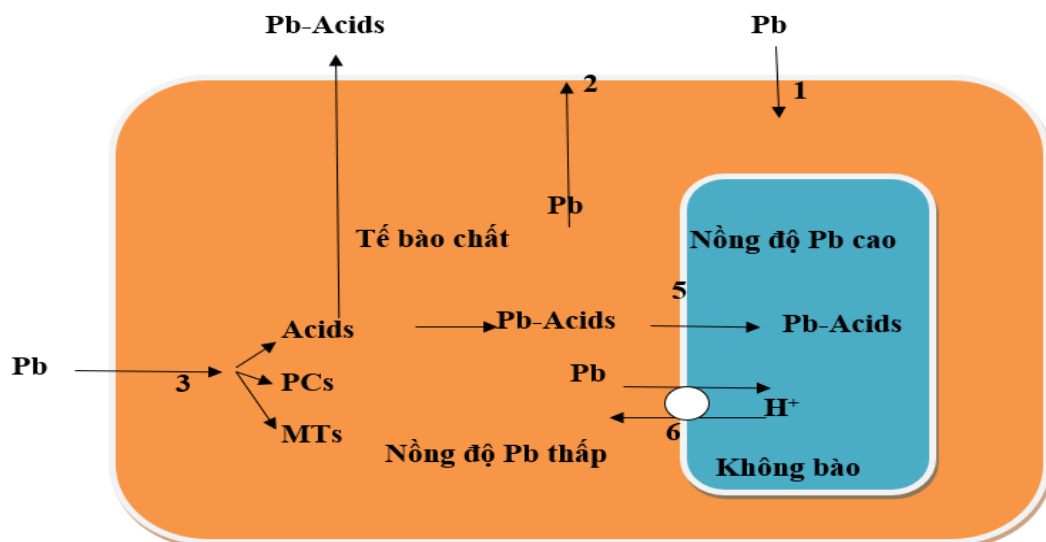
Không bào được xem là nơi tồn trữ thích hợp khi KLN tích lũy cao trong tế bào. Cây *Pisum sativum* siêu tích lũy Pb đã giữ khoảng 90% lượng Pb trong không bào của tế bào. Cây *Pluchea sagittalis* giữ khoảng 20% lượng Pb trong không bào (Rossato và ctv, 2012).

Nhiều protein vận chuyển đã được xác định là các thành phần quan trọng liên quan đến cơ chế vận chuyển KL vào trong không bào ở sinh vật. Protein CDF, ZRT/IRT (ZIP) hoặc các protein đại thực bào NRAMPs có khả năng vận chuyển Cu, Zn, Cd, Mn và Pb. Một ATPase loại P ở *Arabidopsis*, HMA3, được phát hiện có vai trò làm tăng tính chống chịu Pb bằng cách cô lập Pb vào trong

không bào. HMA4, một loại ATPase loại P khác có ở *Nocca caerulescens* cũng có vai trò trong vận chuyển Pb vào trong không bào (Singh và ctv, 2016).

Cơ chế cô lập Pb có liên quan đến các protein gắn kết với KL. Sự gắn kết KLN trong tế bào chất bởi các protein ái lực cao là một cơ chế rất quan trọng trong việc khử độc KLN và chống chịu trong điều kiện stress của thực vật. Thực vật tạo ra 2 loại protein gắn kết KL: phytochelatins (PCs) và metallothioneins (MTs) (hình 1.1). Pb kích thích việc sản sinh ra các phytochelatin (PCs) và tăng cường hoạt động tổng hợp PCs. PCs cô lập Pb hòa tan trong tế bào chất trước khi được vận chuyển vào không bào (Singh và ctv, 2016). PCs được tạo ra trong các tế bào và các mô khi thực vật tiếp xúc với các ion KL như Cd, Hg, Ag, Cu, Ni, Au, Pb, As, và Zn (Mohammad và ctv, 2012). MTs cũng được biết với nhiều vai trò như tham gia duy trì nội cân bằng của quá trình trao đổi KLN cần thiết, cô lập KLN gây độc, và bảo vệ tế bào chống lại sự phá hủy do oxy hóa nội bào (Pourrut và ctv, 2014). Pb có thể được cô lập bởi metallothioneins, những MTs này đóng vai trò cơ bản trong giải độc KL ở động vật (MTs) (Singh và ctv, 2016).

Cơ chế chống chịu Pb ở thực vật được tóm tắt theo hình 1.1.



Hình 1.2. Cơ chế chống chịu Pb ở thực vật bậc cao (Mohammad và ctv, 2012)

(1): Pb được hấp thụ ở vị trí trao đổi cation của vách tế bào; (2): Pb được bơm ra khỏi tế bào bởi HMA hoặc ABC; (3): Trong tế bào chất, Pb được gắn kết bởi các

axit hữu cơ, PCs và MTs; (4): Các acid hữu cơ được tiết vào trong vùng rễ và gắn kết với Pb ở đó, làm giảm khả năng hấp thụ Pb; (5): Pb được lưu trữ chủ yếu trong không bào khi phức hợp với PCs hoặc MTs hoặc acid hữu cơ; (6): Pb được bơm vào trong không bào bằng HMA, làm giảm nồng độ của chúng trong tế bào chất.

1.3.3.3 Cơ chế chống oxy hóa

Mặc dù Pb có tác động gây độc cho thực vật, nhưng nhiều loài thực vật có một loạt các chiến lược thích ứng để kiểm soát các biểu hiện độc hại gây ra do Pb. Hệ thống kiểm soát này có liên quan đến hệ thống chống oxy hóa, giúp thực vật đối phó với stress oxy hóa gây ra bởi Pb.

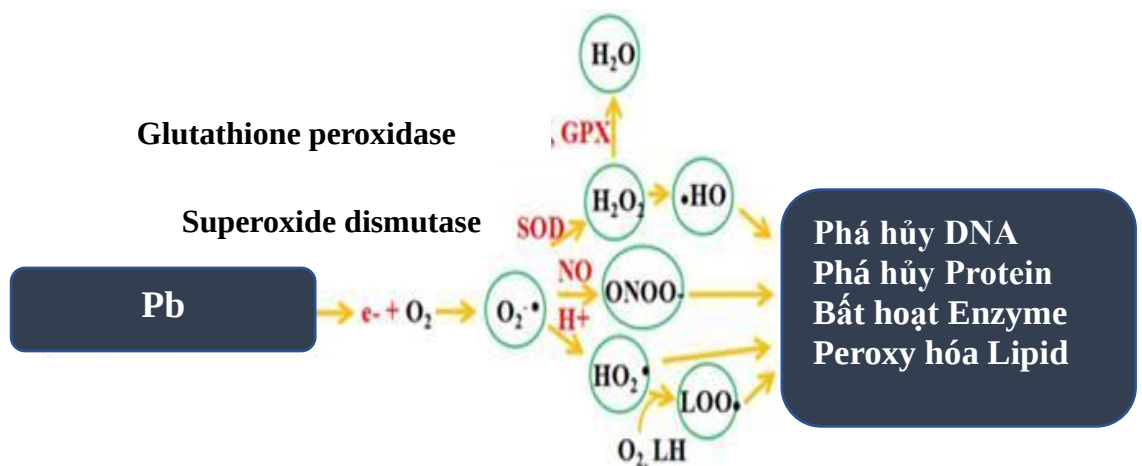
Để hạn chế thiệt hại do ROS gây ra, thực vật đã có các cơ chế chống oxy hóa hiệu quả giúp chúng kiểm soát, điều chỉnh hàm lượng ROS phù hợp. Cơ chế chống oxy hóa có sự tham gia của nhiều enzym chủ chốt có liên quan trực tiếp đến việc làm giảm các gốc tự do gồm superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), POD (peroxidase), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX) và glutathione S-transferase (GST) (Khan và ctv, 2018). Các enzyme này nằm trong hệ thống của tế bào nhằm kiểm soát ROS, đáp ứng và đối phó với tác nhân gây hại từ môi trường và đảm bảo sự sống của cơ thể. Các enzyme này vừa duy trì sinh tổng hợp ROS để đảm bảo con đường tín hiệu trong tế bào đồng thời cũng kiểm soát, giảm độc tính của ROS đối với các yếu tố cấu trúc và quá trình sống diễn ra bên trong tế bào.

Superoxide dismutase (SOD) được phát hiện là đối tượng chống oxy hóa và phòng thủ đầu tiên khi có dấu hiệu stress oxy hóa. SOD được xem là chất chống oxy chính trong giải độc và phòng thủ tác động của KLN. SOD đóng một vai trò quan trọng trong việc giải độc ROS bằng cách điều hoà gốc anion dioxide ($O_2^{\cdot-}$), ngăn chặn sự tích tụ của các gốc $O_2^{\cdot-}$ và tạo thành H_2O_2 và O_2 (hình 1.2). Trong điều kiện stress, superoxide dismutase (SOD) là hàng rào bảo vệ đầu tiên chống lại tác hại do bùng nổ ROS. Gen SOD được mã hóa từ sớm, có mặt 6 - 24 giờ sau bùng nổ ROS. SOD có hoạt tính càng cao thì $O_2^{\cdot-}$ có hoạt tính càng nhỏ. SOD được chia làm 3 nhóm dựa vào ion KL là cofactor gắn vào vùng trung tâm

hoạt động của enzyme: Mn-SOD thường tìm thấy ở ty thể, Fe-SOD có mặt ở lục lạp, và Cu/Zn-SOD có mặt ở lục lạp, tế bào chất và peroxisome (Mittler, 2002).

Glutathione peroxidase (GPX) là một trong những enzyme quan trọng loại bỏ H_2O_2 dư thừa trong quá trình trao đổi chất cũng như trong quá trình stress do môi trường, đặc biệt là lượng H_2O_2 hình thành do quá trình khử $\text{O}_2^{\bullet-}$ của SOD (hình 1.2). GPX có vai trò phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 . GPX được hoạt hoá trong tế bào (tế bào chất, không bào), trong thành tế bào và cả bên ngoài tế bào. Khác với giải độc, GPX còn có vai trò phòng thủ bằng cách phát ra tín hiệu H_2O_2 trong tế bào thực vật để tế bào kịp thời ứng phó (Das và ctv, 2012).

Ascorbate peroxidase (APX) là một enzyme thu dọn H_2O_2 khác và là một trong những enzyme quan trọng của chu trình Halliwell-Asada, xúc tác khử H_2O_2 thành H_2O với sự hiện diện của ascorbate. APX xúc tác sự tương tác của ascorbate với H_2O_2 , làm thay đổi ascorbate thành monodehydroascorbate (MDHA). Việc chuyển đổi ngược lại MDHA thành ascorbate được xúc tác thông qua trung gian bởi monodehydroascorbate reductase (MDHAR) trong sự hiện diện của NADPH. Enzyme MDHAR có chức năng duy trì nồng độ ascorbate trong tế bào khi nồng độ ascorbate giảm do tham gia giải độc ROS và điều chỉnh tiềm năng oxy hóa khử tế bào (Potters và ctv, 2010).



Hình 1.1. Hoạt động của chất chống oxy hóa SOD, GPX (Jalmi và ctv, 2018)

Glutathione là một trong những protein chiếm số lượng nhiều nhất trong tế bào, giúp duy trì tình trạng oxy hóa khử trong tế bào và thu nhận ROS. Glutathione thường tồn tại ở dạng khử là GSH. Trong tế bào thực vật, glutathione hoạt động như một chất chống oxy hóa phòng thủ và là chất gắn kết với KL chịu trách nhiệm chính cho việc giải độc KL (Jalmi và ctv, 2018). Enzyme có vai trò chính trong việc xúc tác sự gắn kết giữa GSH và KL là **glutathione S-transferase (GST)**. GST cũng có vai trò xúc tác sự vận chuyển phức hợp GSH-KL đến không bào. Liên hợp KL và glutathione được vận chuyển nhanh chóng từ dịch tế bào vào không bào để tiếp tục xử lý. Glutathione S-transferase (GST) là enzyme nằm trong tế bào chất, được mã hóa bởi nhiều gen khác nhau, thực hiện bước cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp anthocyanin, gắn nhãn tiền chất anthocyanin là cyanidin-3-glycoside với glutathione, cho phép nhận diện và nhắm mục tiêu của anthocyanin tới không bào (Pourrut và ctv, 2014). Kumar và Prasad (2014) đã báo cáo rằng, xử lý Pb ở nồng độ 414 mg/ L trong 7 ngày làm tăng đáng kể hoạt động của GST (92%) ở rễ *Talinum triangulare* so với cây được trồng không xử lý Pb.

Hoạt động của các enzyme chống oxy hóa đã được nhiều nghiên cứu khảo sát cho thấy có liên quan đến giải độc và phòng thủ Pb. Nồng độ enzyme CAT và SOD trong lúa mì đã tăng trong điều kiện stress Pb (Kaur và ctv, 2012). Sự thay đổi nồng độ của các enzyme CAT và SOD có liên quan đến việc loại bỏ, giải độc ROS và cải thiện tình trạng stress oxy hóa. Sự biến động rất lớn về nồng độ của SOD (225% và 136%), CAT (44% và 30%), APX (1300% và 233%) và GPX (230% và 60%) đã được báo cáo trong cây *C. didymus* xử lý Pb và cây đối chứng (Sidhu và ctv, 2016). Trong *L. minor*, sự tăng dần hoạt động của enzyme CAT đã được ghi nhận khi tăng dần nồng độ Pb (0, 1, 2, 4, 6 và 8 mg/l), trong đó hoạt động tăng tối đa là 460% được quan sát thấy tại 8 mg/l Pb so với đối chứng (Shahid và ctv, 2011). Tương tự, sự gia tăng hoạt động APX do tác động của Pb cũng được quan sát thấy ở các loài thực vật khác nhau như trong rễ cây đậu, *Wolffia cholhiza* và *Pluchea sagittalis* (Hasanuzzaman và ctv, 2020).

1.3.3.4. Cơ chế dẫn truyền tín hiệu trong chống chịu Pb của thực vật

Để đối phó với các tác động của stress môi trường như KLN, thực vật đã có nhiều phản ứng ở dạng cơ chế sinh hóa và phân tử hiệu quả trong tiếp nhận, đáp ứng và thích nghi. Các phản ứng này được kích thích bởi hệ thống dẫn truyền tín hiệu diễn ra trong tế bào thực vật. Kết quả đáp ứng tín hiệu của thực vật được thể hiện bằng sự biểu hiện gen tổng hợp các protein vận chuyển KL và protein liên kết KL giúp thực vật chống lại stress KLN quá mức (Peng và ctv, 2018).

Trong số các loại stress phi sinh học, stress KLN có ảnh hưởng sâu sắc đến con đường tín hiệu mitogen-activated protein kinase (MAPKs). MAPKs được kích hoạt bởi sự nhận biết của ligand KL chuyên biệt và các phân tử ROS được sản sinh ra trong điều kiện stress KLN. Sự tiếp xúc với KLN như Cd, Cu, Pb và As đã làm kích hoạt MAPKs. Ở *Arabidopsis*, 2 loại MAPKs là MPK3 và MPK6 được kích hoạt bởi Cd và Cu. Tương tự ở *Alfalfa*, 4 loại MAPKs như SIMK, MMK2, MMK3 và SAMK cũng đã được kích hoạt bởi Cu và Cd. Stress Pb làm kích hoạt 4 MAPKs là MAPK7, MAPK6, MAPK18 và MAPK20 trong cây củ cải (Rao và ctv, 2011).

1.3.4. Ảnh hưởng của Pb đến thực vật

1.3.4.1. Pb gây ra stress oxy hóa

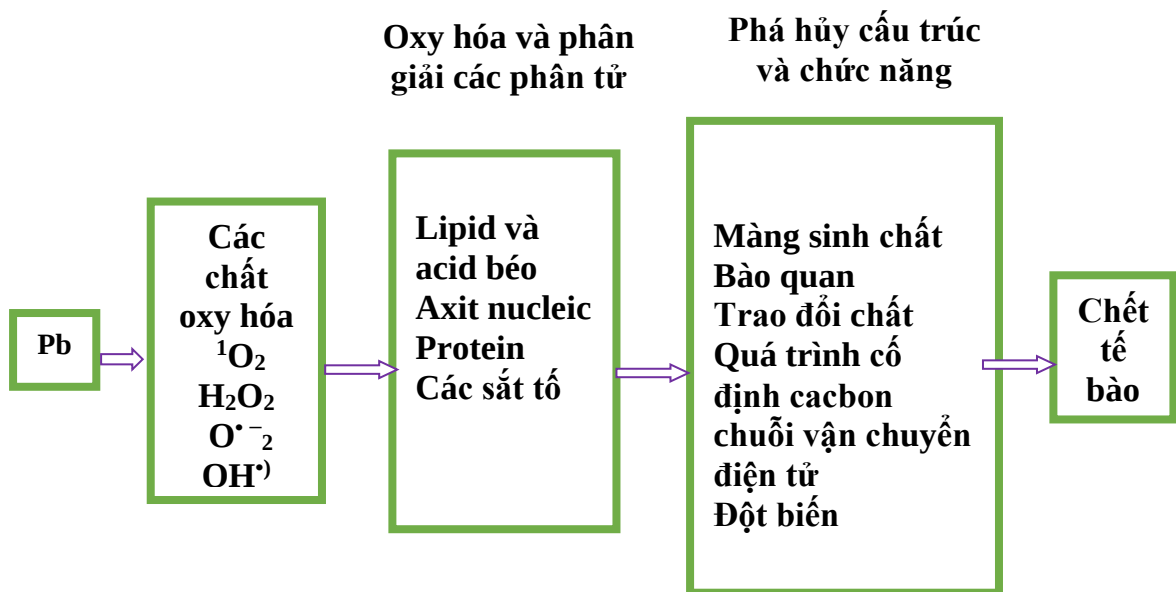
Việc sản sinh các chất oxy hóa (reactive oxygen species/ROS) trong tế bào của sinh vật hiếu khí được định nghĩa là stress oxy hóa, là một đặc điểm đặc trưng cho việc gây độc của các KLN, trong đó có Pb. Ở thực vật, lượng lớn ROS được tạo ra và kết quả là gây ra stress oxy hóa, là một trong những khía cạnh được biết đến sớm nhất và nhiều nhất của độc tính Pb. Trong điều kiện bình thường, ROS cũng được tạo ra nhưng ở mức độ thấp và sẽ bị các cơ chế chống oxy hóa tiêu hủy, nên chúng không gây hại cho thực vật. Khi có sự xâm nhập của Pb vào trong cây, sự cân bằng giữa sản sinh ROS và tiêu hủy ROS bị xáo trộn, làm bùng nổ ROS và gây hại cho cây (Miller và ctv, 2010). Hoạt động của Pb không trực tiếp gây oxy hóa - khử mà làm thay đổi sự cân bằng oxy hóa - khử thông qua các cơ chế gián tiếp khác nhau như thay thế các cation thiết yếu trong các phân tử sinh học tế bào,

thay đổi hoạt động của enzyme có chứa KL, gia tăng sự tạo ra ROS. ROS chủ yếu gồm $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , $\text{O}^{\bullet -}_2$ và $\text{OH}^{\bullet}$ và sự tiếp xúc Pb làm tăng sản sinh H_2O_2 và $\text{O}^{\bullet -}_2$ và ROS được tạo ra ở các vị trí khác nhau trong tế bào như lập thể, ti thể, mạng lưới nội chất và peroxisome (Hasanuzzaman và ctv, 2020). Trong tế bào, lục lạp và ty thể là các bào quan sản sinh ROS nhiều nhất do sự hiện diện của hệ thống vận chuyển điện tử. Bất kỳ sự thay đổi trong phản ứng chuỗi vận chuyển điện tử ở các bào quan này có thể dẫn đến sản sinh ROS (Hasanuzzaman và ctv, 2020). Những phát hiện gần đây cũng cho biết, gian bào cũng là nơi sản sinh ra ROS. Ví dụ, một số nghiên cứu đã cho biết rằng, tăng nồng độ xử lý Pb có tác động tiêu cực đến tốc độ vận chuyển điện tử của hệ thống quang hóa ở các loài thực vật trên cạn khác nhau như *Lactuca sativa*, *Anthyllis Vularia* (Piwowarczyk và ctv, 2018) và *Talinum triangulare* (Kumar và Prasad, 2018).

Khi ROS được sinh ra trong tế bào, chúng có thể nhanh chóng tấn công và oxy hóa tất cả các loại phân tử sinh học, chẳng hạn như chlorophyll, acid nucleic, protein và lipid, dẫn đến gây rối loạn chức năng trao đổi chất không thể khắc phục được và gây chết tế bào (hình 1.3). Lipid là một thành phần chính của màng plasma, bao bọc tế bào và giúp nó thích nghi với những thay đổi của môi trường. Tuy nhiên, trong điều kiện nhiễm độc Pb, khi nồng độ ROS tăng cao sẽ dẫn đến phản ứng peroxid hóa lipid, lipid sẽ bị tổn hại (Kumar và Prasad, 2018). Peroxid hóa lipid thường được coi là một dấu hiệu sinh hóa đối với những căng thẳng qua trung gian ROS. Phân tử ROS có thể gây ra sự thay đổi cấu trúc và chức năng của màng tế bào bằng cách tấn công các acid béo không bão hòa của lipid trên màng tế bào, do đó, gây ra một phản ứng dây chuyền được gọi là peroxid hóa lipid. Các nghiên cứu khác cũng báo cáo rằng, tăng nồng độ Pb trong môi trường đã gây ra sự gia tăng mức độ peroxid lipid trong các bộ phận khác nhau của các loài thực vật khác nhau như *M. sativa*, *Talinum triangulare* (Kumar và ctv, 2014) và *Pluchea sagittalis* (Rossato và ctv, 2012).

ROS cũng có thể gây ra quá trình oxy hóa protein, gây biến đổi các amino acid như arginine, lysine, proline, threonine, và tryptophan, và nhạy cảm với sự

phân hủy protein (Kumar và Prasad, 2018). Ở thực vật, DNA được bảo vệ rất tốt bởi các histone và các protein khác. Tuy nhiên, khi bị ROS tấn công, cả DNA trong nhân, DNA ty thể và DNA lục thể đều chịu sự tác động có hại do thiếu histone bảo vệ. Thiệt hại do oxy hóa DNA của ROS xảy ra ở nhiều cấp độ bao gồm quá trình oxy hóa deoxyribose, biến đổi nucleotide, phá vỡ chuỗi DNA và gây liên kết chéo giữa DNA và protein (Halliwell, 2006).



Hình 1.3. Sự tác động của Pb đối với tế bào thực vật

b. Ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển

Một nghiên cứu thực hiện khảo sát sự ảnh hưởng của Pb ở các nồng độ 0; 3,31 và 33,1 ppm trên loài thực vật *Medicago sativa* cho thấy, tác động của Pb ở nồng độ 33,1 ppm làm giảm nhiều nhất sinh trưởng cây như sinh khối tươi của chồi (41%), sinh khối tươi của rễ (48%), chiều dài chồi (44%) và chiều dài rễ (31%) sau 7 ngày xử lý, nồng độ Pb càng tăng càng ảnh hưởng đến tăng trưởng của cây (Chen và ctv, 2016). Nồng độ Pb càng tăng (0, 100, 200, 300, 400 và 500 mg /L) thì càng có tác động ức chế sự sinh trưởng và phát triển của cây *Acalypha indica*, chỉ số chống chịu về tăng trưởng của *Acalypha indica* giảm từ 24 - 49% đối với chiều cao chồi, 18 - 50% đối với chiều dài rễ, 12 - 68% đối với sinh khối tươi và 11- 45% đối với sinh khối khô của cây trong thời gian tiếp xúc với Pb (Venkatachalam và ctv, 2017). Ngoài ra, sự giảm sinh khối tươi của cây

cũng đã được báo cáo ở thực vật *B. napus* và *Salzburg grandiflora*. Ngoài các thông số này, chiều cao cây, năng suất, diện tích lá, số lượng, chiều dài và chiều rộng của lá, tốc độ ra chồi và hiệu quả ra rễ cũng là những thông số chính khác bị ảnh hưởng bởi độc tính của Pb (Piwowarczyk và ctv, 2018). Một nghiên cứu về tác động của Pb đến năng suất của 2 giống lúa canh tác Guixiangzhan và Nongxiang đã cho biết rằng, khi tiếp xúc Pb ở 4 nồng độ (0, 400, 800 và 1200 mg/ kg) cả 2 giống lúa bị ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất.

c. Ảnh hưởng đến hàm lượng nước trong cây

Pb có tác động làm giảm quá trình thoát hơi nước ở cây cũng như làm giảm hàm lượng hơi nước đọng trên lá. Việc giảm quá trình thoát hơi nước ở cây có thể là do giảm diện tích bề mặt lá do tăng trưởng ở lá giảm. Pb làm giảm tính mềm dẻo của vách tế bào, và vì vậy ảnh hưởng đến áp suất trương nước của tế bào, giảm nồng độ phân tử điều khiển sức trương tế bào như đường và các acid amin. Sự hiện diện của các ion Pb^{2+} làm tích lũy lượng lớn acid abscisic trong rễ và các bộ phận bên trên làm đóng khí khổng (Pourrut và ctv, 2014).

d. Ảnh hưởng đến quang hợp

Ảnh hưởng của Pb đến quang hợp đã được nghiên cứu nhiều hơn so với các ảnh hưởng khác. Việc ức chế quang hợp là một triệu chứng được biết rất rõ của độc tính Pb. Pb làm giảm hoạt động của enzyme ferredoxin NADP⁺ reductase nên làm giảm sự tổng hợp chlorophyll (Chl) (Pourrut và ctv, 2014). Pb làm gia tăng hoạt động của chlorophyllase gây phá hủy Chl. Các triệu chứng cơ bản và rõ ràng nhất do độc tính Pb gây ra là giảm màu xanh của lá, lá cằn cỗi, giảm quang hợp. Sự hiện diện của Pb trong mô lá làm ảnh hưởng đến Chl a nghiêm trọng hơn Chl b. Ngoài ra, các sắc tố như carotenoid cũng có thể bị ảnh hưởng bởi Pb (Chen và ctv, 2016). Trong hai nghiên cứu trên 2 loài thực vật khác nhau, Pb ở nồng độ 166 ppm đã tác động tiêu cực đối với Chl a, Chl b, tổng Chl và hàm lượng carotenoid trong lá cây bông vải (lần lượt là 53%, 74%, 46% và 13%) và trong lá ryegrass (lần lượt là 44%, 28%, 51% và 41%) (Khan và ctv, 2018).

Ngoài hàm lượng sắc tố, sự biến dạng của cấu trúc lục lạp, sự mất cân bằng trong plastoquinone và vận chuyển điện tử là phản ứng gây độc chính khác của stress Pb. Những tác động này có thể gây ra sự thay đổi hoặc giảm tốc độ quang hợp (Lopez-Orenes và ctv, 2018). Phân tích cấu trúc hiển vi tế bào của *Anthyllis Vularia*, Piwowarczyk đã phát hiện có sự khác biệt giữa các lục lạp trong lá được trồng trong môi trường xử lý Pb ở các nồng độ khác nhau (0, 166, 331 và 497 ppm), số lượng và kích thước của lục lạp và hạt grana giảm, sự sắp xếp của màng thylakoid nhẵn hơn ở những cây xử lý 331 và 497 ppm, trong khi Pb ở mức 0 và 166 ppm không có ảnh hưởng đáng kể đến các thông số này (Piwowarczyk và ctv, 2018).

e. Ảnh hưởng đến hô hấp

Nghiên cứu của Romanowska và ctv (2006) đã chứng minh rằng Pb có tác động đến màng ty thể, làm gián đoạn việc vận chuyển điện tử và vì vậy phá vỡ quá trình phosphoryl hóa. Tốc độ hô hấp ở thực vật tăng lên 20 - 50% ở lá của thực vật C3 (*P. sativum* và *H. vulgare*) và thực vật C4 (*Z. mays*) khi tiếp xúc với 5 mM $Pb(NO_3)_2$ trong 24 giờ và các chất gồm glyxin, succinate và malate được phân lập từ lá *P. sativum* bị xử lý chỉ cho thấy bị oxy hóa trong ty thể nhiều hơn so với đối chứng (Romanowska và ctv, 2006).

f. Phá hủy DNA, gây độc gen và ảnh hưởng đến di truyền

Các yếu tố gây thiệt hại cho vật chất di truyền trong nhân và ngoài nhân của tế bào, chẳng hạn như DNA, được coi là tác nhân gây độc hoặc đột biến gen. Pb thường ảnh hưởng có hại như gây hại cytoskeleton, nhân, phá vỡ chuỗi DNA, hình thành các nhân nhỏ bất thường nhiễm sắc thể, và phá hủy vi ống (Kumar và ctv, 2018). Pb trực tiếp hoặc gián tiếp, thông qua sản xuất ROS, phá vỡ chức năng của nhiều phân tử tế bào bao gồm RNA và DNA. Sự tác động của ROS vào DNA có thể làm phá hủy hoặc thay đổi các base dẫn đến phá hủy sợi đôi DNA. Quá trình này có liên quan đến việc thêm $\cdot OH$ vào các liên kết đôi và loại bỏ nguyên tử hydro từ deoxyribose. Việc loại bỏ này có thể làm tăng các gốc deoxyribose phản ứng dẫn đến dễ phá vỡ chuỗi DNA (Kumar và Majeti, 2014).

Sự gây hại và phá vỡ sợi DNA có thể gây hậu quả nghiêm trọng cho quá trình chuyển hóa trong tế bào như ức chế quá trình sao mã và làm sai lệch trong sửa chữa DNA. Sự ức chế quá trình sinh tổng hợp DNA làm rối loạn các chu kỳ trong phân bào của Pb đã được phát hiện ở *V. mungo* khi tiếp xúc với Pb nồng độ 6,6 mg/ L và điều đó có thể dẫn đến giảm độ dài rễ (Chen và ctv, 2016).

Theo Shahid và ctv (2011), Pb gây ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình phân bào ở tế bào, làm giảm hoạt động phân bào trong các tế bào rễ của *Allium cepa*. Trong rễ của cây *V. faba*, Pb có tác động làm rút ngắn giai đoạn phân bào và kéo dài giai đoạn gian kỳ, do đó kéo dài chu kỳ tế bào. Giai đoạn đầu tiên Pb gây độc cho thực vật là sự gắn kết của ion Pb^{2+} lên màng tế bào và vách tế bào làm cho chúng trở nên cứng hơn nên làm giảm phân chia tế bào. Giai đoạn thứ hai là sự phá vỡ các vi ống. Sự tác động của Pb gây rối loạn trong giai đoạn G2 và M trong quá trình phân bào dẫn đến sản sinh các tế bào bất thường.

1.4 Giới thiệu cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)

1.4.1 Phân loại thực vật và nguồn gốc phân bố

Giới: Plantae

Ngành: Tracheophyta

Lớp: Angiospermae

Bộ: Asparagales

Họ: *Asparagaceae*

Chi: *Dracaena*

Loài: *Dracaena sanderiana*



Hình 1.4. Đặc điểm hình thái cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)

Chi Huyết giác (*Dracaena*) là chi có số loài khá phong phú, gồm khoảng 150 loài cây thân gỗ hoặc thân bụi. Các loài trong chi *Dracaena* được chia thành 2 nhóm: Nhóm các loài thuộc cây thân gỗ với thân mập mạp và cứng, lá rộng dạng bản; Nhóm các loài thuộc cây thân bụi với thân mảnh dẻ hơn và lá mềm dẻo.

Dracaena sanderiana là một loài thực vật có hoa trong họ *Asparagaceae*, bộ Măng tây (*Asparagales*), lớp thực vật 1 lá mầm, có nguồn gốc từ Trung Phi

(Deman, 2018). Loài cây này thường được bán trên thị trường có tên là “**cây Phát tài**”. Cây Phát tài còn có tên gọi khác là Phát dụ xanh, Phát lộc, Phát tài quan âm, hoặc Thiết mộc lan. Cây Phát tài phân bố rộng khắp ở Việt Nam, được người dân trồng trong nhà với ý nghĩa mang lại sự may mắn và tài lộc.

1.4.2. Đặc điểm hình thái, sinh thái và sinh sản của Phát tài

Phát tài thuộc loại cây thân bụi, cao khoảng 1m, đường kính 2 - 3cm, thân mềm. Thân cây gồm các đốt ngắn 10 - 15 cm đều nhau có màu xanh trắng. Cây Phát tài có rễ chùm, ngắn, màu trắng. Lá cây thuôn hình giáo dài 10 - 20 cm, màu xanh bóng, mềm, đầu lá thuôn nhọn, gốc lá kéo dài thành bẹ mỏng ôm thân. Lá thường mọc tập trung ở đỉnh thân, và toả tròn đều. Cây có thể sống tốt ở cả môi trường đất và nước. Trong đất, cây có thể sống rất lâu và trong nước cây có thể sống từ 4 - 5 năm.

Phát tài có tốc độ sinh trưởng chậm, thuộc nhóm cây ưa bóng, nhiệt độ thích hợp cho sự tăng trưởng và phát triển nhất là 21 - 27 °C. Đặc điểm sinh sản của cây là nhân giống từ giâm cành, mọc khỏe, chồi mọc từ cành hay thân cây mọc rất khỏe, tốt, rất dễ mọc đâm chồi rất nhiều từ mắt cắt của cành. Cây đẻ nhánh mạnh. (Nguyễn Thị Hà, 2010).

1.4.3. Đặc tính đặc biệt của cây Phát tài

Những nghiên cứu về khả năng xử lý ô nhiễm môi trường của cây Phát tài được phát hiện những năm gần đây. Nghiên cứu đầu tiên tại Trường đại học Mahidol (Thái Lan) xử lý bisphenol A trong nước rỉ rác bằng cây Phát tài. Nghiên cứu được tiến hành ở nhiều nồng độ pha loãng nước rỉ rác khác nhau 10, 20, 30, 40, 60, 80 và 100% và thời gian tiếp xúc trong môi trường nước là 0, 4, 8, 12, 16 và 20 ngày. Kết quả cho thấy, hàm lượng bisphenol A giảm nhanh chóng từ 20 µg xuống 9,17 µg trong 4 ngày và giảm xuống 4,7 µg trong ngày thứ 8 và những ngày sau giảm không đáng kể (Nguyễn Thị Hà, 2010).

Cây Phát tài có khả năng xử lý nhiều KLN Cu, Cr, Ni trong bùn thải từ các gara xe. Hàm lượng Cu tích lũy trong cây sau 3 tháng thí nghiệm đều tăng so với ban đầu. Ở môi trường 100%, 70%, 50% bùn thải, hàm lượng Cu trong cây

tương ứng là 20,76 mg/kg, 31,58 mg/kg và 30,08 mg/kg (tăng tương ứng là 3,83; 5,86 và 5,56 lần). Khả năng tích lũy Cr của cây Phát tài cũng tương đối cao, hàm lượng Cr trong cây ở môi trường 100%, 70% và 50% bùn thải lần lượt là 8,26 mg/kg (tăng 1,74 lần), 11,27 mg/kg (tăng 2,74 lần), 10,06 mg/kg (tăng 2,11 lần so với ban đầu). Đối với Ni, Phát tài khi trồng trong môi trường 100%, 70% và 50% bùn thải thì hàm lượng Ni trong cây lần lượt là 6,72 mg/kg (tăng 2,39 lần), 9,75 ppm (tăng 3,94 lần), 9,67 mg/kg (tăng 3,44 lần) (Nguyễn Duy Duy, 2011).

Kết quả nghiên cứu khả năng hấp thụ Hg và Cd của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) trên dung dịch nhiễm Hg và Cd của Sereshi và ctv (2014) cho thấy khả năng hấp thụ Hg xấp xỉ bằng 10,32 mg/kg và Cd là 30,90 mg/kg. Hàm lượng Hg và Cd trong cây tăng tỷ lệ thuận với nồng độ KL. Cây Phát tài trồng ở nồng độ Hg và Cd cao với thời gian càng dài thì lượng KL tích lũy được càng lớn.

Nghiên cứu của Ten Yi Hao (2011) khi sử dụng cây Phát tài xử lý nước thải nhiễm Cu và Cr (IV) bằng công nghệ đất ngập nước cho thấy, sau 14 ngày thí nghiệm, cây Phát tài không những có thể sinh trưởng, phát triển rất tốt mà còn có khả năng hấp thụ Cu và Cr rất cao. Hiệu suất hấp thụ Cu là 72% và Cr là 67%. Tổng lượng Cu hấp thụ trung bình là 300,1 mg/kg và Cr là 382,2 mg/kg.

Treesubsuntorn và ctv (2012) đã chứng minh rằng cây Phát tài có tiềm năng rất lớn trong việc vận chuyển và đào thải benzen ra khỏi môi trường thông qua lá. Sự thay đổi hoạt động của khí khổng theo thời gian và điều kiện xử lý benzen được cho là nhân tố chính giúp cho cây tích lũy được benzen trong vào bên trong lá, đồng thời loại benzen ra khỏi môi trường. Hoạt động của các gen liên quan đến cơ chế đóng mở khí khổng được cho rằng có ảnh hưởng đến khả năng này.

1.5. Gen, sự biểu hiện gen liên quan đến chống chịu Pb ở thực vật và kỹ thuật phân tử nghiên cứu biểu hiện gen

1.5.1 Các gen có liên quan đến chống chịu Pb ở thực vật

Trong *Arabidopsis*, 3 thành viên của ABC (ATPase-binding cassette) là AtATM3, AtPDR12 và AtPDR8 đã được phát hiện là các transporters làm tăng tính chống chịu Pb. Gen *CNGC1* ở *Arabidopsis* đã được báo cáo có liên quan

đến ABC, vì có vai trò tham gia và chịu trách nhiệm trong việc vận chuyển Pb từ môi trường vào trong tế bào thực vật (Singh và ctv, 2016).

ACBP1, một protein liên kết acyl-CoA đã được tìm thấy có liên quan đến tính chống chịu Pb bằng cách tích lũy Pb trong lá và phiên mã AtMRP3 cũng đã thể hiện cảm ứng mạnh mẽ trong xử lý Pb trong *A. Thaliana*. Cây *A. thaliana* khi trồng trên môi trường đất nhiễm Pb (II) đã phát hiện một họ gồm 6 gen mã hóa các protein liên kết este với chuỗi dài acyl-CoA gọi tắt là ACBPs (acyl-CoA-binding proteins) có liên quan đến tính chống chịu Pb (Zientara và ctv, 2009).

Trong nghiên cứu về vai trò của gen *PSE1* liên quan đến khả năng chống chịu Pb trong cây *Arabidopsis*, Chen và ctv (2016) đã chứng minh rằng gen *PSE1* liên quan đến sự tích lũy Pb trong cây. Pb kích hoạt nhanh chóng gen *PSE1*. *PSE1* kích hoạt sự biểu hiện của các gen gồm *GSH1*, *GSH2*, *PCS1*, *PCS2*, *GR1* và *GR2* liên quan đến sự tổng hợp PCs thông qua GSH. Ngoài ra sự biểu hiện của gen *PSE1* cũng gây ra sự biểu hiện gen tổng hợp PDR12 (PDR12 đóng vai trò như một cái bơm để đưa Pb vào trong tế bào rễ). PCs và PDR12 sau khi tạo ra làm tăng sự tích lũy và chống chịu Pb. Sự phiên mã của gen *PSE1* được gây ra bởi Pb, và biểu hiện quá mức của gen *PSE1* dẫn đến tăng khả năng chống chịu Pb.

Trong các thí nghiệm trên cây *Hirschfeldia incana* của Florence và ctv (2013), một số gen được phát hiện có sự biểu hiện đáng kể khi xử lý Pb như *HiATM3*, *HiGS2* (GS2 -glutathione synthetase), *HiHMA4* (HMA-heavy metal ATPase), *HiMRP3* (multidrug resistance-associated protein) và *HiMT2a* (MT-metallothionein) trong rễ và *HiHMA4* và *HiMT2a* ở phần trên của cây. 2 gen *HMA4* và *MT2a* gây sự chú ý vì cả hai đặc biệt quá mức trong rễ và/hoặc chồi của *H. Incana*.

Shahrtash (2013) đã phát hiện gen *GST* có liên quan đến các loại stress môi trường, bao gồm KLN. Các tác nhân gây oxy hoá như KLN sẽ làm tăng tỷ lệ phiên mã gen *GST*, và hai loại mRNA được sản xuất. Ngoài một mRNA mã hoá cho GST thông thường, một mRNA thứ hai mã hóa cho một protein GST cắt

ngắn mới, thiếu miền hoạt động của enzyme, nhưng giữ lại vùng gắn với GSH. Do đó, kết quả là hai protein, một trong số đó là GST bình thường thu dọn chất oxy hoá nhờ xúc tác gắn tiền chất anthocyanin vào GSH rồi vận chuyển đến không bào, trong khi một protein GST thứ hai có liên quan đến vận chuyển kim loại nặng vào tích tụ trong không bào. Biểu hiện gen *GST* vẫn ở mức cao trong ít nhất 48 giờ (Shahrtash, 2013).

1.5.2 Sự biểu hiện gen liên quan đến chống chịu Pb ở thực vật

Biểu hiện gen được xem là một trong những quá trình chính trong chuyển hóa tế bào khi bị ảnh hưởng bởi stress Pb. Các quá trình này có thể được điều hòa thông qua con đường tín hiệu MAPK, chuyển tín hiệu từ chất nhận sang các bào quan khác để chống lại sự kích thích của stress oxy hóa. Sự truyền tín hiệu xảy ra thông qua một loạt các phản ứng phosphoryl hóa của MAPK, cuối cùng kết thúc với sự thay đổi biểu hiện gen và tổng hợp protein (Singh và ctv, 2016). Các nghiên cứu về biểu hiện gen đóng vai trò quan trọng trong chuyển hóa tế bào, đã phát triển cái nhìn sâu sắc mới trong sự hiểu biết về các cơ chế phân tử của sự tương tác giữa kim loại và thực vật (Alaraidh và ctv, 2018). Ngoài ra, thông tin từ những gen biểu hiện rất hữu ích để phát triển các cây chuyển gen trong tương lai cho mục đích xử lý ô nhiễm thông qua các gen chiến lược bằng kỹ thuật di truyền.

Một nghiên cứu đã xác định khoảng 16.246 gen độc lập có biểu hiện khác nhau trong *Platanus acerifolia* khi tiếp xúc với Pb (Wang và ctv, 2019). Phần lớn các gen được xác định có liên quan đến các enzyme chống oxy hóa và vận chuyển KL. Hơn nữa, các gen biểu hiện cũng có một vai trò quan trọng trong quang hợp, chuyển hóa gibberellin và glutathione, cũng như tham gia vào các cơ chế bảo vệ và giải độc trong cây (Wang và ctv, 2019).

Khi nghiên cứu trên cây *Festuca arundinacea*, Li và ctv (2017) đã phát hiện tổng cộng có 25.415 gen độc lập được biểu hiện khác nhau khi tiếp xúc với chì. Sự biểu hiện của những gen này có vai trò trực tiếp hoặc gián tiếp trong tích lũy Pb và phản ứng chống chịu của thực vật (Li và ctv, 2017).

Kết quả khảo sát sự biểu hiện của các gen mã hóa các enzyme chống oxy hóa (*SOD*, *APX*, *GPX*, *GR*, *POD*) trong 48 giờ tiếp xúc với Pb ở cỏ *Perennial ryegrass* cho thấy, *SOD*, *APX*, *GPX*, *GR* và *POD* đã biểu hiện sớm trong vòng vài giờ đầu cây tiếp xúc với Pb và mức độ biểu hiện của chúng không khác biệt ở 24 và 48 giờ. Điều này cho thấy, các enzyme chống oxy hóa có thể là nguyên nhân xuất hiện sớm bảo vệ cây chống lại stress oxy hóa gây ra bởi Pb trong *Perennial ryegrass*. Kết quả cũng cho thấy, ngay sau khi có sự biểu hiện gen, cây có dấu hiệu chống chịu với Pb (Hu và Fu, 2012).

Kết quả khảo sát trên *Arabidopsis* loài hoang dại và đột biến protein APX1 (KO-APX1) cho thấy, loài đột biến protein APX1 có khả năng chống lại stress Pb cao hơn, *Arabidopsis* đột biến có sự biểu hiện gen cao hơn đáng kể so với loài hoang dại với GPX (170%), CAT (33%) và GPX1 (280%) (Jiang và ctv, 2017).

Kết quả nghiên cứu sự biểu hiện của các gen *Cu/Zn SOD*, *FeSOD*, *POD*, *GPX* của Liu và ctv (2016) cho thấy, tác động của Pb ở nồng độ 1000 ppm làm tăng biểu hiện gen ở giai đoạn rất sớm trên thực vật *Festuca arundinacea*.

GR và GST liên quan đến glutathione là các enzym bảo vệ chống oxy hóa quan trọng để đối phó với căng thẳng do KLN. Trong nghiên cứu của Kisa (2017), các biểu hiện mRNA và hoạt động của các enzym GR và GST được khảo sát trên lá cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Kết quả cho thấy, khi tăng liều lượng Cd, Cu và Pb, biểu hiện các gen *GR* và *GST* khác nhau ở nồng độ khác nhau. Sự biểu hiện của *GR* có xu hướng tăng lên đáng kể ở tất cả nồng độ, ngoại trừ nồng độ Pb 10 ppm không có thay đổi đáng kể. Gen *GST* tăng đáng kể ở tất cả các nồng độ xử lý Cd, Cu và Pb. Biểu hiện cao nhất của *GR* và *GST* được thấy khi xử lý 20 ppm và 50 ppm Pb. Hoạt động của enzym GR và GST tăng lên đáng kể khi xử lý Cd, Cu và Pb, nhưng hoạt động GR không đổi ở nồng độ 50 ppm Cu so với đối chứng trên lá cà chua (Kisa, 2017).

Ai TN. và ctv (2018) khi nghiên cứu về sự liên quan giữa yếu tố phiên mã RsMYB1 (có vai trò điều hòa anthocyanin) và sự biểu hiện của các gen *SOD*, *CAT* và *POD* trên thực vật *Raphanus sativus* cho thấy rằng các cây có sự biểu

hiện cao *RsMYB1* có khả năng chống chịu stress kim loại nặng tốt hơn vì các gen chống oxy hóa *SOD*, *CAT* và *POD* được đáp ứng mạnh hơn.

Kết quả phân tích những thay đổi biểu hiện gen *SOD*, *CAT* và *APX* ở *Lepidium sativum* trong việc đáp ứng với các nồng độ của Pb cho thấy, các gen biểu hiện rất khác biệt ở cây con bị stress Pb. Các gen chống oxy hóa này biểu hiện mạnh mẽ ở nồng độ Pb cao hơn (400 và 600 ppm), trong khi đó biểu hiện thấp hơn ở nồng độ 100 và 200 ppm. Sự thay đổi trong biểu hiện gen ở thực vật có vai trò quan trọng trong phản ứng với stress và thích ứng với môi trường (Jiang và ctv, 2019).

Biểu hiện gen của các enzym chống oxy hóa ở ba giống lúa mì (Morvarid, Gonbad và Tirgan) ở giai đoạn lá cờ đã được Navabpour và ctv (2020) nghiên cứu dưới tác động của các nồng độ Pb khác nhau (0, 15, 30 và 45 mg/kg đất) và kết quả cho thấy, độc tính của Pb làm tăng biểu hiện của một số gen và hoạt động của các enzym quan trọng của hệ thống phòng thủ chống oxy hóa trong lúa mì (*CAT*, *SOD*, *GPX* và *APX*) ở cả mô lá và mô rễ trong điều kiện stress Pb. Mức độ biểu hiện gen và hoạt động của enzym ở rễ cao hơn ở mô lá (Navabpour và ctv, 2020).

Glutathione S-transferase (GSTs) là các enzym giải độc bằng cách xúc tác sự gắn kết độc chất với glutathione và cô lập trong không bào. Sự biểu hiện quá mức của gen *GST* có thể bảo vệ thực vật chống lại stress oxy hóa. Cây biểu hiện quá mức *GST* cho thấy khả năng chịu đựng của cây con được nâng cao với nhiệt độ thấp và mặn (Khan và ctv, 2018). Những kết quả này cho thấy rằng tăng biểu hiện *GST* có thể bảo vệ thực vật khỏi một số loại áp lực môi trường.

1.5.3. Kỹ thuật phân tử nghiên cứu biểu hiện gen

Mức độ biểu hiện gen trong tế bào, cũng như các cơ chế phức tạp điều chỉnh mức độ sự biểu hiện khác nhau đã được sự quan tâm rất lớn từ các nhà nghiên cứu. Năm 1969, Gall và ctv đã sử dụng kỹ thuật lai *in situ* để nghiên cứu biểu hiện gen nhưng kỹ thuật này không được sử dụng để phát hiện mRNA. Năm 1977, Alwine và ctv đã sử dụng kỹ thuật Northern Blot để nghiên cứu biểu hiện

gen. Tuy nhiên 2 kỹ thuật này đã không được sử dụng phổ biến do tính hiệu quả và độ nhạy của nó không cao. Cho đến năm 1986 nhiều kỹ thuật khác ra đời hiệu quả hơn và độ nhạy cao hơn. Hiện nay các kỹ thuật được sử dụng rộng rãi nhất là cDNA-AFLP, microarrays, SAGE, MPSS, và Real-time PCR (Segundo-Val và Sanz-Lozano, 2016).

Hiện nay, kỹ thuật được sử dụng phổ biến nhất trong nghiên cứu biểu hiện gen là Real-time PCR, còn được gọi là PCR định lượng (qPCR), là một trong những kỹ thuật phân tích gen hiệu quả và nhạy nhất. So với các kỹ thuật định lượng mRNA khác, Real-time PCR có thể được sử dụng để định lượng từ các mẫu có lượng mRNA nhỏ hơn nhiều. Các nhà nghiên cứu đã thực hiện RNA phiên mã ngược, sau đó sử dụng cDNA là khuôn mẫu cho phản ứng qPCR để xác định và định lượng các sản phẩm biểu hiện gen. Khi nghiên cứu biểu hiện gen với kỹ thuật Real-time PCR, các nhà khoa học thường khảo sát sự thay đổi (tăng hoặc giảm) trong biểu hiện của một gen chuyên biệt hoặc một nhóm gen bằng cách đo mức độ gen phiên mã (Whelan và ctv, 2003). Kỹ thuật Real-time PCR cho phép quan sát được chi tiết quá trình nhân bản DNA thông qua việc sử dụng các chất phát huỳnh quang và thiết bị nhận diện tín hiệu huỳnh quang tương ứng. Phân tích tác nhân đích trong mẫu thử bằng Real-time PCR cho phép định lượng sản phẩm thu được một cách chính xác, đánh giá được tỷ lệ biểu hiện của các gen quan tâm, phát hiện các khác biệt SNP và xác định kiểu di truyền.

Với những thông tin đã đưa ra cho thấy: Việc sử dụng Pb cho hoạt động công nghiệp và đời sống trong khoảng thời gian dài của con người đã gây ô nhiễm nghiêm trọng. Nồng độ Pb ngày càng cao trong môi trường sẽ tồn tại bền vững do không thể phân hủy. Nếu không có biện pháp khắc phục thì Pb sẽ đi vào chuỗi thức ăn, tích lũy trong cơ thể sinh vật và gây độc. So với các phương pháp hóa lý, phương pháp sử dụng thực vật xử lý đang được nghiên cứu nhiều trên thế giới như là một biện pháp an toàn, bền vững và đầy triển vọng. Đối với những vùng đất trọc bị ô nhiễm nặng, việc áp dụng thực vật để cố định KLN và tái tạo thảm thực vật có thể là một phương pháp hữu hiệu và hợp lý. Để ứng dụng thành

công phương pháp xử lý bằng thực vật, việc tìm ra một loài thực vật có khả năng hấp thụ, tích lũy và giải độc KLN là cần thiết. Nhiều công trình nghiên cứu đã tìm ra được nhiều loài thực vật và đã chứng minh được khả năng đáp ứng của chúng. Tuy nhiên đối với Pb, số loài thực vật phát hiện có khả năng rất ít so với các KLN khác. Đây là điểm hạn chế cho việc ứng dụng thực vật để loại bỏ ô nhiễm Pb cho môi trường.

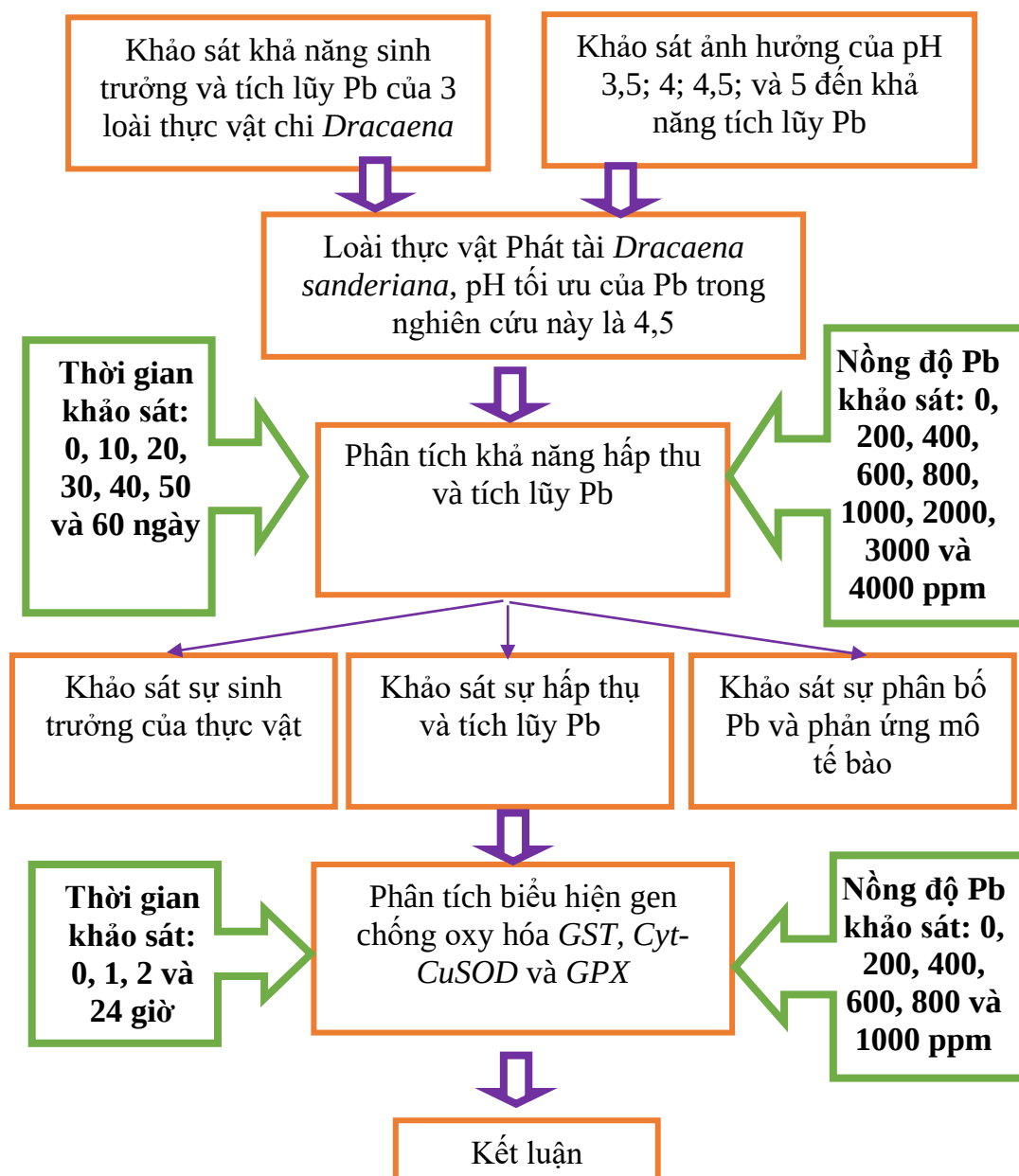
Do có nhiều ưu điểm hơn so với các loài thực vật khác là có khả năng xử lý được nhiều KLN (Cu, Cr, Ni, Hg, Cd), thích nghi được cả môi trường đất và nước, tái tạo chồi nhanh, bộ rễ phát triển mạnh. Loài Phát tài (*Dracaena sanderiana*) đã được chọn trong nghiên cứu của chúng tôi. Để tìm ra ngưỡng chịu đựng Pb, đề tài đã sử dụng một dãy nồng độ Pb 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 4000 ppm. Ngoài các chỉ tiêu sinh trưởng và cấu trúc giải phẫu, các chỉ tiêu hàm lượng Pb tổng trong các bộ phận rễ, thân, lá, chỉ số chống chịu, chỉ số vận chuyển Pb, phân bố Pb trong cây và phản ứng mô học cũng được khảo sát nhằm xác định loài thực vật có khả năng tích lũy và chống chịu Pb.

Việc tìm ra loài thực vật có khả năng tích lũy, chống chịu KLN cao hoặc siêu tích lũy là rất cần thiết trong tương lai do tính khả thi và khả năng ứng dụng trên quy mô lớn của nó mà hiện tại là khan hiếm. Để làm được điều này, việc làm đầu tiên là tìm ra các gen có khả năng đáp ứng với độc tố KLN. Giống như nhiều KL độc khác, Pb gây ra sự sản sinh và tích lũy các chất oxy hóa dẫn đến quá trình oxy hóa các phân tử lipid, protein, chlorophyll và axit nucleic. Thực vật có sự phát triển hệ thống phòng thủ để phân hủy ROS, đó là do sự biểu hiện mạnh mẽ của các gen mã hóa các enzyme chống oxy hóa. Đây được xem là các chiến binh xuất hiện đầu tiên và nhanh nhất khi có dấu hiệu gây độc ở thực vật và đã được nghiên cứu nhiều trên nhiều loài thực vật. Đó cũng là lý do đề tài chọn các gen chống oxy hóa để nghiên cứu.

CHƯƠNG 2

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. TIẾN TRÌNH NGHIÊN CỨU



Hình 2.1. Sơ đồ tiến trình nghiên cứu

Tiến trình nghiên cứu được thực hiện theo hình 2.1. Khảo sát sơ bộ khả năng sinh trưởng và tích lũy chì của 3 loài thực vật trong chi *Dracaena*; và ảnh

hưởng của các giá trị pH đến khả năng tích lũy Pb của thực vật là bước đầu tiên của tiến trình nghiên cứu nhằm chọn ra loài thực vật và pH môi trường thích hợp làm cơ sở cho nghiên cứu.

Chọn vị trí không nhiễm Pb để thu thập mẫu thực vật, chuẩn bị dung dịch Pb thí nghiệm và bố trí thí nghiệm là bước tiếp theo nhằm đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ Pb đến khả năng sinh trưởng, hấp thụ, tích lũy Pb, phân bố Pb và phản ứng mô học của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*).

Để xác định khả năng chống chịu Pb của cây Phát tài có liên quan đến sự biểu hiện gen, kỹ thuật Real-time PCR được sử dụng để xác định tỷ lệ biểu hiện của 3 gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* trong các bộ phận rễ, thân và lá ở các nồng độ Pb và thời gian khác nhau.

2.2. VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU

2.2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Loài Phát tài *Dracaena sanderiana*, còn có tên gọi là Phát tài lộc, thuộc nhóm cây thân bụi trong chi *Dracaena*, cao khoảng 1 - 1,5 m, đường kính 2 - 3 cm, thân gồm nhiều đốt ngắn 10 - 15 cm đều nhau có màu xanh trắng. Lá thuôn dài, có phiến màu lục tươi, thon rộng, đầu lá nhọn, cuống dài và bẹ ôm thân (Phạm Hoàng Hộ, 2003) (hình 5 - phụ lục 4).

- Loài Phát tài *Dracaena reflexa*, có tên gọi là Trúc bách hợp, thuộc nhóm cây thân bụi trong chi *Dracaena*, cao từ 0,5 - 2 m, đường kính 2 - 2,5 cm. Thân gồm nhiều đốt ngắn 10 - 15 cm. Lá hình bầu dục, thuôn dài, nhọn ở đầu, mép nguyên, nhẵn bóng, có màu xanh thẫm cùng một dải sọc ngả vàng nhạt ở giữa lá kéo dài đến cuống (Phạm Hoàng Hộ, 2003) (hình 5 - phụ lục 4).

- Loài Phát tài *Dracaena deremensis*, có tên gọi Phát tài búp sen, thuộc nhóm cây thân bụi trong chi *Dracaena*, cao khoảng 1 - 1,5 m, đường kính 2 - 3 cm. Thân phân đốt có màu xanh. Lá dài màu xanh đậm, nhẵn, thuôn nhọn về phía đầu, cuống tạo thành bẹ ôm lấy thân cuống (Phạm Hoàng Hộ, 2003) (hình 5 - phụ lục 4).

- 3 cặp primer gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* và cặp primer gen nội chuẩn *Actin* (bảng 2.1).

Bảng 2.1. Trình tự các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu

Tên primer	Trình tự 5' - 3'	Kích thước (bp)	Nguồn
<i>GST</i> F <i>GST</i> R	CACAAGAAGATCCCGGTCCT GCGCAGGTCTCGTAGGTGTA	362	*
<i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> F <i>Cyt-Cu/Zn SOD</i> R	GACACMACAAATGGHTGCAT TCATCBGGATCGGCATGGACAAC	221	Bian và Jiang (2009)
<i>GPX</i> F <i>GPX</i> R	TTYCCRTGCAAYCAGTTTGG ACTTGGAGAAGTTCCACTTGAT	202	*
<i>Actin (ACT)</i> F <i>Actin (ACT)</i> R	GAAGGATCTATATGGCAACATCG ATCCACATCTGCTGGAATGTG	201	Hoshikawa (2012)

Y=C/T; R= A/G; M = C/A, H = A/C/T, B = G/C/T; F: Mũi xuôi; R: Mũi ngược

*: Thiết kế dựa trên các trình tự gen *GST* và *GPX* của một số loài được công bố trên ngân hàng gen NCBI, kiểm tra vùng trình tự bảo tồn bằng Bioedit, cặp primer được chọn sau đó được kiểm tra các thông số bằng FastPCR 6.5 (Phụ lục 1).

2.2.2. Trang thiết bị và dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu

- Các thiết bị dùng trong nghiên cứu: Máy đo pH, bếp điện, tủ sấy, máy ly tâm, nồi hấp tiệt trùng, máy ly tâm, máy đo UV-Vis (Biotek, Mỹ), cân phân tích, máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS (AA-7000, Shimadzu, Nhật), máy PCR geneAmp system 9700 (Biochrom, Anh), hệ thống máy Applied Biosystem®7500 Real-time PCR, máy soi gel, máy điện di Mupid-One.

- Các dụng cụ: Bình erlen, bình định mức, pipet, micropipet.

2.2.3. Hóa chất nghiên cứu

- HNO₃, HClO₄, HCl, NaOH, H₂O₂, Pb(NO₃)₂ (Merck, Đức).

- Kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Scientific, Mỹ), kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Mỹ). MyTaq Mix (Bioline, Anh) và nước khử ion sử dụng trong PCR, agarose, GelRed™ loading

buffer with Tricolor, HyperLadder™ 100bp (Bioline, Anh), dung dịch đệm TBE 10X (BioBasic, Canada). Thang chuẩn HyperLadder™ 100bp (Bioline, Anh).

- Chúng *E. coli* DH5α™ (Promega, Mỹ) và vector tạo dòng pGEM-T Easy (Promega, Mỹ), môi trường LB rắn - lỏng (phụ lục 2), Ampicillin, X-gal, IPTG, CaCl₂, glycerol. Kit SensiFAST SYBR Hi - ROX (Bioline, Anh). Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System của Promega.

2.3. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. NỘI DUNG 1: CƠ SỞ CHỌN LỰA ĐỐI TƯỢNG VÀ pH THÍCH HỢP CHO NGHIÊN CỨU

Mục đích: Chọn loài thực vật và pH dung dịch cho hiệu quả hấp thụ và tích lũy Pb cao nhất, nhằm thiết kế thí nghiệm với mong muốn đánh giá sự ảnh hưởng của Pb đến loài Phát tài đã chọn lựa ở các nội dung nghiên cứu tiếp theo.

2.3.1.1. Thí nghiệm 1: Sự tăng trưởng và khả năng tích lũy Pb của ba loài thực vật trong chi *Dracaena* trong điều kiện nhiễm độc Pb

Mục đích: Xác định loài thực vật thích hợp có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb cao nhất.

- **Thực vật thí nghiệm:** Đề tài đã sử dụng 3 loài thực vật chi *Dracaena* gồm Phát tài lộc (*Dracaena sanderiana*), Trúc bách hợp (*Dracaena reflexa*) và Phát tài búp sen (*Dracaena deremensis*). Các loài thực vật được lựa chọn dựa trên cơ sở: Thuộc nhóm thân bụi trong chi *Dracaena*, được trồng phổ biến ở Việt Nam, có đặc điểm hình thái, sinh thái, sinh trưởng và phát triển tương đồng nhau.

- **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức (NT) tương ứng 3 loài thực vật khảo sát, mỗi NT trồng trên 2 loại môi trường nước cất có bổ sung Pb và không bổ sung Pb (đối chứng). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại (LLL) được trình bày ở phụ lục 5.1. Tổng số NT: $3 \times 2 \times 3 = 18$ NT.

- Tiến hành thí nghiệm

Sau khi thu thập các cây Phát tài, tiến hành chọn những cây khỏe mạnh, không sâu bệnh, có hình thái tương đồng nhau, cắt lấy đoạn chồi khoảng 40 cm,

đem trồng trong cát (cát xây dựng). Sử dụng nước cất một lần không chứa Pb tưới mỗi ngày hai lần cho cây. Sau 60 ngày trồng, rễ có chiều dài 13 cm đến 14 cm, các cây khỏe mạnh được chọn và sử dụng làm cây mẫu (chỉ chọn những cây không phát hiện Pb).

Chuẩn bị các bình erlen 250 ml để trồng thí nghiệm, mỗi bình chứa 200 ml dung dịch Pb 100 ppm (Dung dịch Pb được chuẩn bị từ nước cất 1 lần và $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, nồng độ tính trên Pb), với pH 4,5. Trồng một cây/một loài thực vật vào mỗi bình (5 cây tương ứng một NT). Thời gian thí nghiệm là 30 ngày.

- Chỉ tiêu theo dõi và phương pháp phân tích các chỉ tiêu

* **Chỉ tiêu tăng trưởng:** Chiều cao (cm) và sinh khối khô (g) của cây được theo dõi ở các thời gian 0, 10, 20 và 30 ngày thí nghiệm.

Phương pháp xác định chiều cao cây (cm): Ở mỗi nghiệm thức, thu một cây và dùng thước chia vạch cm đo từ gốc đến chóp lá của lá mọc sau cùng (lá này được đánh dấu bằng viết lông dầu).

Phương pháp xác định sinh khối khô của cây (g): Ở mỗi nghiệm thức, thu một cây và dùng cân phân tích 2 số lẻ cân sinh khối khô của cây. Sinh khối khô được xác định sau khi sấy khô ở 70°C đến giá trị không đổi.

* **Hàm lượng Pb tổng (mg/kg TLK):** Hàm lượng Pb tổng trong rễ, thân, lá và trong nước được phân tích sau 30 ngày thí nghiệm.

Phương pháp xác định hàm lượng Pb tổng trong rễ, thân và lá: Sau 30 ngày thí nghiệm, tiến hành thu 3 cây ở mỗi nghiệm thức (Mẫu thực vật được thu nhận dựa theo TCVN 8551:2010). Các cây sau đó được rửa sạch bằng nước cất và thấm khô. Cắt riêng các bộ phận rễ, thân, lá của cây, ngâm và rửa với nước khử ion 3 lần, thời gian ngâm cho mỗi lần rửa là 60 phút nhằm loại bỏ hết lượng Pb bám trên bề mặt rễ. Các mẫu rễ, thân và lá được cắt nhỏ và sấy ở 70°C cho đến khi khối lượng không đổi và nghiền mịn bằng cối và chày. Mẫu được xử lý theo phương pháp vô cơ hóa ướt (Perkin-Elmer, 1996): Cân 1 g mẫu (rễ hoặc thân hoặc lá) đã nghiền mịn cho vào bình tam giác 250 ml, cho thêm 10 ml HNO_3 đậm đặc, 2 ml HClO_4 đậm đặc, 2 ml H_2O_2 rồi đậy nắp bình lại và ngâm

qua đêm; Tiến hành đun mẫu cho đến khi mẫu mất màu hoàn toàn và gần khô; Hòa tan cạn bằng HNO₃ 5% và định mức đến 25 ml bằng HNO₃ 5% sau đó lọc lại bằng giấy lọc. Đo mẫu bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (AA-7000, Shimadzu, Nhật) với các dung dịch chì chuẩn (0,5; 1; 2; 5; 8 và 10 ppm).

Phương pháp xác định hàm lượng Pb tổng trong nước (ppm): Mẫu nước được thu nhận theo TCVN 6663-1:2011. Lấy 100 ml nước ở mỗi nghiệm thức từ thí nghiệm cho vào bình tam giác, thêm vào 5 ml HNO₃ 65% và đun sôi nhẹ mẫu đến gần cạn, để nguội đến nhiệt độ phòng. Dùng HNO₃ 5% hòa tan cạn mẫu và định mức đến 50 ml, sau đó lọc lại bằng giấy lọc. Đo mẫu bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử.

Hàm lượng Pb trong mẫu thực vật và trong mẫu nước được tính theo công thức:

$$X = C_x \cdot V / m$$

Trong đó: X: hàm lượng Pb trong mẫu đem đo (mg/Kg đối với mẫu thực vật và ppm đối với mẫu nước); C_x: Nồng độ chất phân tích trong mẫu đo được (ppm); V: Thể tích dung dịch mẫu (ml); m: Lượng mẫu phân tích để xử lý và định mức thành thể tích (g đối với mẫu thực vật và ml đối với mẫu nước).

* **Khả năng loại bỏ sinh học Pb:** Được khảo sát qua chỉ số PMU (percentage of metal ion uptake) sau 30 ngày thí nghiệm. PMU được tính là phần trăm ion Pb được hấp thụ và được tính theo công thức sau:

$$PMU (\%) = \frac{\text{Hàm lượng Pb trong mẫu}}{\text{Hàm lượng Pb trong dung dịch}} \cdot 100$$

2.3.1.2. Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)

Mục đích: Xác định giá trị pH thích hợp để đạt khả năng hấp thụ và tích lũy Pb cao nhất.

- **Thực vật thí nghiệm:** Loài thực vật được chọn là loài cho kết quả cao nhất ở thí nghiệm 1, là loài Phát tài (*Dracaena sanderiana*).

- **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm gồm 4 NT tương ứng với 4 giá trị pH khảo sát là 3,5; 4; 4,5 và 5, được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được trình bày ở phụ lục 5.2. Các giá trị pH khảo sát được xác định dựa trên cơ sở: pH càng thấp thì khả năng hòa tan của Pb càng cao, Pb bắt đầu kết tủa khi $\text{pH} > 5$ (Kabata, 2001). Chính vì vậy, trong thí nghiệm này với 4 mức pH khảo sát là 3,5; 4; 4,5 và 5 đã được chọn lựa với mục đích mong muốn lượng Pb bổ sung trong các nghiệm thức được hòa tan trong dung dịch, tránh hiện tượng kết tủa làm cản trở khả năng hấp thụ trong cây. Tổng số NT: $4 \times 1 \times 3 = 12$ NT.

- Tiến hành thí nghiệm

Sau khi thu thập, các cây *D. sanderiana* được cắt thành các đoạn chồi có kích thước bằng nhau (45 cm) và được trồng trong nước cất 1 lần không chứa Pb cho đến khi cây ra rễ. Chọn các cây Phát tài có mức độ tương đồng nhau về chiều cao, chiều dài rễ và sinh khối tươi để thí nghiệm.

Chuẩn bị 12 thùng xốp có kích thước dài 45 cm, rộng 32 cm và cao 20 cm, trên nắp thùng khoét 9 lỗ có đường kính 5 cm cách đều nhau, đáy thùng được lót lớp nilon đen. Mỗi cây Phát tài được đặt vào 1 lỗ trên thùng với 15 lít dung dịch Pb có nồng độ 100 ppm (dung dịch Pb chuẩn bị như thí nghiệm 1). Mỗi thùng tương ứng 1 nghiệm thức. Thí nghiệm được bố trí trong nhà lưới tránh nước mưa (phụ lục 4). Việc điều chỉnh pH được thực hiện bằng NaOH và HCl 1M.

- Chỉ tiêu theo dõi và phương pháp phân tích các chỉ tiêu

* **Các chỉ tiêu tăng trưởng:** Chiều cao cây, chiều dài rễ, diện tích lá được theo dõi ở các thời gian 0, 10, 20 và 30 ngày thí nghiệm.

Phương pháp xác định chiều cao cây (cm): Được thực hiện như trình bày ở mục 3.2.1.1.

Phương pháp xác định chiều dài rễ (cm): Dùng thước chia vạch cm đo từ phần mọc rễ của thân cây đến chóp rễ. Điểm mọc rễ đầu tiên được đánh dấu để cố định cho các lần đo sau.

Phương pháp xác định diện tích lá (m^2): Diện tích lá được xác định theo phương pháp cân nhanh tham khảo theo Vũ Văn Vụ và ctv (2004).

* **Hàm lượng Pb tổng (mg/kg TLK):** Hàm lượng Pb tổng trong rễ, thân, lá được phân tích sau 30 ngày thí nghiệm. Phương pháp xác định hàm lượng Pb tổng trong rễ, thân và lá được thực hiện như trình bày ở mục 3.2.1.1.

2.3.2. NỘI DUNG 2: KHẢ NĂNG HẤP THỤ VÀ TÍCH LŨY Pb CỦA CÂY PHÁT TÀI

- **Mục đích:** Xác định ngưỡng chịu đựng Pb, hàm lượng Pb tích lũy, vị trí phân bố Pb ở phạm vi tế bào và phản ứng mô thực vật trong điều kiện nhiễm độc Pb của Phát tài (*D. sanderiana*).

2.3.2.1. Thực vật và pH sử dụng cho thí nghiệm

Loài thực vật Phát tài (*Dracaena sanderiana*) được chọn là loài cho kết quả cao nhất ở thí nghiệm 1 và pH được chọn là pH 4,5 cho kết quả cao nhất ở thí nghiệm 2.



Hình 2.2. Loài Phát tài (*Dracaena sanderiana*) dùng trong nghiên cứu.

(a): Trước khi dưỡng ra rễ ; (b): Sau khi dưỡng ra rễ

Loài Phát tài được chọn làm đối tượng nghiên cứu là các cây 1 năm tuổi, có kích thước và trọng lượng tương đương và không phát hiện Pb. Sau đó, các cây được cắt lấy đoạn chồi (hình 2.2 a) và nuôi dưỡng trong nước cất 1 lần cho đến khi ra rễ và phát triển ổn định thì tiến hành thí nghiệm (hình 2.2 b). Các cây được sử dụng nghiên cứu là những cây có số lượng lá (10 - 11 lá), chiều cao cây (49 - 52 cm), chiều dài rễ (15-16 cm) và tình trạng sinh trưởng tương đồng nhau.

2.3.2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm gồm 9 nghiệm thức tương ứng với 9 nồng độ Pb là 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000 và 4000 ppm (nồng độ tính trên Pb) được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại (phụ lục 4). Nghiệm thức đối chứng sử dụng nước cất 1 lần không bổ sung Pb và không phát hiện Pb. Nồng độ Pb khảo sát được giới hạn đến nồng độ gây chết cây (4000 ppm). Tổng số NT: $9 \times 1 \times 3 = 27$ NT. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được trình bày ở phụ lục 5.3.

2.3.2.3. Tiến hành thí nghiệm

Chuẩn bị 27 thùng xốp có kích thước dài 45 cm, rộng 32 cm và cao 20 cm, trên nắp thùng khoét 9 lỗ có đường kính 5cm cách đều nhau, đáy thùng được lót lớp nilon đen. Mỗi cây Phát tài được đặt vào 1 lỗ trên thùng. Mỗi thùng xốp trồng 9 cây Phát tài. Dung dịch chì stock được chuẩn bị từ chì nitrat $[Pb(NO_3)_2]$ và được pha loãng đến nồng độ Pb cần thí nghiệm, pH 4,5. Các điều kiện ban đầu của thí nghiệm: nhiệt độ của môi trường thí nghiệm là $32^\circ C$, độ ẩm 49 RH%.

15 lít dung dịch Pb ở mỗi nồng độ được cho vào thùng xốp và trồng 9 cây Phát tài, mỗi cây được gắn thẻ có đánh số thứ tự từ 1 - 9, số nghiệm thức và số lần lặp lại để tiện theo dõi trong quá trình thí nghiệm (Phụ lục 4). Dùng dung dịch NaOH và HCl 1M để điều chỉnh pH. (Thí nghiệm sử dụng nước cất 1 lần mà không dùng dung dịch dinh dưỡng nhằm tránh nhiều yếu tố dinh dưỡng tác động đến khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của cây. Ngoài ra Phát tài (*D. sanderiana*) có cơ chế hoạt động như thực vật CAM nên có thể có khả năng thích nghi với điều kiện môi trường sống không thuận lợi (Karunananda và Abeysinghe, 2019)).

2.3.2.4. Chỉ tiêu khảo sát và phương pháp phân tích các chỉ tiêu

- **Các chỉ tiêu sinh trưởng:** Chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và khô, hàm lượng nước trong cây, hàm lượng diệp lục tố trong lá được theo dõi ở thời gian 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày của thí nghiệm.

Phương pháp xác định chiều cao cây (cm) và phương pháp xác định chiều dài rễ (cm): Được thực hiện lần lượt như trình bày ở mục 3.2.1.1 và 3.2.1.2.

Phương pháp xác định sinh khối tươi và khô của cây (g): Ở mỗi nghiệm thức, thu một cây và dùng cân phân tích 2 số lẻ cân sinh khối tươi và sinh khối khô của cây. Sinh khối khô được xác định sau khi sấy khô ở 70°C đến giá trị không đổi.

Phương pháp xác định hàm lượng nước trong cây (%): Hàm lượng nước trong cây được xác định theo phương pháp khối lượng ướt tham khảo của Brunet (2008). Định kỳ ở mỗi thời gian, thu mỗi nghiệm thức 1 cây, cân và ghi lại trọng lượng tươi của cây, sau đó cắt nhỏ và ngâm vào nước khử ion để ở 4°C trong vòng 4 giờ. Sau 4 giờ lấy lau khô nước và cân, ghi lại khối lượng. Sau đó sấy mẫu ở 70°C đến khi khối lượng mẫu không đổi, cân và ghi lại trọng lượng khô.

Hàm lượng nước trong cây được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng nước (\%)} = \frac{(\text{trọng lượng tươi} - \text{trọng lượng khô})}{(\text{trọng lượng sau ngâm} - \text{trọng lượng khô})} * 100$$

Phương pháp xác định hàm lượng diệp lục tố trong lá cây (CCI): Hàm lượng diệp lục tố được đo bằng máy CCM - 200 (Opti - Sciences, Mỹ). Đây là máy đo cầm tay, đo hàm lượng diệp lục tổng của lá, đơn vị là CCI. Dùng máy đo ở phần giữa của tất cả lá trên cây, ghi nhận kết quả và lấy giá trị trung bình.

- **Hàm lượng Pb tổng (mg/kg TLK):** Hàm lượng Pb tổng trong các bộ phận rễ, thân và lá của cây được phân tích ở các thời gian 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày của thí nghiệm (hàm lượng Pb được tính trên trọng lượng khô (TLK)).

Phương pháp xác định hàm lượng Pb tổng trong rễ, thân và lá: được thực hiện như trình bày ở mục 3.2.1.1.

- **Hiệu quả loại bỏ Pb trong nước của cây Phát tài:** được theo dõi ở thời gian 30 và 60 ngày thí nghiệm

Hiệu quả loại bỏ Pb trong nước của cây Phát tài được tính theo công thức:

$$H = \frac{C_1 - C_2}{C_1} . 100\%$$

Trong đó: H: Hiệu quả loại bỏ Pb (%); C₁: Nồng độ Pb ban đầu; C₂: Nồng độ Pb sau xử lý.

- **Khả năng chống chịu Pb của cây Phát tài:** Khả năng chống chịu Pb của cây được theo dõi ở 60 ngày thí nghiệm và được đánh giá qua chỉ số chống chịu TI (tolerance index) (Wang và ctv, 2014) dựa trên các chỉ tiêu sinh trưởng và tính theo công thức: $TI (\%) = 1/3\{(\text{Chiều cao cây nhiễm chì/chiều cao cây đối chứng}) + (\text{Chiều dài rễ cây nhiễm chì/ chiều dài rễ cây đối chứng}) + (\text{Trọng lượng khô của cây nhiễm chì/trọng lượng khô của cây đối chứng})\} * 100$

- **Khả năng vận chuyển Pb của cây Phát tài:** Được theo dõi ở thời gian trước thí nghiệm và 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày của thí nghiệm và được đánh giá qua chỉ số TF (translocation factor) (Marchiol và ctv, 2004) theo công thức:

$$TF = \frac{\text{Hàm lượng chì trong thân + lá}}{\text{hàm lượng chì trong rễ}}$$

- **Vị trí phân bố Pb trong các bộ phận rễ, thân và lá:** được khảo sát ở ngày thứ 60 của thí nghiệm. Sự phân bố Pb trong mô thực vật được quan sát bằng phương pháp hóa mô được tham khảo theo nghiên cứu của Tupan và ctv (2016).

Phương pháp thực hiện: Thu mẫu cây Phát tài ở các nồng độ Pb và cây đối chứng. Dùng kéo cắt rời các bộ phận rễ, thân và lá của cây. Ngâm và rửa mẫu với nước khử ion 3 lần, thời gian ngâm cho mỗi lần rửa là 60 phút. Mẫu sau khi rửa được cố định trong dung dịch formaldehyde axit acetic trong 24 giờ. Mẫu sau cố định được cắt mỏng bằng dụng cụ cắt mẫu thực vật cầm tay và được ngâm trong dung dịch sodium rhodizonate 0,2% (đã thêm một giọt dung dịch đệm axit axetic pH 2,8) trong 30 phút. Mẫu sau đó được rửa sạch bằng nước cất và được quan sát dưới kính hiển vi Olympus CX 22.

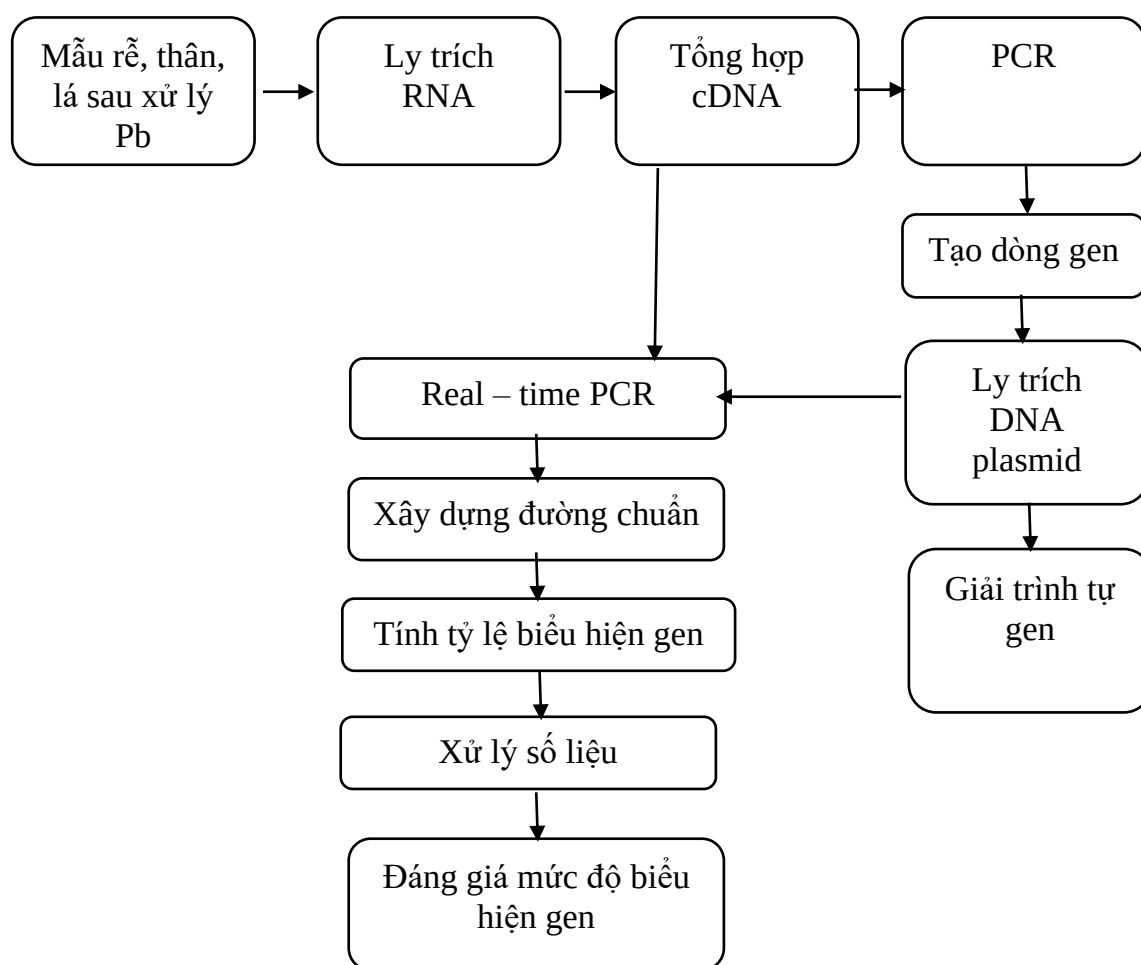
- **Phản ứng mô tế bào trong điều kiện nhiễm độc Pb:** Cấu trúc giải phẫu của các mô rễ, thân và lá được khảo sát ở ngày thứ 60 của thí nghiệm.

Phương pháp thực hiện: Các cây Phát tài được lấy từ mỗi nồng độ Pb xử lý tách ra theo các phần rễ, thân và lá, được làm sạch bằng nước cất và ngâm trong dung dịch formaldehyde axit acetic trong 24 giờ. Các mẫu đó được cắt mỏng bằng dụng cụ cắt mẫu thực vật cầm tay (Mẫu nghiên cứu được chọn là đoạn giữa của rễ, thân và lá). Mẫu sau khi cắt mỏng được nhuộm kép với xanh

methylen và đỏ carmin. Quy trình thực hiện tiêu bản hiển vi tạm thời được thực hiện theo Hoàng Thị Sản và Nguyễn Phương Nga (2004). Các mẫu sau đó được quan sát bằng kính hiển vi. Các thông số đo là cấu trúc giải phẫu của các mô ở rễ, thân và lá. Giá trị đo của các mô được tính trên độ dày của chúng. Riêng ống mạch gỗ được tính là đường kính. Những quan sát đều được thực hiện bằng kính hiển vi Olympus CX 22. Kích thước mô giải phẫu được đo bằng phần mềm Optika Vision Pro. Các giá trị được tính là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

2.3.3. NỘI DUNG 3: SỰ BIỂU HIỆN GEN CHỐNG OXY HÓA CỦA CÂY PHÁT TÀI TRONG ĐIỀU KIỆN NHIỄM ĐỘC Pb

- **Mục đích:** Xác định mức độ biểu hiện của 3 gen chống oxy hóa đáp ứng với khả năng chống chịu Pb của cây Phát tài.



Hình 2.3. Quy trình thực hiện nghiên cứu biểu hiện gen

2.3.3.1. Bố trí thí nghiệm xử lý Pb

- Các mẫu cây Phát tài (*D. sanderiana*) được chọn làm thí nghiệm là những cây có thời gian sinh trưởng như nhau, kích thước đồng đều, chiều cao khoảng 45 cm được trồng trong nước cất 1 lần bổ sung $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ với các nồng độ 200, 400, 600, 800 và 1000 ppm ở pH 4,5. Các mẫu rễ, thân và lá cây Phát tài được thu nhận tại các thời điểm 0, 1, 2 và 24 giờ sau khi xử lý với Pb. Mẫu cây không xử lý Pb được sử dụng làm đối chứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- Các nghiệm thức lần lượt được đánh dấu với ký hiệu như sau:

(Rễ, thân, lá) x (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm) x (0, 1, 2, 24 giờ) = (R, T, L) x (0, 2, 4, 6, 8, 10) x (0, 1, 2, 24).

2.3.3.2. Ly trích RNA tổng số và tổng hợp cDNA

Các mẫu cây Phát tài sau xử lý được tách riêng từng phần rễ, thân và lá và đem ly trích RNA tổng số. RNA tổng số được ly trích bằng kit GeneJET Plant RNA Purification. Quy trình ly trích được thực hiện theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA sau ly trích được kiểm tra độ tinh sạch và nồng độ bằng máy đo quang phổ UV-Vis.

Các mẫu RNA sau khi ly trích được dùng để tổng hợp cDNA. Việc tổng hợp cDNA được thực hiện bằng kit Tetro reverse cDNA Synthesis. Quy trình tổng hợp cDNA được thực hiện theo hướng dẫn của hãng sản xuất và sử dụng máy PCR cho các bước ủ.

2.3.4.3. Khuếch đại trình tự gen chống oxy hoá và gen *Actin* (ACT)

Mẫu cDNA được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR khuếch đại các đoạn gen mục tiêu với primer xuôi (F) và ngược (R) nồng độ 0,4 μM . Tổng thể tích phản ứng PCR là 12,5 μl , các thành phần khác gồm master mix nồng độ 1X, thành phần cDNA làm khuôn mẫu, và nước khử ion. Phản ứng PCR được thiết lập gồm 5 phút ở Ta 94°C cho bước tiền biến tính, tiếp theo là 40 chu kỳ nhiệt với lần lượt 3 bước: 30 giây ở 94°C; 30 giây cho giai đoạn bắt cặp ở 56°C (cặp primer Cyt-Cu/Zn SOD hay ACT) hoặc 60°C (cho cặp primer GPX hay GST); 60 giây ở

72°C, cuối cùng bổ sung thêm bước kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Trong chu trình nhiệt độ Ta phụ thuộc vào Tm của các cặp primer.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 2% trong 25 phút với thang chuẩn DNA 100bp (Bioline, Anh). Sản phẩm PCR các đoạn gen khuếch đại bởi các primer *Cyt-Cu/Zn SOD* là 221 bp, *GST* là 362 bp, *GPX* là 202 bp, *ACT* là 201 bp.

2.3.3.4. Tạo dòng gen *GST*, *Cyt-Cu/ZnSOD*, *GPX* và *ACT* trên vi khuẩn *Escherichia coli* DH5α

a. Tạo vector pGEM-T Easy tái tổ hợp mang trình tự gen mục tiêu

Sản phẩm PCR gen từ cDNA được chèn vào vector pGEM-T Easy. Thành phần phản ứng để gắn kết gen mục tiêu và vector thể hiện trong bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng nối DNA vào vector pGEM-T Easy

Thành phần	Thể tích (μl)
2X Rapid Ligation Buffer	5,0
pGEM-T Easy vector (50ng/μl)	1,0
T4 DNA ligase (3u/μl)	1,0
Sản phẩm PCR	3,0
Tổng thể tích	10

Thành phần phản ứng được trộn đều và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Nhờ sử dụng Taq DNA polymerase có đặc tính gắn thêm một deoxyadenosine ở mỗi đầu 3' của DNA được khuếch đại nên sản phẩm DNA được gắn vào vector pGEM-T Easy được thiết kế đặc biệt có hai đầu 3' tự do mang một base Thymine ở mỗi đầu, theo nguyên tắc bổ sung. Sau đó, enzyme T4 DNA Ligase giúp hình thành liên kết photphodiester giữa T và A trên cùng một mạch đơn tạo thành plasmid tái tổ hợp.

b. Tạo tế bào *E. coli* DH5α khả nạp

Tế bào *E. coli* DH5α được tạo theo quy trình của Huynh và ctv (2012). Lấy 1ml vi khuẩn *E. coli* DH5α cho vào 120 ml môi trường LB lỏng (phụ lục 2.1), nuôi cấy trong điều kiện lắc khoảng thời gian 16 - 18 giờ ở 37°C. Mẫu dịch *E. coli* được đo OD, giá trị OD_{600nm} trong khoảng 0,5 - 0,7 là đạt yêu cầu.

Dịch nuôi cấy sau đó được ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu cạn bỏ dịch nổi. Thêm 6 ml CaCl_2 50mM lạnh vào và huyền phù kết tủa. Sau đó ly tâm dịch huyền phù 4000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu cạn bỏ dịch nổi. Tiếp tục lặp lại bước trên với 6 ml CaCl_2 50mM. Cuối cùng thêm 6 ml glycerol 30% và tái huyền phù tế bào, glycerol có tác dụng giảm sốc cho tế bào khi rã đông. Tiến hành chia dịch tế bào khả nạp vào các tube để bảo quản ở -70°C.

c. Tạo tế bào *E. coli* DH5 α tái tổ hợp mang trình tự gen mục tiêu

DNA plasmid được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp đã chuẩn bị như mục b theo quy trình của bộ kit pGEM®-T Easy Vector Systems và bằng phương pháp sốc nhiệt. Đầu tiên hút 100 μl dịch huyền phù khả nạp vào tube 1,5 ml, thêm 5 μl DNA plasmid tái tổ hợp, đảo nhẹ và giữ lạnh trên đá 10 phút và ủ ở 42°C trong 90 giây để sốc nhiệt tế bào và giữ lạnh 4 phút. Thêm 500 μl môi trường LB lỏng vào tube và ủ ở 37°C ở 30 phút, ly tâm 1 phút ở 12000 vòng/phút. Hút bỏ 300 μl dịch nổi, phần còn lại đem cấy trên đĩa môi trường LB (phụ lục 2.1) có bổ sung Ampicillin/X-gal/IPTG. Thành phần hóa chất sử dụng bổ sung gồm: 200 μl Ampicillin (100 mg/L), 400 μl IPTG (100 mM) và 400 μl X-gal (20 mg/ml) được thêm vào trong 200 ml môi trường LB. Thể tích hút để cấy trang trên đĩa là 50 μl và ủ qua đêm ở 37°C (16 - 24 giờ). Quan sát màu khuẩn lạc trên đĩa petri để chọn các khuẩn lạc có mang DNA tái tổ hợp.

d. Chọn lọc dòng *E. coli* DH5 α mang DNA tái tổ hợp

Đoạn gen được chèn thành công vào vector pGEM-T Easy sẽ tạo khuẩn lạc màu trắng trên đĩa môi trường LB do phá vỡ trình tự mã hóa cho β -galactosidase. Điều này giúp kiểm tra và chọn lọc dòng tế bào tái tổ hợp. Tuy nhiên, để tuyển chọn đúng dòng tế bào *E. coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp (*E. coli* DH5 α - pGEM-T Easy - GST/Cyt-Cu/Zn SOD/GPX), đề tài đã tiến hành chọn lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc. Phản ứng PCR khuẩn lạc được thực hiện: Các khuẩn lạc trắng được cho vào 20 μl nước cất 2 lần vô trùng và sẽ được dùng trực tiếp làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR kiểm tra khuẩn lạc. Thành phần phản

ứng và chu trình nhiệt PCR khuôn lạc cùng bước kiểm tra sản phẩm bằng điện di tương tự như phản ứng PCR sử dụng mẫu cDNA (trình bày trong mục 2.3.4.4).

2.3.3.5. Ly trích DNA plasmid và giải trình tự gen

Từ các tế bào *E.coli* chọn lọc, tiến hành ly trích DNA plasmid và tinh sạch bằng kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System theo quy trình của bộ kit. Sau khi ly trích, các mẫu DNA plasmid được tiến hành điện di trên gel agarose 1,5% trong 15 phút ở 100V để kiểm tra, đồng thời tiến hành đo mật độ quang OD ở bước sóng 260 nm và 280 nm để xác định độ tinh sạch và nồng độ của DNA plasmid. Sự hiện diện của gen trên plasmid được kiểm tra bằng phương pháp PCR plasmid với cặp mồi đặc hiệu, điện di sản phẩm khuếch đại trên gel agarose 1,5% trong 25 phút. DNA plasmid sau khi kiểm tra được sử dụng xây dựng đường chuẩn.

Các đoạn gen mục tiêu được đem giải trình tự để xác định sản phẩm PCR thực sự là *Act*, *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* bằng thiết bị giải trình tự DNA tại Công ty Nam Khoa Biotek, TP.HCM. Dữ liệu thu được sau giải trình tự được xử lý bằng phần mềm tin sinh học BioEdit 7.0.5.3. Phân tích, kiểm tra và so sánh trình tự các nucleotide bằng Blast (NCBI), Clustal Omega.

2.3.3.6. Xây dựng đường chuẩn cho phản ứng Real-time PCR

Số lượng bản sao DNA plasmid mang gen mục tiêu được tính theo công thức:

$$N \text{ (copies/ml)} = \frac{6,022 \times 10^{23} \times C}{660 \times 10^9 \times L}$$

Trong đó: C: giá trị khối lượng trên một mẫu C (ng)

L: độ dài plasmid (base)

Một mole của cặp base trên đoạn DNA có khối lượng 660 g, do vậy một plasmid dài L base (tính cả đoạn DNA đã chèn vào plasmid) sẽ có khối lượng (660 x L) g hay (660 x 10⁹ x L) ng. Theo định luật Avogadro, 1 mole sẽ gồm có 6,022 x 10²³ phân tử hay là số copies plasmid. Do đó nếu dung dịch plasmid DNA có đơn vị nồng độ ng/ml thì giá trị khối lượng trên một mẫu C (ng) của

plasmid là tích của nồng độ và thể tích mẫu, từ đó số copies DNA plasmid có trong dung dịch này được tính.

Sau khi đã xác định được số lượng của bản copies trong mẫu DNA plasmid thể tích 10 μ l, mẫu DNA plasmid này sẽ được pha loãng 10 lần bằng Nuclease-free Water và thực hiện pha loãng liên tiếp n lần. Kết quả ta sẽ có các mẫu dung dịch có độ pha loãng là 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} cho đến 10^{-9} . Sau khi pha loãng các mẫu này được sử dụng để thực hiện phản ứng Real - time PCR, từ đó đường chuẩn sẽ được xác định làm cơ sở để định lượng cDNA gen trong các mẫu.

Đường chuẩn được thành lập dựa vào mối quan hệ tuyến tính của giá trị Ct thu nhận được từ phản ứng Real - time PCR và số bản copies được tính toán theo hệ số pha loãng 10 lần ở các mẫu chuẩn. Kết quả định lượng được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn, cụ thể kết quả Ct nhận được từ phản ứng Real - time PCR từ đó số bản copies của gen chuyển sẽ được tính toán dựa vào phương trình đường chuẩn (mỗi bản copies gen chống oxy hoá tương đương với một copy plasmid tái tổ hợp).

Trình tự primer đặc trưng cho gen mục tiêu tiếp tục được sử dụng trong phản ứng Real-time PCR sử dụng SYBR Green I làm chất phát huỳnh quang. Thành phần phản ứng có tổng thể tích là 20 μ l bao gồm 10 μ l 2x SensiFAST SYBR Hi-ROX Mix, DNA làm khuôn mẫu và cặp primer có nồng độ cuối là 0,4 μ M. Phản ứng Real-time PCR được thực hiện gồm 2 phút ở 95°C để hoạt hoá polymerase, 40 chu kỳ của giai đoạn biến tính (5 giây ở 95°C) và giai đoạn gắn kết và tổng hợp (35 giây ở 60°C) bổ sung chu kỳ phân tích đường cong nóng chảy để kiểm tra số sản phẩm được khuếch đại ở mỗi phản ứng bằng cách giữ ở 95°C trong 15 giây trước khi giữ 1 phút ở 60°C và cuối cùng giữ 15 giây ở 95°C. Các phản ứng được thực hiện trên hệ thống máy Applied Biosystem®7500 Real - time PCR. Các mẫu không xử lý chỉ được dùng làm đối chứng.

Sử dụng mức độ biểu hiện của mRNA của gen *Actin* làm gen nội chuẩn (housekeeping gene) để đánh giá tương đối mức độ biểu hiện của mRNA gen *Cyt-Cu/Zn SOD*, *GPX* và *GST* trong mẫu nghiên cứu. Sự biểu hiện mRNA của

đoạn gen *Cyt-Cu/Zn SOD*, *GPX* và *GST* được phân tích bằng công thức $2^{-\Delta\Delta Ct}$ trong đó ΔCt là độ chênh lệch chu kỳ ngưỡng giữa gen mục tiêu (gen *Cyt-Cu/Zn SOD* hoặc *GPX* hoặc *GST*) với gen nội chuẩn actin. Mức độ biểu hiện được thể hiện tương đối giữa nghiệm thức có xử lý chì so với đối chứng không có chì, sau khi đã được hiệu chuẩn với gen nội chuẩn actin.

2.3.3.7. Phân tích và đánh giá kết quả

Tỷ lệ biểu hiện gen được tính là tỷ số giữa log số bản copies ở mẫu thí nghiệm xử lý chì với log số bản copies ở mẫu đối chứng không xử lý chì (Huynh và ctv (2012)).

$$\text{Tỷ lệ biểu hiện gen (lần)} = \frac{\log (\text{số bản copies mẫu thí nghiệm})}{\log (\text{số bản copies mẫu đối chứng})}$$

Tỷ lệ biểu hiện của các gen chống oxy hoá được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV 15.1.02. Phân tích ANOVA được tiến hành, sau đó kiểm tra trắc nghiệm phân hạng bằng trắc nghiệm LSD với mức ý nghĩa $P = 0,05$ hoặc $0,01$.

2.4. Phân tích số liệu

Mẫu thực vật được chọn khảo sát ngẫu nhiên. Tất cả số liệu trong đề tài là trung bình cộng của 3 lần lặp lại và được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD. Dùng phần mềm Excel để vẽ đồ thị và phần mềm Statgraphics Centurion XV 15.1.02 để phân tích số liệu. Phân tích ANOVA được tiến hành, sau đó kiểm tra trắc nghiệm phân hạng với mức ý nghĩa $P = 0,05$ hoặc $0,01$ (Nguyễn Ngọc Kiểng, 2007).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. CƠ SỞ CHỌN LỰA ĐỐI TƯỢNG VÀ pH THÍCH HỢP CHO NGHIÊN CỨU

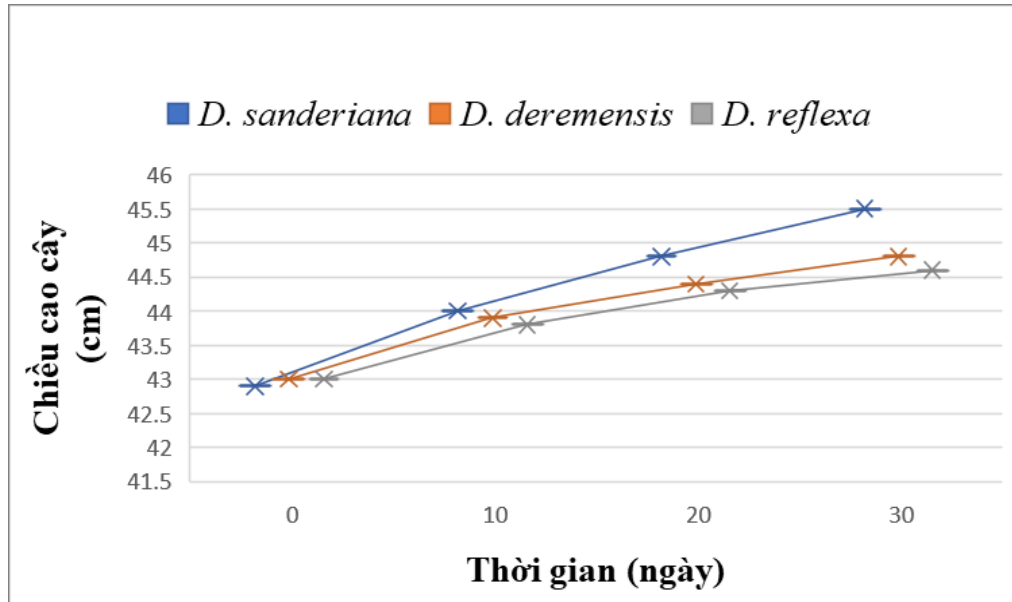
3.1.1 SỰ TĂNG TRƯỞNG VÀ KHẢ NĂNG TÍCH LŨY Pb CỦA BA LOÀI THỰC VẬT THUỘC CHI *DRACAENA* TRONG ĐIỀU KIỆN NHIỄM Pb

3.1.1.1 Sự tăng trưởng của ba loài thực vật chi *Dracaena*

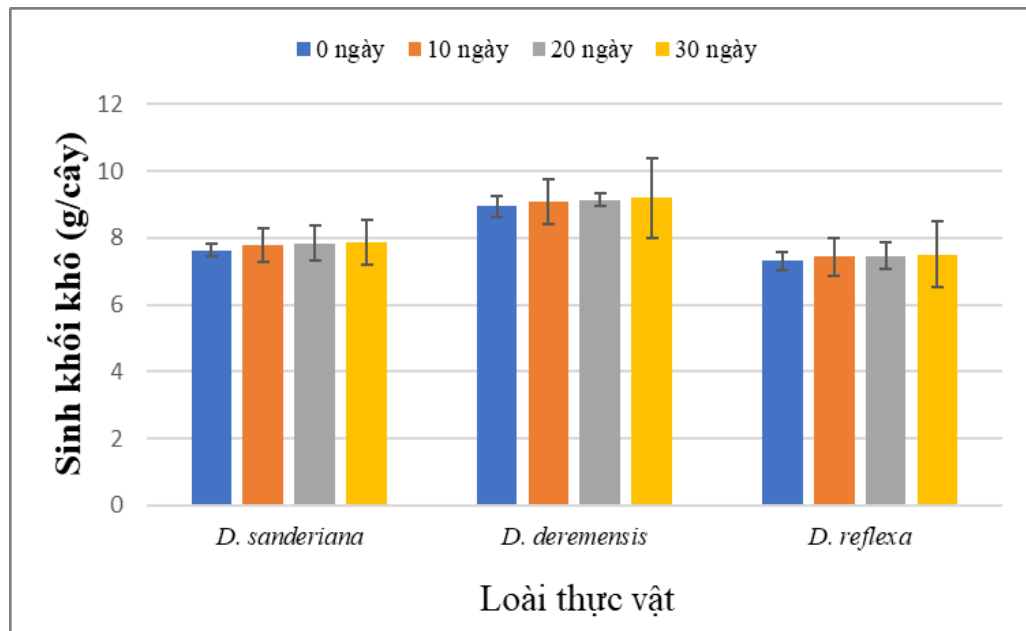
Sự tăng trưởng chiều cao cây và sinh khối khô của Phát tài lộc (*Dracaena sanderiana*), Trúc bách hợp (*Dracaena reflexa*) và Phát tài búp sen (*Dracaena deremensis*) ở nồng độ Pb 100 ppm là không có sự khác biệt so với đối chứng (cây không xử lý Pb) ($p < 0,05$) và cùng có xu hướng tăng dần qua thời gian tiếp xúc Pb (hình 3.1 và 3.2). Điều này cho thấy, nồng độ Pb 100 ppm không kìm hãm sự tăng trưởng của cả 3 loài thực vật chi *Dracaena*. Khi ở giai đoạn mới bắt đầu thí nghiệm, các cây Phát tài đều có chiều cao khoảng 43 cm và đến cuối ngày thứ 30 của thí nghiệm, chiều cao của *D. sanderiana* đạt 45,5 cm, *D. deremensis* đạt 44,8 cm và *D. reflexa* đạt 44,6 cm (hình 3.1). Đối với chỉ tiêu sinh khối khô, mặc dù sự biến thiên tăng trưởng ở mỗi loài thực vật qua các thời gian khảo sát không nhiều, các điểm biểu hiện cho sinh khối khô trên đồ thị có sự khác nhau không rõ rệt ($p < 0,05$), tuy nhiên, kết quả cho thấy sinh khối khô của 3 loài thực vật cũng tăng, sinh khối khô của *D. sanderiana*, *D. deremensis* và *D. reflexa* tăng tương ứng là 0,24 g; 0,21 g và 0,18 g sau 30 ngày thí nghiệm.

Pb ở nồng độ 100 ppm có hiệu quả tác động khác nhau đến tăng trưởng của 3 loài thực vật. Sau 30 ngày thí nghiệm, *D. sanderiana* có tốc độ tăng trưởng chiều cao và sinh khối khô cao hơn (0,08 cm/ngày chiều cao cây và 0,008 g/ngày sinh khối khô) so với 2 loài thực vật nghiên cứu còn lại, và thấp nhất là *D. reflexa* (0,06 cm/ngày chiều cao cây và 0,006 g/ngày sinh khối khô) ($p < 0,05$) (hình 3.1 và 3.2). Theo Chen và ctv (2016), hầu hết thực vật khi tiếp xúc với Pb, ngay cả ở nồng độ thấp cũng ảnh hưởng xấu đến quá trình sinh trưởng và phát triển. Các thông số sinh trưởng và phát triển thường giảm do stress Pb (Chen và ctv, 2016).

Tuy nhiên, ở các loài thực vật nghiên cứu, chiều cao cây và sinh khối khô vẫn tăng sau khi tiếp xúc với Pb ở nồng độ 100 ppm trong 30 ngày. Điều này cho thấy, 3 loài thực vật nghiên cứu có thể có khả năng chống chịu được Pb ở nồng độ 100 ppm, và trong đó loài *D. sanderiana* có khả năng cao nhất.



Hình 3.1: Sự tăng trưởng chiều cao cây của ba loài thực vật chi *Dracaena*



Hình 3.2: Sự tăng trưởng sinh khối khô của ba loài thực vật chi *Dracaena*

3.1.1.2. Khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của ba loài thực vật chi *Dracaena*

Cả 3 loài thực vật Phát tài lộc (*D. sanderiana*), Phát tài búp sen (*D. deremensis*) và Trúc bách hợp (*D. reflexa*) đều có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb và Pb được tích lũy ở cả 3 bộ phận rễ, thân và lá của cây. Tổng hàm lượng chì hấp thụ vào trong cây đã được xác định là 2340,38 mg/kg, 1843,48 mg/kg và 1741,00 mg/kg tương ứng lần lượt đối với *D. sanderiana*, *D. deremensis* và *D. reflexa*. Trong đó, tổng hàm lượng Pb hấp thụ và tích lũy trong loài *D. sanderiana* cao hơn ở 2 loài còn lại, và thấp nhất là loài *D. reflexa* ($p < 0,05$) (bảng 3.1). Tổng hàm lượng Pb tích lũy ở *D. deremensis* chiếm 78,77% và ở *D. reflexa* chiếm 74,39% so với *D. sanderiana*. Theo kết quả thống kê về số lượng thực vật có khả năng tích lũy Pb (60 loài thực vật) của Kumer và Prasad (2018), 3 giống Phát tài khảo sát có khả năng tích lũy Pb cao hơn một số loài thực vật như *Gophyllum fabago*, *Acalypha indica*, *Ophora japonica*, *Iris lacteal*, *Pisum sativum*, *Pluchea sagittalis* khi so sánh ở điều kiện thí nghiệm tương đồng.

Bảng 3.1. Hàm lượng Pb tích lũy trong *D. sanderiana*, *D. deremensis* và *D. reflexa*

Loài thực vật	(*)	Hàm lượng Pb (mg/kg TLK)			
		Rễ	Thân	Lá	Cây
<i>D. sanderiana</i>	KPH	1952,14 ^a ± 140,4	221,78 ^a ± 1,7	166,46 ^a ± 4,3	2340,38
<i>D. deremensis</i>	KPH	1695,70 ^b ± 33,4	46,67 ^c ± 1,7	101,11 ^b ± 7,3	1843,48
<i>D. reflexa</i>	KPH	1578,72 ^{bc} ± 55,1	104,86 ^b ± 9,1	57,42 ^c ± 8,6	1741,00

(Các chữ cái ở mỗi cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); TLK: Trọng lượng khô; KPH: Không phát hiện; (*): Hàm lượng Pb trong cây trước thí nghiệm; Ngưỡng phát hiện = 0,006 ppm)

Có sự giống nhau về hàm lượng Pb tích lũy trong các bộ phận giữa *D. sanderiana* và *D. reflexa*, đó là Pb tích lũy trong rễ cao nhất rồi đến thân và thấp nhất ở lá, nhưng ở loài *D. deremensis* thì khác, Pb tích lũy cao nhất trong rễ rồi đến lá và thấp nhất ở thân. Singh và ctv (2012) và Sharma (2016) đã báo cáo rằng, khả năng hấp thụ, tích lũy và phân bố Pb có sự khác nhau giữa các loài thực vật và cũng khác nhau giữa các bộ phận của cây. Tuy nhiên, nhìn chung kết quả cho thấy, Pb tích lũy nhiều nhất ở bộ phận dưới mặt đất (rễ) (chiếm 80,11% đến 89,72%) và tích lũy không nhiều ở các bộ phận trên mặt đất (thân và lá) (chiếm 10,28% đến 19,89%). Sự tập trung của Pb phần lớn ở rễ trong kết quả này phù hợp với nhận định của Vanek và ctv (2005). Vanek và ctv (2005) đã xác định tính di động của Pb thấp, chỉ khoảng 20% Pb được di chuyển lên các bộ phận bên trên của cây. Sự phân bố Pb trong mô thực vật liên quan đến sự di chuyển của Pb từ rễ đến các bộ phận bên trên của cây (chuyển hóa). Không giống như hầu hết các KLN khác, khả năng vận chuyển Pb lên các bộ phận thân và lá ở hầu hết thực vật rất thấp (Dogan và ctv, 2018).

3.1.1.3. Khả năng loại bỏ Pb trong nước của ba loài thực vật chi *Dracaena*

3 loài thực vật, Phát tài lộc (*D. sanderiana*), Phát tài búp sen (*D. deremensis*) và Trúc bách hợp (*D. reflexa*) đã được trồng trong nước bổ sung Pb nồng độ 100 ppm. Hàm lượng Pb trong nước được phân tích vào ngày thứ 30 của thí nghiệm và có kết quả lần lượt là 6,84 ppm; 15,62 ppm; và 33,23 ppm ở *D. sanderiana*, *D. deremensis* và *D. reflexa* (bảng 3.2).

Bảng 3.2 cho thấy, *D. sanderiana* có khả năng loại bỏ Pb cao hơn *D. deremensis* và *D. reflexa*. Sau 30 ngày thí nghiệm, *D. sanderiana* có sự khác biệt đáng kể trong việc loại bỏ Pb (93,16 %) so với 2 loài thực vật cùng thí nghiệm ($p < 0,05$), *D. deremensis* (84,34 %) và *D. reflexa* (66,77 %) (bảng 3.2). Khả năng loại bỏ Pb của loài thực vật *D. sanderiana* cao hơn cỏ chân vịt (*Lemna minor*) (76% ở nồng độ 20 ppm) (Singh và ctv, 2012) và lục bình (*Eichhornia crassipes*) (30% ở nồng độ 10 ppm) (Patel và ctv, 2018).

Bảng 3.2. Hiệu quả loại bỏ Pb trong nước của *D. sanderiana*, *D. deremensis* và *D. reflexa*

Ngày thí nghiệm (ngày)	Nồng độ Pb trong nước (ppm)			
	Đối chứng	<i>D. sanderiana</i>	<i>D. deremensis</i>	<i>D. reflexa</i>
0	100	100	100	100
30	100	6,84 ± 1,55	15,62 ± 0,92	33,23 ± 0,62
Hiệu quả loại bỏ Pb (%)	0	93,16	84,38	66,77

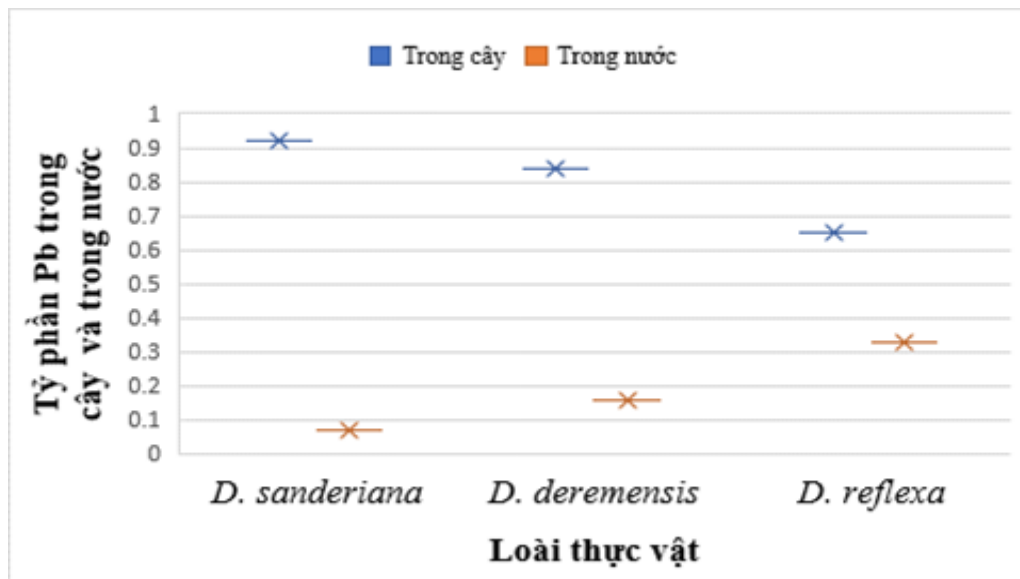
Bảng 3.3. Khả năng loại bỏ sinh học Pb của *D. sanderiana*, *D. deremensis* và *D. reflexa*

Các thông số khảo sát	Các loài thực vật thí nghiệm		
	<i>D. sanderiana</i>	<i>D. deremensis</i>	<i>D. reflexa</i>
Sinh khối khô (X _m) (g)	7,88 ± 0,017	9,19 ± 0,19	7,51 ± 0,12
Tổng chì tích lũy (mg Pb/g)	2,34 ± 0,04	1,84 ± 0,05	1,74 ± 0,10
Pb (mg/ X _m)	18,44	16,91	13,07
Pb (mg/200ml)	20	20	20
PMU (%) = Pb(mg/X _m)/Pb (mg/200ml) *100	92,20	84,55	65,34

Để xác định khả năng loại bỏ sinh học Pb của các loài thực vật chi *Dracaena*, PMU được xác định trên từng loài thí nghiệm. Các giá trị PMU, hàm lượng Pb tích lũy trong sinh khối khô (Pb (mg/X_m)), Hàm lượng Pb trong dung dịch (Pb (mg/200ml)) và sinh khối của cây được xác định ở bảng 3.3.

Giá trị PMU thay đổi tùy thuộc vào loài thực vật khi tiếp xúc với Pb ở nồng độ 100 ppm. PMU đạt cao nhất ở loài *D. sanderiana* (92,20%) và thấp nhất ở loài *D. reflexa* (65,34%). Kết quả này một lần nữa cho thấy loài *D. sanderiana* có khả năng loại bỏ Pb cao hơn so với 2 loài thực vật còn lại. Phương pháp xử lý Pb bằng thực vật *D. sanderiana* từ môi trường nước có thể được xem là phương pháp xử lý hiệu quả hơn so với xử lý bằng 2 thực vật *D. deremensis* và *D. reflexa*, với hơn 2g Pb được tích lũy trong 1kg cây (trọng lượng khô).

Kết quả ở bảng 3.2 và bảng 3.3 cũng cho thấy có sự tương đồng giữa hiệu quả loại bỏ Pb khi phân tích mẫu nước và mẫu cây ở 3 loài thực vật. Điều này có nghĩa là lượng chì mất đi trong nước chính là lượng Pb đã được cây hấp thụ. Kết quả đánh giá tỷ lệ Pb trong cây và trong nước ở hình 3.3 cho thấy, cùng chi *Dracaena*, nhưng loài thực vật khác nhau thì khả năng hấp thụ Pb cũng khác nhau, và loài *D. sanderiana* có khả năng hấp thụ Pb cao nhất, vì hàm lượng Pb trong cây cao nhất và hàm lượng Pb còn lại trong nước thấp nhất.



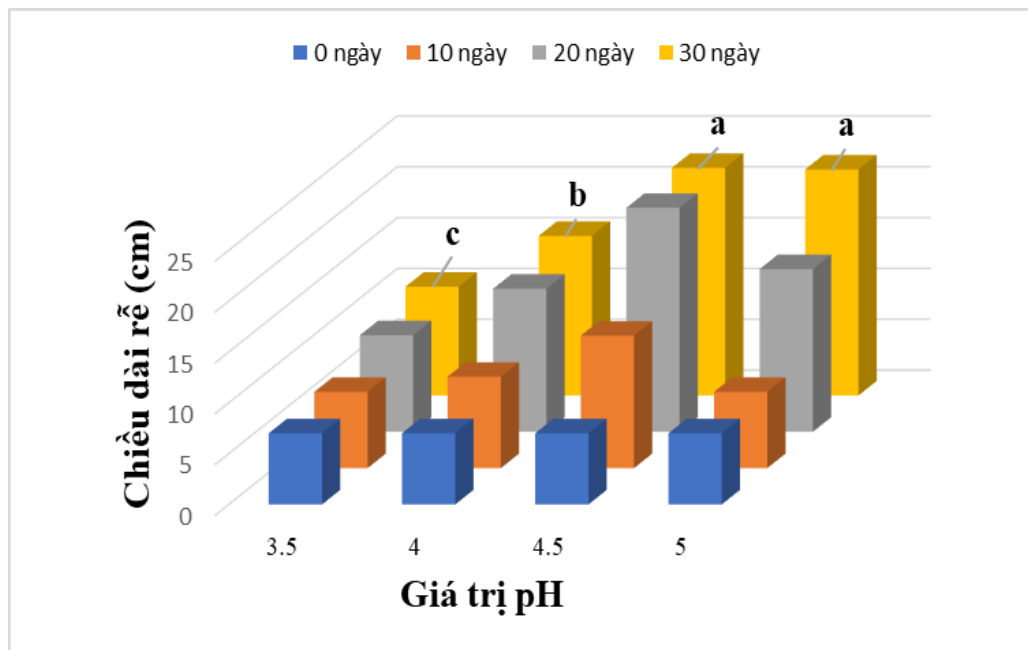
Hình 3.3. Tỷ phần Pb trong cây và trong nước sau 30 ngày thí nghiệm

Như vậy, loài thực vật *D. sanderiana* có khả năng tăng trưởng, hấp thụ, tích lũy và loại bỏ Pb cao nhất trong 3 loài thực vật thuộc chi *Dracaena*. Ngoài ra với các đặc điểm khác như dễ nhân giống, giá trị kinh tế cao nên sẽ không khan hiếm nguồn thực vật xử lý, những đặc điểm này sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc sử dụng *D. sanderiana* xử lý môi trường. Vì vậy đề tài chọn loài thực vật *D. sanderiana* làm đối tượng nghiên cứu cho các thí nghiệm tiếp theo.

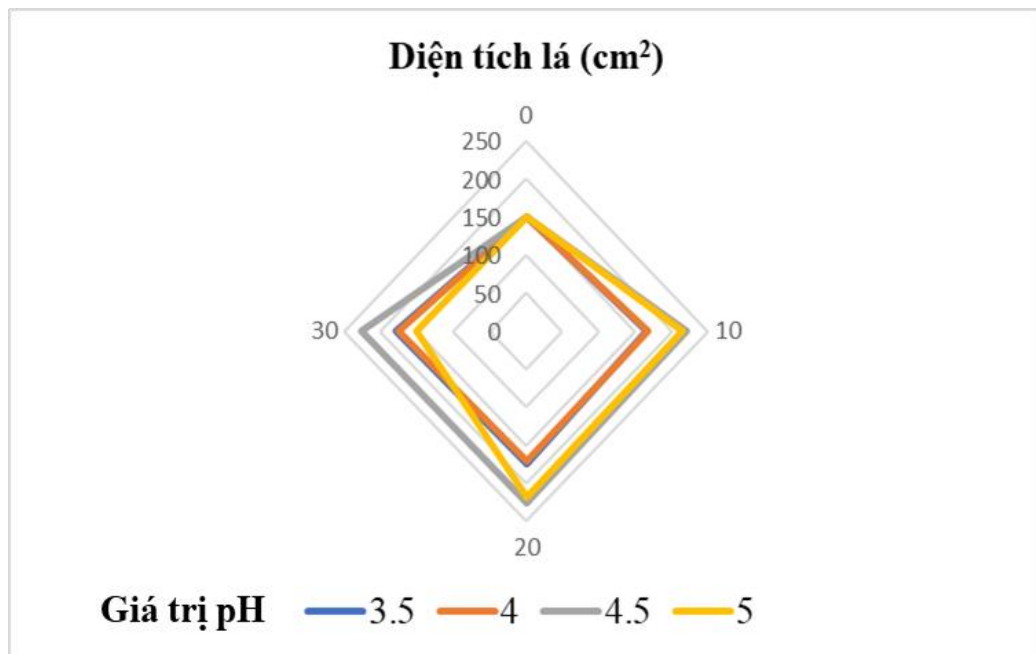
3.1.2. ẢNH HƯỞNG CỦA pH ĐẾN KHẢ NĂNG HẤP THỤ VÀ TÍCH LŨY Pb CỦA CÂY PHÁT TÀI

3.1.2.1 Ảnh hưởng của pH đến sự tăng trưởng của cây Phát tài ở nồng độ Pb 100 ppm

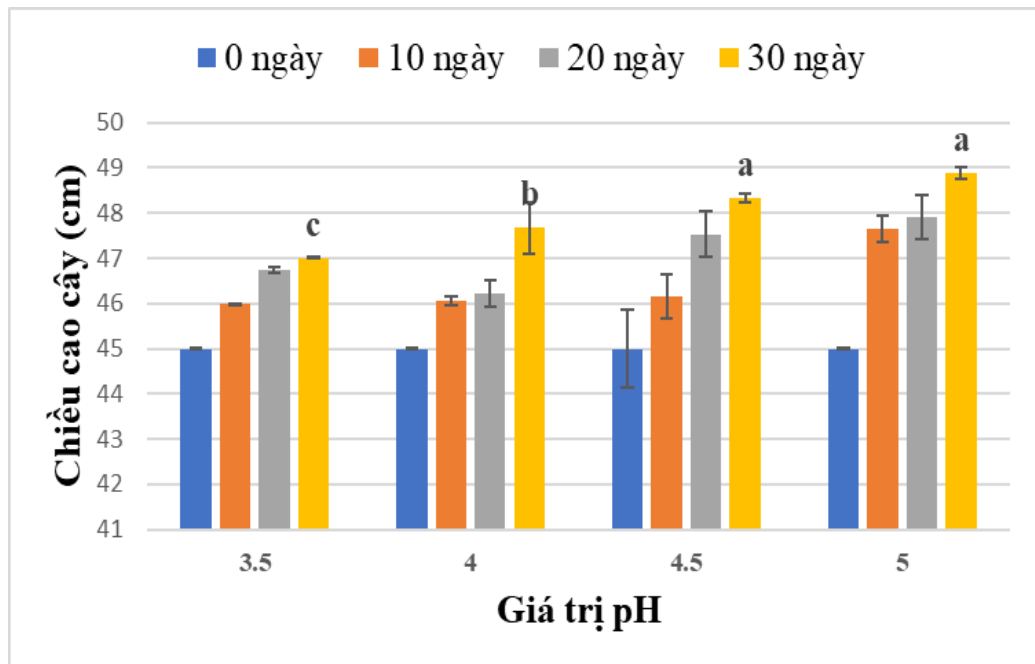
Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của các giá trị pH đến sự tăng trưởng của cây Phát tài ở nồng độ Pb 100 ppm được thể hiện ở hình 3.4, 3.5 và 3.6 cho thấy, các giá trị pH khảo sát không làm ức chế sự kéo dài của rễ, sự tăng diện tích lá và chiều cao cây. So với tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm, các giá trị chiều dài rễ, diện tích lá và chiều cao cây đều tăng và tăng dần qua các giai đoạn thí nghiệm. Tuy nhiên hiệu quả tăng trưởng của cây có sự khác biệt đáng kể ở các giá trị pH khảo sát ($p < 0,05$). Sự tăng trưởng chiều dài rễ và chiều cao cây ở pH 4,5 và 5,0 cao hơn pH 4,0 và 3,5. Sự tăng trưởng chiều dài rễ và chiều cao cây giảm dần khi pH giảm từ 4,5 xuống 3,5. Sự tăng trưởng chiều dài rễ và chiều cao cây ở pH 4,5 và 5,0 không có sự khác biệt ($p < 0,05$) với 22,39 cm ở pH 4,5 và 22,03 cm ở pH 5,0 cho chỉ tiêu chiều dài rễ và 48,33 cm ở pH 4,5 và 48,88 ở pH 5,0 cho chỉ tiêu chiều cao cây (hình 3.4 và 3.6). Riêng diện tích lá, cây có sự tăng trưởng cao nhất ở pH 4,5 (226,09 cm²), kế đến là pH 5,0 và pH 4,0 và thấp nhất là ở pH 3,5 (180 cm²) (hình 3.5). Như vậy, trong môi trường bổ sung Pb 100 ppm có pH 4,5 và 5,0, cây *Dracaena sanderiana* sinh trưởng tốt hơn trong môi trường có pH 3,5 và 4,0 và ở pH thấp nhất (pH = 3,5), sự tăng trưởng của cây Phát tài chậm hơn đáng kể.



Hình 3.4. Sự tăng trưởng chiều dài rễ của cây Phát tài ở các pH khác nhau (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)).



Hình 3.5. Sự tăng trưởng diện tích lá của cây Phát tài ở các pH khác nhau



Hình 3.6. Sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài ở các pH khác nhau

(Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)).

3.1.2.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp thụ và tích lũy Pb trong cây *Dracaena sanderiana*

Độ pH của dung dịch được xem là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến quá trình hấp thụ KLN của thực vật. Các KLN khác nhau có độ pH tối ưu khác nhau cho sự hấp thụ của chúng, vì pH có ảnh hưởng đến độ hòa tan của KL. Đối với Pb, pH càng thấp thì khả năng hòa tan Pb (II) càng cao, khi pH trung tính Pb (II) kết tủa (Kabata, 2001). Cho nên đề tài đã chọn dãy pH dưới trung tính là pH 3,5; pH 4,0; pH 4,5 và pH 5,0 để khảo sát khả năng hấp thụ Pb (II) của thực vật *Dracaena sanderiana* và kết quả được trình bày ở bảng 3.4.

Kết quả bảng 3.4 cho thấy, các mẫu cây Phát tài trước thí nghiệm không phát hiện có sự hiện diện của Pb trong rễ, thân hoặc lá. Nhưng sau 30 ngày thí nghiệm, các mẫu rễ, thân và lá ở các nghiệm thức đều có sự hiện diện của Pb. Điều này cho thấy cây Phát tài có khả năng hấp thụ Pb từ môi trường nước ở khoảng pH từ 3,5 đến 5,0 và đem tích lũy vào trong các bộ phận của cây.

Bảng 3.4. Hàm lượng chì tích lũy trong các bộ phận của *D. sanderiana* ở pH khác nhau

pH	(*)	Hàm lượng chì (mg/kg TLK)			
		Rễ	Thân	Lá	Cây
3,5	KPH	725,8 ^d ±1,6	53,2 ^d ±9,9	39,5 ^d ±1,8	818,5 ^d ±9,3
4,0	KPH	1141,6 ^b ±0,6	129,8 ^a ±2,7	41,3 ^c ±2,6	1312,7 ^b ±3,4
4,5	KPH	2353,3 ^a ±0,3	107,5 ^b ±2,6	83,7 ^a ±3,7	2544,5 ^a ±3,9
5,0	KPH	1097,2 ^c ±0,3	87,2 ^c ±2,3	82,8 ^b ±3,5	1267,2 ^c ±5,4

(Các chữ cái trên mỗi cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$); KPH: không phát hiện; TLK: Trọng lượng khô; (*): Hàm lượng Pb trong cây trước thí nghiệm; Ngưỡng phát hiện = 0,006 ppm)

Cùng nồng độ Pb xử lý là 100 ppm, nhưng ở pH khác nhau, cây tích lũy Pb trong các bộ phận cũng khác nhau, điều này cho thấy pH có ảnh hưởng đến sự hấp thụ Pb cũng như hàm lượng Pb tích lũy trong cây. Ở giá trị pH 4,5 hàm lượng Pb tích lũy trong rễ, thân và lá ở các thời gian theo dõi cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Sau 30 ngày thí nghiệm, tổng hàm lượng Pb tích lũy trong cây ở môi trường có pH 4,5 cao hơn so với pH 3,5 là 3,1 lần, pH 4,0 là 1,94 lần và pH 5,0 là 2 lần. Điều này có thể là do pH 4,5 là môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng và hấp thụ Pb của cây Phát tài. Raskin và Ensley (2000) đã cho biết pH có ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ KLN của thực vật, và ở pH thấp thì cây hấp thụ KLN nhiều hơn. Tuy nhiên kết quả đề tài cho thấy khác với ý kiến này, cây Phát tài hấp thụ Pb thấp nhất ở pH 3,5. Điều này có thể do môi trường dung dịch quá axit đã gây ngộ độc cho rễ làm cho rễ hấp thụ Pb ít hơn. pH 5,0 không làm ảnh hưởng bất lợi cho cây, nhưng ở nghiệm thức này, Pb có hiện tượng kết

tủa nhẹ nên có thể cũng đã hạn chế sự hấp thụ Pb ở cây. Kết quả bảng 3.4 cũng cho thấy, so với hàm lượng Pb tích lũy trong thân và lá thì hàm lượng Pb tích lũy trong rễ ở các nghiệm thức cao hơn và chiếm chủ yếu (chiếm 88,7% ở pH 3,5, 87% ở pH 4,0, 92,5% ở pH 4,5 và 86,6% ở pH 5,0).

Khả năng di động của các ion kim loại đối với thực vật là một yếu tố quan trọng để thực hiện thành công phytoremediation. Theo Kabata (2001), khả năng di động của Pb bị hạn chế nếu độ hòa tan của nó thấp. Pb có xu hướng tạo phức chất với các keo hữu cơ và vô cơ và kết tủa ở dạng hydroxyl, carbonate và phosphate (Kabata, 2001). Khi nghiên cứu về khả năng hấp thụ Pb của các loài tảo biển *Sargassum* sp., *Pasina* sp., và *Gracilaria* sp., Kabata (2001) đã phát hiện, Pb tồn tại dưới dạng ion tự do ở pH < 5, và nó thay đổi thành dạng rắn (kết tủa) trên độ pH này. Trước đó, Low và ctv (2000) đã khảo sát khả năng hấp thụ Pb của một loại hạt và đã cho biết Pb kết tủa ở pH > 6,0. Vì vậy, với kết quả cho thấy Pb kết tủa ở pH = 5,0 của nghiên cứu này và dư lượng dưới dạng rắn đóng lại ở đáy thùng đã khẳng định Pb chỉ hòa tan ở pH < 5,0. Cho nên đề tài sẽ chọn pH 4,5 cho các thí nghiệm ở nội dung 2 và 3.

Như vậy, qua kết quả so sánh khả năng tích lũy Pb của 3 loài thực vật Phát tài lộc (*D. sanderiana*), Phát tài búp sen (*D. deremensis*) và Trúc bách hợp (*D. reflexa*) và kết quả ảnh hưởng của pH đến sự hấp thụ và tích lũy Pb, đề tài đã chọn ra được loài thực vật nghiên cứu thích hợp nhất là loài phát tài lộc (*Dracaena sanderiana*) và pH dung dịch thích hợp là 4,5.

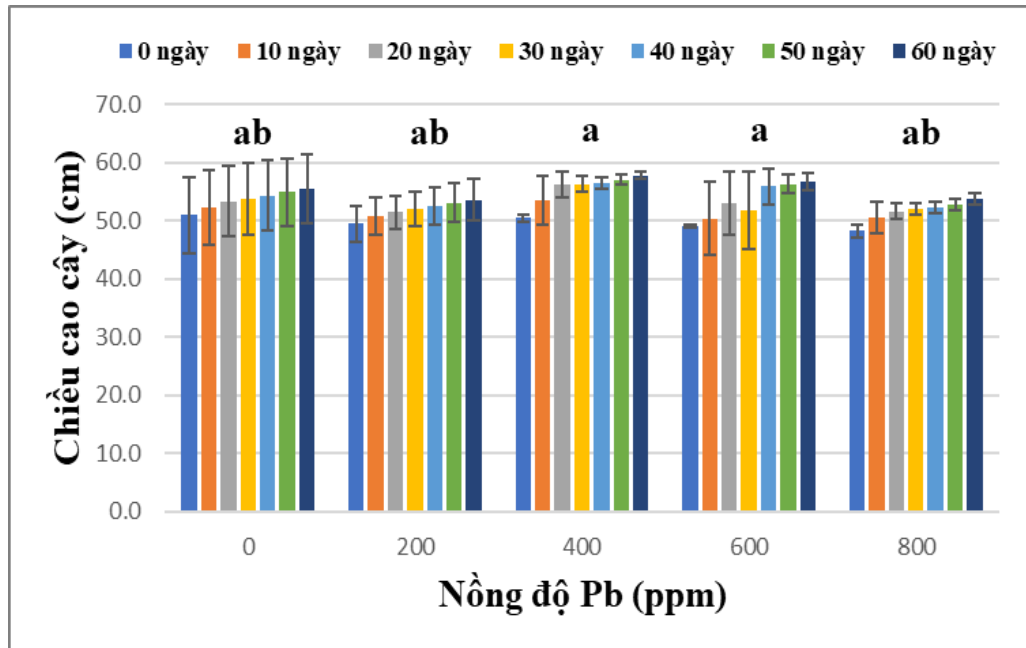
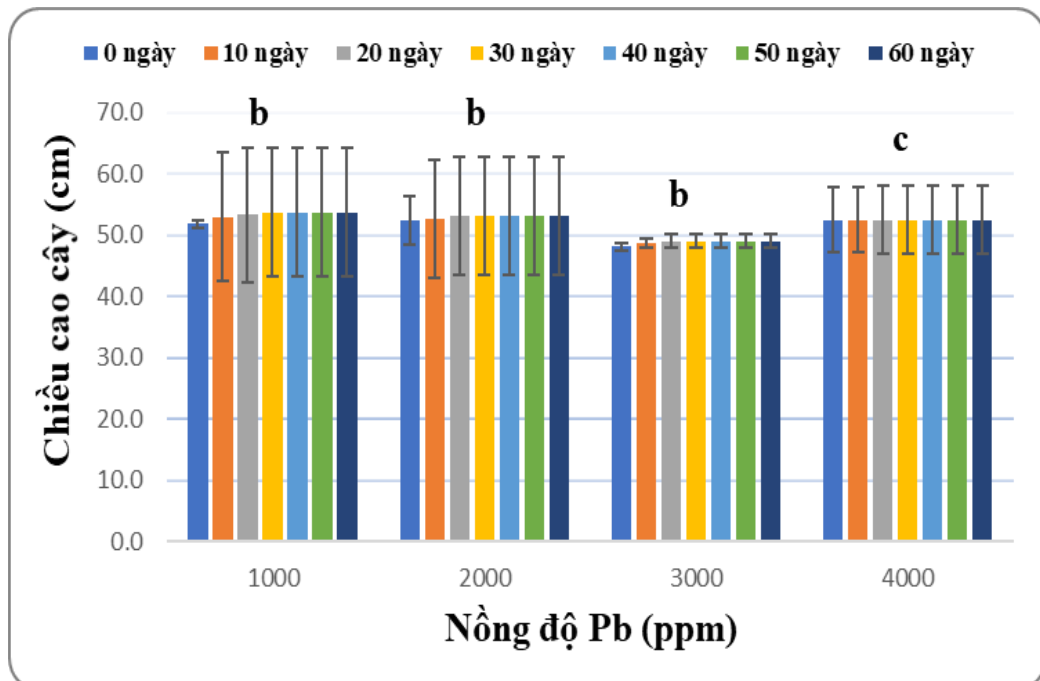
3.2. KHẢ NĂNG HẤP THỤ, TÍCH LŨY VÀ PHÂN BỐ CHÌ (Pb) CỦA CÂY PHÁT TÀI TRONG MÔI TRƯỜNG NHIỄM ĐỘC Pb

3.2.1. Sự sinh trưởng của cây Phát tài

3.2.1.1. Sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài

Nồng độ Pb < 1000 ppm không làm ức chế sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài. Chiều cao cây tăng liên tục (từ 8,5 % đến 15,6%), cao hơn tại các thời gian khảo sát so với giai đoạn bắt đầu thí nghiệm và không có sự khác biệt so với cây đối chứng (cây không xử lý Pb tăng 8,9%) ($p < 0,05$) (hình 3.7a).

(a) Sự tăng trưởng chiều cao cây ở môi trường nhiễm Pb < 1000 ppm

(b) Sự tăng trưởng chiều cao cây ở môi trường nhiễm Pb ≥ 1000 ppm

Hình 3.7. Sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau. (a): Nồng độ < 1000 ppm; (b): Nồng độ ≥ 1000 ppm
 (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Nồng độ Pb ≥ 1000 ppm làm ức chế sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài. Khả năng tăng trưởng chiều cao cây ở các nồng độ 1000, 2000, 3000 và 4000 ppm chỉ đạt tương ứng là 3,7%; 1,4%, 1,8% và 0,06% so với chiều cao ban đầu (hình 3.7b) và giảm đến 58%, 84%, 80% và 99% so với cây đối chứng. Sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài bị ức chế mạnh ở nồng độ 4000 ppm. Ở nồng độ này, chiều cao cây gần như không thay đổi qua các thời gian khảo sát.

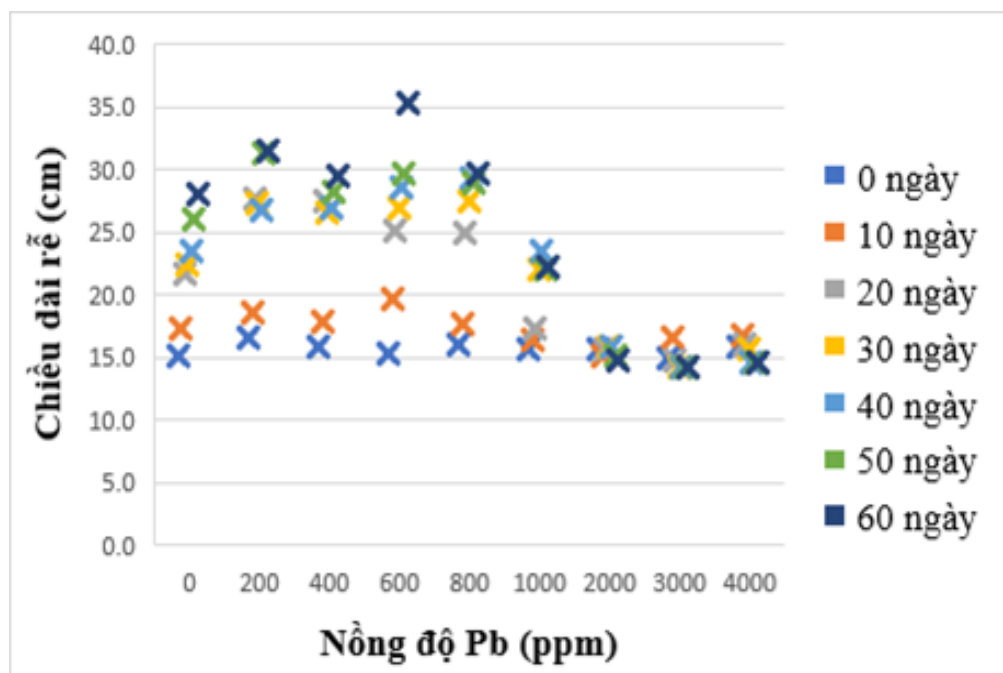
Hiện tượng nồng độ Pb càng tăng càng có tác động ức chế sự phát triển chiều cao cây cũng đã được chứng minh trên một số loài như *Acalypha indica* và *Medicago sativa*. Chiều cao cây *Acalypha indica* và *Medicago sativa* giảm từ 24% - 49% ở các nồng độ Pb 100, 200, 300, 400 và 500 ppm (Venkatachalam và ctv, 2017). Chiều cao cây chậm phát triển khi tiếp xúc với Pb có thể do rối loạn chuyển hóa chất dinh dưỡng và quá trình quang hợp bị ảnh hưởng (Gupta và ctv, 2009).

3.2.1.2. Sự tăng trưởng chiều dài rễ của cây Phát tài

Tương tự chiều cao cây, sự tăng trưởng chiều dài rễ cũng không bị kìm hãm ở nồng độ Pb < 1000 ppm. Rễ cây Phát tài ở các nồng độ Pb 200 đến 800 ppm kéo dài liên tục qua các thời gian tiếp xúc và cao hơn 5% đến 55% so với đối chứng, trong đó chiều dài rễ ở nồng độ Pb 600 ppm cho kết quả cao nhất (tăng hơn so với đối chứng 55%) (hình 3.8). Điều này cho thấy nồng độ Pb < 1000 ppm có thể có tác động kích thích tăng trưởng chiều dài rễ ở cây Phát tài.

Ngược lại, nồng độ Pb ≥ 1000 ppm có tác động ức chế đến sự phát triển của chiều dài rễ. Chiều dài rễ của cây ở nồng độ 1000 ppm chỉ tăng khoảng 51% so với đối chứng, trong khi đó ở các nồng độ 2000, 3000 và 4000 ppm hầu như không thấy có sự biến thiên và chiều dài rễ sau 60 ngày thí nghiệm ngắn hơn so với giai đoạn ban đầu thí nghiệm. Rễ có hiện tượng co lại và sưng phồng lên. Nồng độ Pb xử lý càng tăng thì chiều dài rễ càng ngắn. Azmat và ctv (2006) cũng đã phát hiện Pb ở nồng độ 250 ppm làm giảm chiều dài rễ ở 2 loài thực vật *Phaseolus mungo* và *Lens culinaris*. Ở một số loài thực vật như *Triticum aestivum*, *Z. mays* L., *Pisum sativum* và *Sedum alfredii*, sự giảm chiều dài của rễ

dưới độc tính của Pb cũng đã được báo cáo (Gupta và ctv, 2009). Sự tăng trưởng chậm của bộ rễ cũng có thể là nguyên nhân làm giảm chiều cao cây trong điều kiện ngộ độc Pb ở nồng độ ≥ 1000 ppm do giảm khả năng hấp thu nước và dinh dưỡng để nuôi các phần phía trên cây. Rễ cây kém phát triển dưới tác động của nồng độ Pb ≥ 1000 ppm có thể do Pb ức chế sự phân chia tế bào rễ và ức chế sự kéo dài của tế bào rễ dẫn đến sự suy yếu mô rễ làm cho rễ hút nước và dinh dưỡng kém và kéo dài chu kỳ tế bào (Azmat và ctv, 2006).

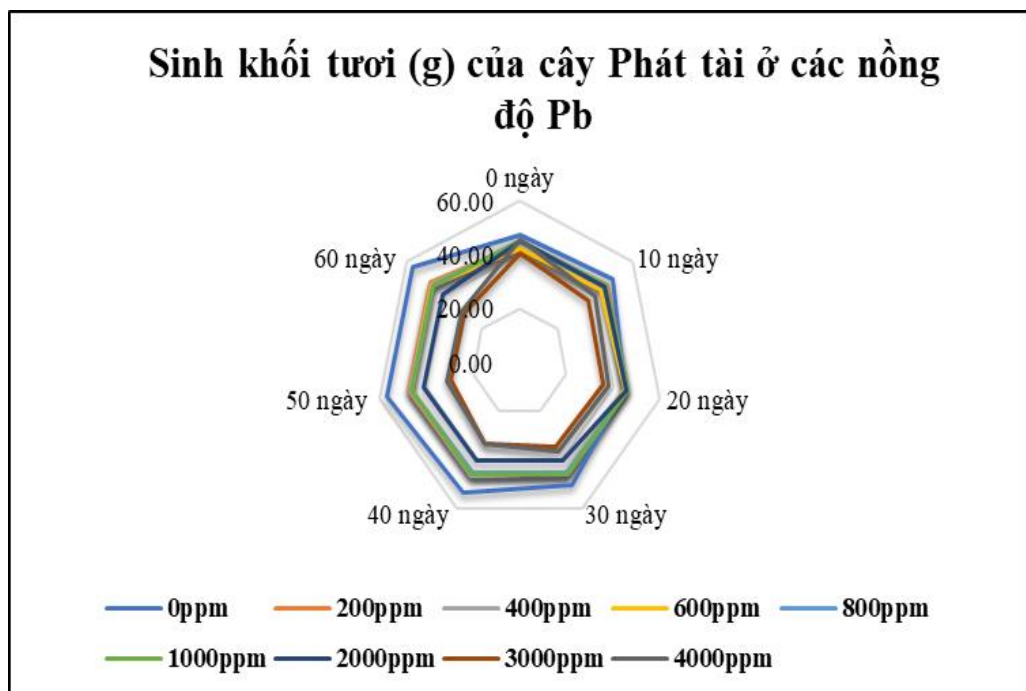


Hình 3.8. Sự tăng trưởng chiều dài rễ cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau

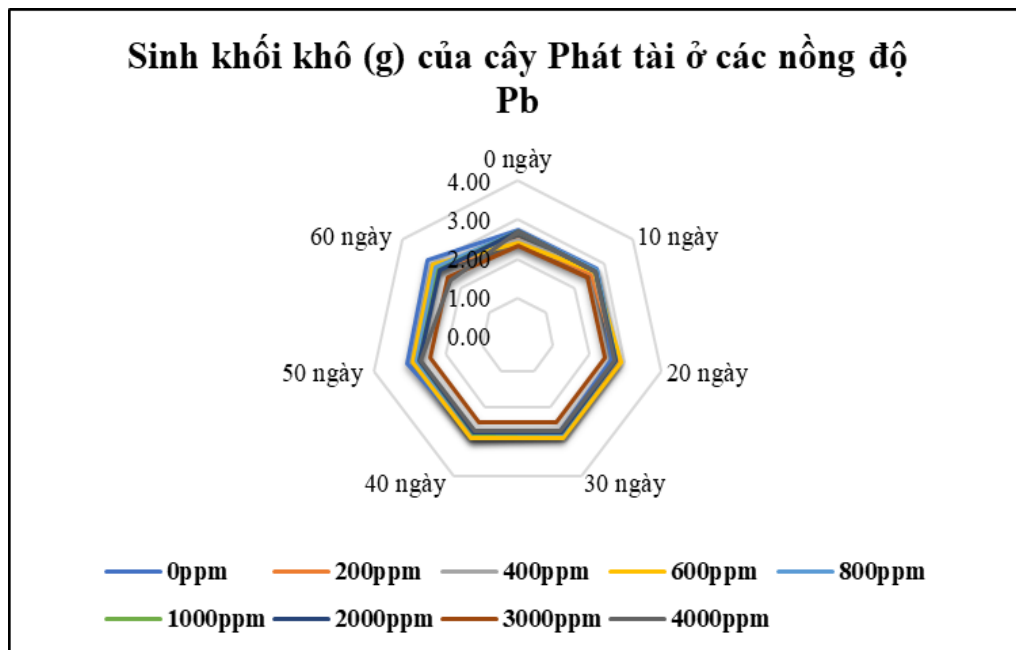
3.2.1.3. Sự tăng trưởng sinh khối tươi và khô của cây Phát tài

Sinh khối của cây là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của cây, sinh khối cây tăng chứng tỏ cây sinh trưởng và phát triển tốt. Sự sinh trưởng của cây Phát tài trong môi trường nhiễm độc Pb cũng được đánh giá qua chỉ tiêu sinh khối tươi và khô của cây. Kết quả ở hình 3.9 và hình 3.10 cho thấy rằng, khả năng tổng hợp sinh khối tươi và khô của các cây Phát tài ở các nồng độ Pb khảo sát đều thấp hơn các cây đối chứng. Điều này cho thấy việc Pb có tác động bất lợi cho sự sản sinh sinh khối của cây Phát tài. Nồng độ Pb

càng tăng thì khả năng tổng hợp sinh khối tươi và khô của cây Phát tài càng giảm. Sinh khối tươi của cây tiếp xúc với Pb ở nồng độ 200 đến 4000 ppm giảm từ 11% đến 52,8%, và sinh khối khô giảm từ 12% đến 49,2% so với đối chứng, trong đó sinh khối tươi và khô của cây giảm thấp nhất ở nghiệm thức 600 ppm. Trong khi đó nồng độ Pb < 1000 ppm có tác động không đáng kể đến sự tăng trưởng sinh khối tươi và khô của cây thì nồng độ Pb $\geq$ 1000 ppm có tác động tiêu cực đáng kể đối với cả sinh khối tươi và khô của cây, sinh khối tươi và khô của cây giảm ngay khi tiếp xúc với Pb và thời gian tiếp xúc càng dài thì sinh khối càng giảm. Kết quả tương tự đã được tìm thấy trên *Ligustrum lucidum*, cây có khả năng sinh trưởng đến nồng độ 600 ppm với sự tăng trưởng sinh khối tươi và khô đạt 70,7 và 69,3% so với đối chứng. Khi nồng độ Pb tăng lên 1000 ppm, sinh khối tươi và khô bị ảnh hưởng đáng kể (Zhou và ctv, 2016).



Hình 3.9. Sự tăng trưởng sinh khối tươi của cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau



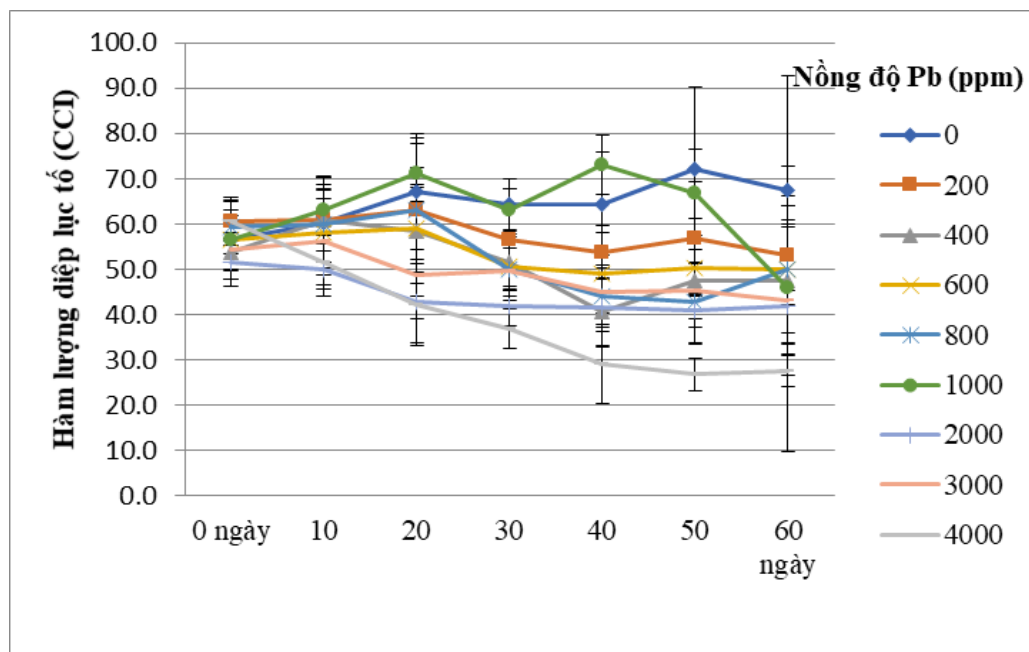
Hình 3.10. Sự tăng trưởng sinh khối khô của cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau

Sinh khối thực vật là một chỉ số quan trọng đặc trưng cho hiệu suất sinh trưởng của thực vật khi có KLN. Trong điều kiện nhiễm độc Pb nghiêm trọng, cây trồng có các triệu chứng ức chế sinh trưởng rõ ràng và sinh khối thực vật có thể bị hạn chế. Giảm sinh khối thực vật có thể có liên quan đến sự tổn thương của bộ rễ dẫn đến việc giảm hấp thu dinh dưỡng cho cây và các hoạt động trao đổi chất bị xáo trộn (Chen và ctv, 2016). Sinh khối tươi và khô của cây Phát tài bị giảm có thể do ảnh hưởng của việc giảm tăng trưởng chiều cao cây và chiều dài rễ, đồng thời có thể do giảm diện tích lá làm cho quá trình quang hợp bị ức chế và giảm hàm lượng nước trong cây (Chen và ctv, 2016).

3.2.1.4. Sự tổng hợp diệp lục tố trong lá của cây Phát tài

Nồng độ và thời gian tiếp xúc với Pb có tác động khác nhau đến sự tổng hợp diệp lục tố trong lá cây Phát tài (hình 3.11). Nồng độ Pb càng cao và thời gian tiếp xúc càng dài thì sự tổng hợp diệp lục tố càng giảm. Hàm lượng diệp lục tố trong lá giảm 12,4%; 11,7%; 11,7%; 15,7%, 18,5%, 18,7%, 21% và 51,3% so với đối chứng tương ứng với các nồng độ 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000 và 4000 ppm ở thời điểm 60 ngày của thí nghiệm. Như vậy trong lá có thể đã xảy

ra quá trình phân hủy diệp lục tố do tác động của Pb. Diệp lục tố bị phân hủy nhiều nhất ở nồng độ Pb 4000 ppm và thấp nhất ở 400 và 600 ppm. Điều này có thể là do sự tác động của Pb đã làm gia tăng hoạt động của enzyme chlorophyllase phân hủy diệp lục tố (Khan ctv, 2018). Cũng có thể do stress Pb có liên quan đến việc giảm tổng hợp hàm lượng diệp lục tố do các chất dinh dưỡng Mg, Fe và Cu đã được thay thế bằng Pb. Sự suy giảm hàm lượng diệp lục tố có ảnh hưởng đến sự hấp thụ và phân phối các chất dinh dưỡng thiết yếu dẫn đến giảm sự sinh trưởng và phát triển của cây (Chen và ctv, 2016). Hàm lượng diệp lục tố trong lá bị phân hủy sau khi tiếp xúc với Pb cũng đã được báo cáo ở loài thực vật *Sesbania drummondii* làm cho lá bị úa vàng và khô mép lá (Venkatachalam và ctv, 2017). *Perennial ryegrass* có hàm lượng diệp lục tố thấp hơn đáng kể so với đối chứng khi tiếp xúc ở Pb 500 ppm (Bai, 2015). Hàm lượng diệp lục tố ở cây Hướng dương (*Helianthus annuus*) giảm đáng kể ở nồng độ Pb 300 và 600 ppm (Saleem và ctv, 2017). Sự giảm hàm lượng diệp lục tố cũng đã được quan sát thấy ở nhiều loài thực vật *Najas indica* và *Wolffia arrhizal* (Singh và ctv, 2010).

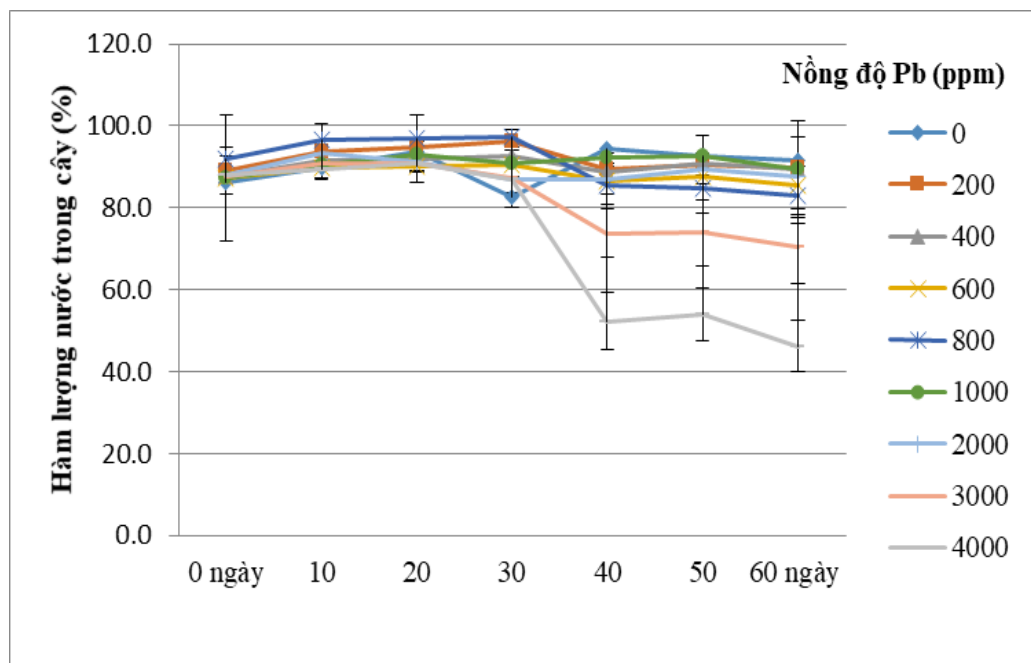


Hình 3.11. Sự biến động hàm lượng diệp lục tố trong lá cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau

Cây Phát tài có triệu chứng nhiễm độc nặng sau 30 ngày tiếp xúc với Pb nồng độ 4000 ppm. Hầu hết số lá trên cây chuyển sang vàng hơn và héo. Khi thời gian tiếp xúc Pb tăng lên đến 60 ngày, tất cả các triệu chứng này càng rõ ràng hơn và làm chết cây.

3.2.1.5. Hàm lượng nước trong cây Phát tài

Hàm lượng nước trong cây Phát tài tiếp xúc với Pb có sự biến động qua các thời gian khảo sát, có xu hướng tăng ở thời gian 0 - 20 ngày thí nghiệm và giảm ở các ngày sau đó (hình 3.12). Nếu so sánh với đối chứng, tất cả nồng độ Pb khảo sát đều làm giảm hàm lượng nước trong cây Phát tài. Hàm lượng nước giảm từ 1% đến 51% ở các nghiệm thức bổ sung Pb 200 - 4000 ppm so với nghiệm thức không bổ sung Pb. Nồng độ Pb càng tăng thì càng làm giảm hàm lượng nước. Hàm lượng nước giảm 1% - 2,4% ở các nồng độ Pb 200 - 600 ppm, giảm 5,5% - 12,5% ở nồng độ Pb 800 - 2000 ppm và giảm 25,3% - 51,2% ở nồng độ Pb 3000 - 4000 ppm (hình 3.12).



Hình 3.12. Sự biến động hàm lượng nước trong cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau

Nồng độ Pb cao sẽ gây bất lợi đáng kể đến hàm lượng nước trong cây. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy nồng độ Pb cao làm giảm hàm lượng nước ở thực

vật bị phơi nhiễm Pb và gây rối loạn sự cân bằng nước trong cây. Pb có thể làm giảm tính mềm dẻo của vách tế bào và ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng nước trong tế bào (Pourrut và ctv, 2014). Việc giảm sự tăng trưởng cũng đã được cho biết có liên quan đến việc làm suy giảm hàm lượng nước tương đối trong cây khi cây sinh trưởng trong điều kiện tiếp xúc với Pb, gây ra sự chậm phát triển chiều cao cây dẫn đến làm giảm diện tích lá, cơ quan thoát hơi nước chính của cây; giảm hàm lượng diệp lục tố dẫn đến giảm tổng hợp sinh khối; giảm tăng trưởng rễ dẫn đến giảm khả năng hấp thu nước (Chen và ctv, 2016).

3.2.1.6. Khả năng chống chịu độc tố chì (Pb) của cây Phất tài

Đánh giá khả năng chịu đựng kim loại là chỉ tiêu quan trọng khi lựa chọn thực vật để sử dụng trong xử lý môi trường (Wang và ctv, 2014). Khả năng chống chịu độc tố kim loại của cây được đánh giá qua chỉ số chống chịu (tolerance index) (Wang và ctv, 2014) dựa trên các chỉ tiêu sinh trưởng. Chỉ số chống chịu (TI) được xác định để đánh giá khả năng mà cây sinh trưởng trong sự hiện diện của một nồng độ Pb nhất định.

Bảng 3.5: Khả năng chống chịu Pb của cây Phất tài

	Nồng độ Pb (ppm)							
	200	400	600	800	1000	2000	3000	4000
TI (%)	80,38	93,53	114,47	82,32	32,12	-	-	-

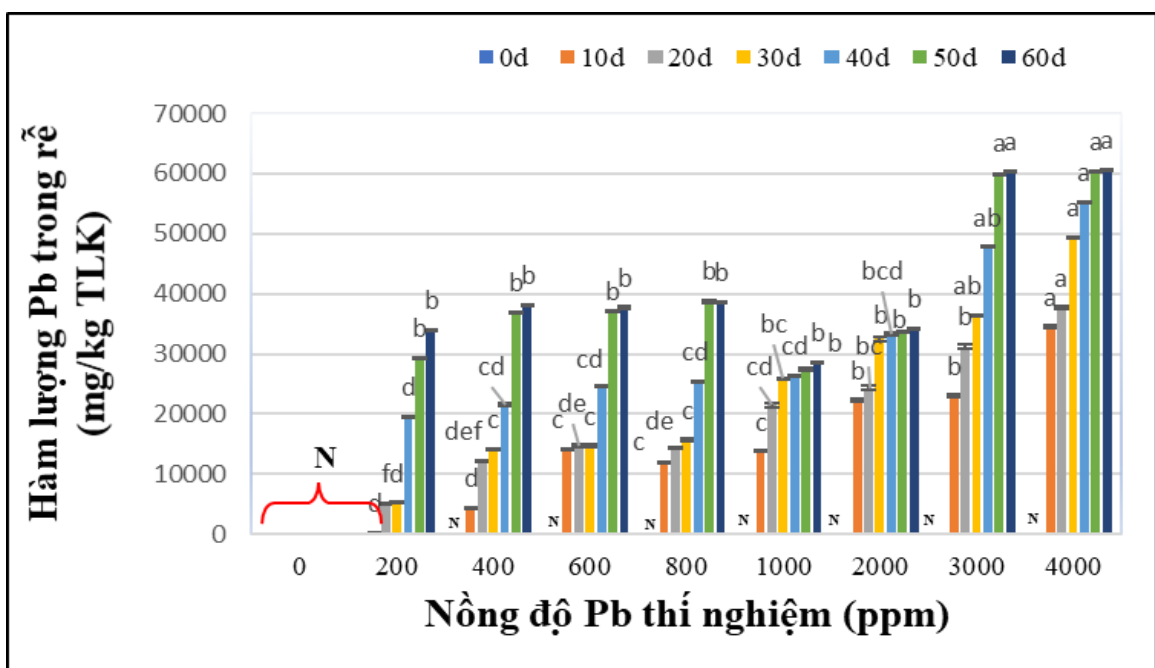
Khả năng chống chịu Pb của cây Phất ở nồng độ Pb 200, 400, 600, 800, 1000 ppm tương ứng là 80,38%; 93,53%; 114,47%; 82,32%; 32,12% (bảng 3.5). Ở nồng độ > 800 ppm, nồng độ Pb càng cao, khả năng chống chịu Pb của cây càng giảm. Điều này cho thấy, khi cây Phất tài sống trong điều kiện nhiễm độc Pb > 1000 ppm thì khả năng chống chịu Pb của cây rất thấp hoặc không có khả năng chống chịu. Wang và ctv (2014) đã cho thấy có sự chịu đựng Pb đáng kể ở các loài *Salix integra* (Weishanhu, Yizhibi và Dahongtou), tất cả ba loại *S. integra* được thử nghiệm có thể chịu đựng Pb cao (TI > 60%) và Weishanhu là

giống chịu đựng Pb nhất. Như vậy, so với 3 giống của loài *Salix integra* này thì cây Phát tài có khả năng chịu đựng Pb cao hơn ($TI > 80\%$) ở các nồng độ Pb ≤ 800 ppm.

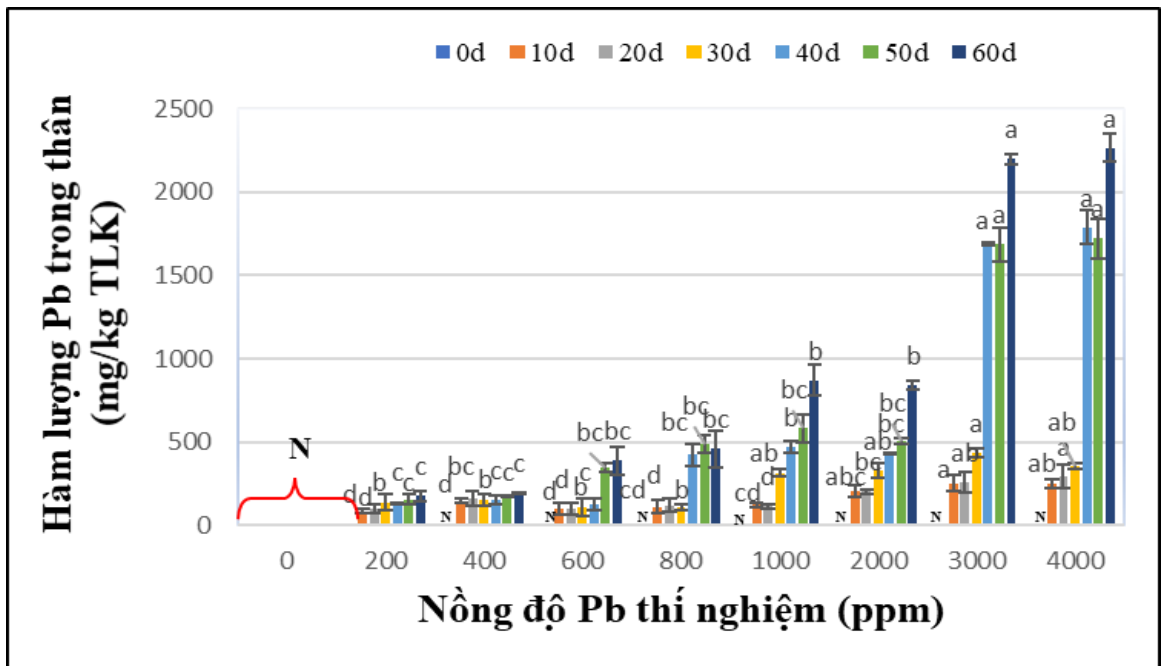
3.2.2. Khả năng tích lũy chì trong cây Phát tài

3.2.2.1. Hàm lượng Pb tích lũy trong rễ, thân và lá của cây Phát tài

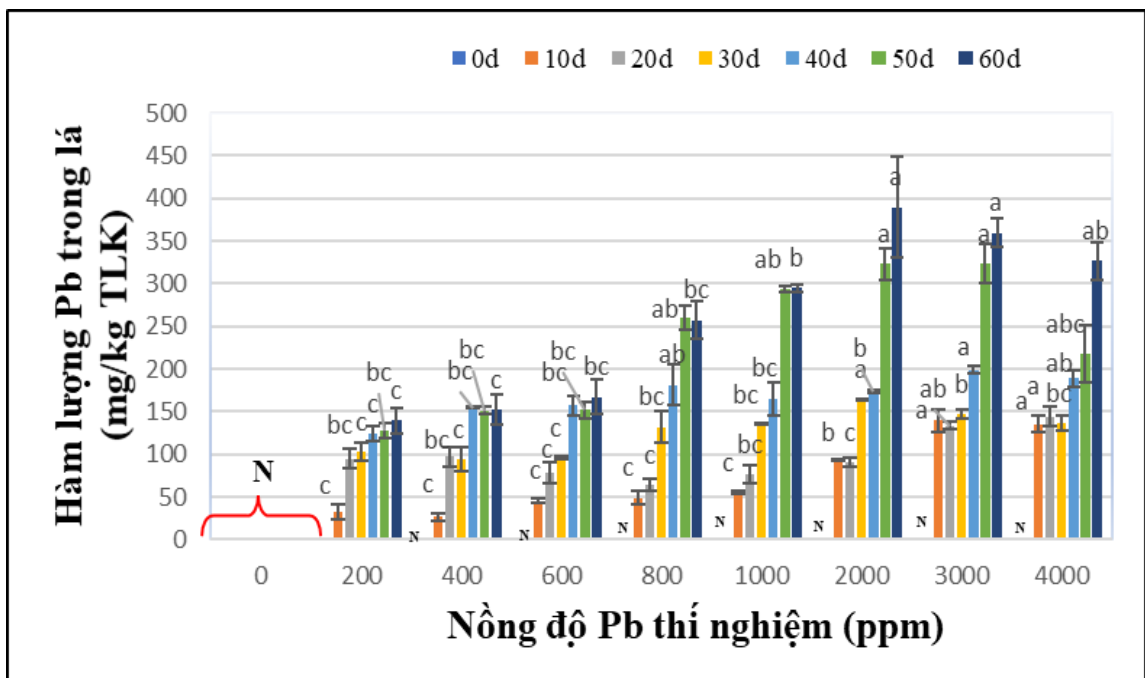
Kết quả hàm lượng Pb tích lũy trong các bộ phận rễ, thân và lá cây Phát tài tại 7 thời điểm được thể hiện ở hình 3.13, hình 3.14 và hình 3.15.



Hình 3.13. Hàm lượng Pb tích lũy trong rễ của cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau (Các chữ cái ở các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$)); d: ngày thí nghiệm, N: không phát hiện; TLK: Trọng lượng khô, Ngưỡng phát hiện = 0,006 ppm)



Hình 3.14. Hàm lượng Pb tích lũy trong thân của cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau (Các chữ cái ở các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$)); d: ngày thí nghiệm, N: không phát hiện; TLK: Trọng lượng khô, Ngưỡng phát hiện = 0,006 ppm)



Hình 3.15. Hàm lượng Pb tích lũy trong lá của cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau (Các chữ cái ở các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự

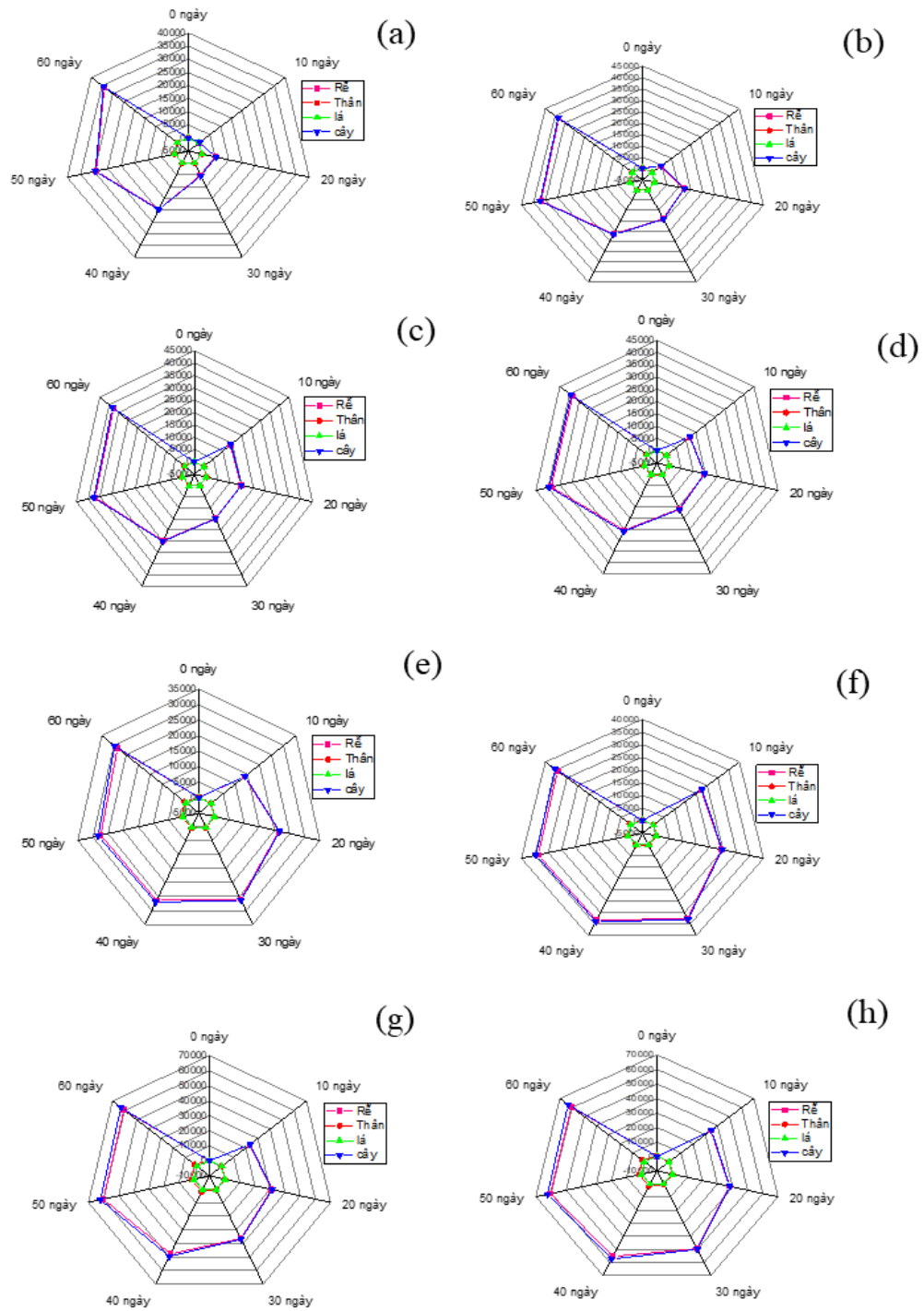
khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$)); d: ngày thí nghiệm, N: không phát hiện; TLK: Trọng lượng khô, Ngưỡng phát hiện = 0,006 ppm)

Trong rễ, thân và lá cây Phát tài, hàm lượng Pb tích lũy tăng dần theo thời gian. Tuy nhiên tốc độ tích lũy lại phụ thuộc vào nồng độ Pb và bộ phận của cây. Trong rễ, ở nồng độ Pb < 1000 ppm, hàm lượng Pb tích lũy tăng chậm trong vòng 30 ngày đầu và nhanh dần sau đó (hàm lượng Pb trong rễ ban đầu là không phát hiện, ở 30 ngày là 5252,2; 14156,9; 14782,7 và 15739,7 mg/kg TLK và 60 ngày là 33959,9; 38053,4; 37701,5 và 38518,0 mg/kg TLK tương ứng với nồng độ Pb 200, 400, 600 và 800 ppm). Ngược lại, ở nồng độ Pb $\geq$ 1000 ppm, hàm lượng Pb tích lũy tăng nhanh trong vòng 30 ngày đầu và chậm dần sau đó, với hàm lượng Pb ban đầu là không phát hiện, 30 ngày là 25893,9; 32547,1; 36473,3 và 49477,1 mg/kg TLK; và 60 ngày là 28552,2; 34320,6; 60430,0 và 60570,0 mg/kg TLK tương ứng lần lượt với các nồng độ Pb 1000, 2000, 3000 và 4000 ppm. Dấu hiệu dừng tích lũy Pb trong rễ sau 60 ngày thí nghiệm xảy ra ở hầu hết nồng độ. Hàm lượng Pb trong rễ ở 50 ngày không khác biệt so với 60 ngày ($p < 0,05$) (hình 3.13). Trong thân, ở tất cả nồng độ Pb khảo sát, hàm lượng Pb tích lũy tăng chậm trong 30 ngày đầu và nhanh dần sau đó và có xu hướng tiếp tục tăng sau 60 ngày thí nghiệm, với hàm lượng Pb trong thân ban đầu là không phát hiện, 30 ngày là 139,11; 152,97; 106,75; 109,19; 314,42; 327,69; 436,42; 352,54 mg/kg TLK; và 60 ngày là 175,82; 194,74; 388,66; 459,56; 869,64; 842,85; 2197,17; 2263,83 mg/kg TLK tương ứng lần lượt ở các nồng độ Pb tăng dần (hình 3.14). Ngược lại, ở lá, hàm lượng Pb tích lũy tăng nhanh ở 30 ngày đầu và tăng chậm sau đó, với hàm lượng Pb ở 30 ngày là 102,57; 93,60; 95,67; 131,90; 134,80; 164,17; 147,20; 136,33 mg/kg TLK; 60 ngày là 139,11; 151,85; 167,03; 257,01; 294,80; 389,52; 359,54; 326,19 mg/kg TLK và dấu hiệu tích lũy có xu hướng tiếp tục tăng sau 60 ngày thí nghiệm (hình 3.15).

Nồng độ Pb trong dung dịch nước có ảnh hưởng đến khả năng tích lũy Pb trong các bộ phận của cây Phát tài (hình 3.13; 3.14 và 3.15). Hàm lượng Pb tích lũy trong rễ, thân và lá ở các nồng độ có xu hướng tăng lên theo sự gia tăng nồng

độ Pb và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Nồng độ Pb trong môi trường càng cao thì cây tích lũy Pb càng nhiều. Tuy nhiên, thời gian tiếp xúc Pb càng dài thì hàm lượng Pb trong rễ ở các nồng độ càng ít khác biệt (cụ thể là hàm lượng Pb tích lũy trong rễ ở các nồng độ 200, 400, 600, 800, 1000 và 2000 ppm có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ ở thời gian 0 ngày đến 40 ngày, nhưng không khác biệt ở thời gian 50 ngày và 60 ngày ($p < 0,05$)) (hình 3.13). Điều này cho thấy, cây Phát tài có thể có ngưỡng tích lũy nhất định, khi đạt ngưỡng tích lũy này thì cây sẽ không tiếp tục hấp thụ Pb từ bên ngoài.

Cây Phát tài có khả năng tích lũy trong rễ một lượng Pb cao nhất là 38518,01 mg/kg TLK trong môi trường có nồng độ Pb < 1000 ppm và 60570 mg/kg TLK trong môi trường có nồng độ Pb > 1000 ppm (ở 60 ngày của thí nghiệm) (đây có thể là ngưỡng tích lũy Pb của cây Phát tài). So với cây dương xỉ (*Pteris vittata*) có hàm lượng Pb trong rễ là 3157,89 mg/kg TLK (Trần Văn Tựa, 2011), cây Phát tài có khả năng tích lũy Pb trong rễ cao hơn. Cây trâm ổi (*Lantana camara* L.) chịu đựng được mức độ ô nhiễm 4000 ppm, sau 1 ngày hàm lượng Pb tích lũy trong rễ ở nồng độ 4000 ppm là 5252 mg/kg (Diệp Thị Mỹ Hạnh và ctv, 2007). Nếu so sánh hàm lượng Pb tích lũy trong rễ sau 1 ngày với cây trâm ổi, kết quả cho thấy cây Phát tài tích lũy thấp hơn với 60570 mg/kg trong 60 ngày tương ứng với 1009,5 mg/kg trong 1 ngày. Khả năng tích lũy Pb trong thân và lá của cây Phát tài cũng cho thấy cao hơn một số loài thực vật như *Chrysopogon zizanioides*, *Ricinus communis*, *Conyza canadensis*, *Oryza sativa*, *Pfaffia glomerata*, *Elsholtzia splendens* (Kumar và ctv, 2018), với hàm lượng Pb trong thân cao nhất là 2263,83 mg/kg TLK (ở nồng độ 4000 ppm) và trong lá là 389,52 mg/kg TLK (ở nồng độ 2000 ppm).



Hình 3.16: Sự tích lũy Pb trong các bộ phận của cây Phát tài ở 60 ngày thí nghiệm. (a): 200 ppm, (b): 400 ppm, (c): 600 ppm, (d): 800 ppm, (e): 1000 ppm, (f): 2000 ppm, (g): 3000 ppm và (h): 4000 ppm

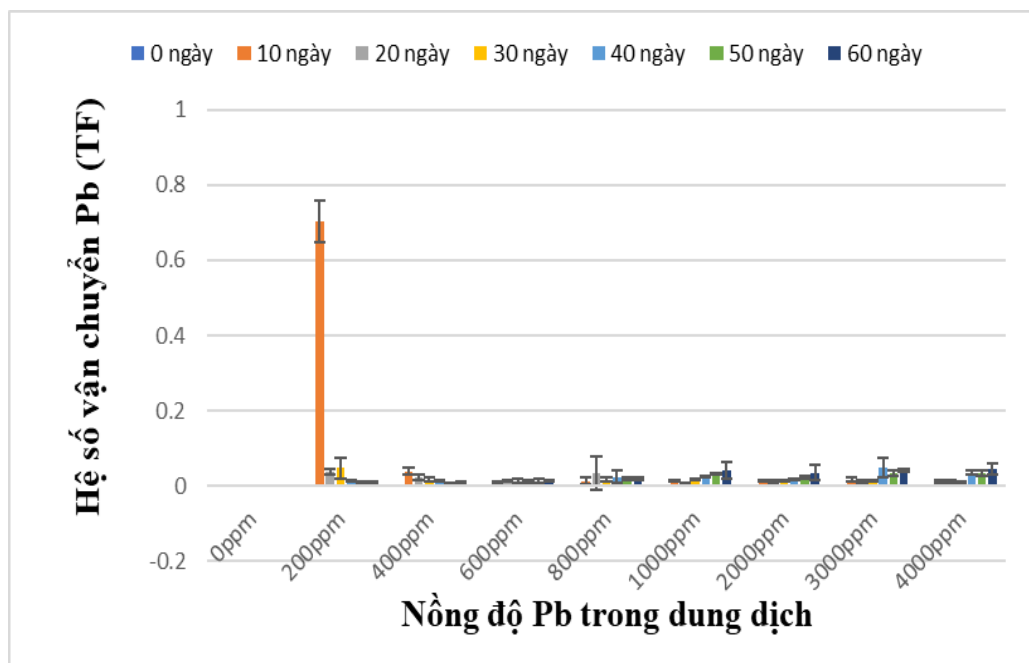
Hàm lượng Pb trong các bộ phận của cây Phát tài ở tất cả các nồng độ Pb được xếp theo thứ tự rễ > thân > lá (hình 3.16), cho thấy càng lên cao khả năng vận chuyển Pb càng chậm dần. Điều này tương tự như các cây trâm ôi (*Lantana camara* L.) (Diệp Thị Mỹ Hạnh và ctv, 2007), *Armeria maritima*, *Agrostis tenuis* và *Cardaminopsis halleri* (Dahmani và ctv, 2000). Ở nồng độ Pb từ 200 đến 4000 ppm, hàm lượng Pb tích lũy trong rễ ở 60 ngày biến động trong khoảng 95,90% đến 99,10%, và trung bình tích lũy là 97,50%. Hàm lượng Pb tích lũy trong thân ở 60 ngày biến động trong khoảng 0,51% đến 3,58%, và trung bình tích lũy là 1,95%. Hàm lượng Pb tích lũy trong lá ở 60 ngày biến động trong khoảng 0,32% đến 1,10%, và trung bình tích lũy là 0,55% (hình 3.16). Như vậy, cơ chế mà cây Phát tài sử dụng để hấp thụ Pb có thể là phytofiltration. Theo cơ chế này, Pb được hấp thụ và tích lũy chủ yếu trong rễ.

Quan sát hình 3.16 a, b, c và d có thể thấy, không có sự khác biệt ($p < 0,05$) giữa hàm lượng Pb tích lũy trong thân và trong lá ở nồng độ Pb < 1000 ppm (đường biểu diễn nằm chồng lên nhau). Tuy nhiên, ở nồng độ Pb ≥ 1000 ppm, nồng độ càng tăng thì hàm lượng Pb trong thân và lá càng khác biệt (đường biểu diễn tách biệt nhau) (hình 3.16 e, f, g và h). Điều này cho thấy, trong điều kiện nhiễm độc Pb ở nồng độ cao, cây Phát tài tập trung vận chuyển Pb lên thân, lá. Đây cũng có thể là phản ứng chống chịu nhiễm độc Pb của cây Phát tài.

3.2.2.2. Khả năng vận chuyển Pb từ rễ lên thân, lá của cây Phát tài

Hệ số vận chuyển (TF) (translocation factor) thường được sử dụng để đánh giá khả năng thực vật vận chuyển kim loại từ rễ đến các phần bên trên của cây. Khi $TF < 1$, khả năng vận chuyển kim loại từ rễ lên thân lá thấp (thực vật tích lũy kim loại chủ yếu trong rễ). Ngược lại, khi $TF > 1$, khả năng vận chuyển kim loại từ rễ lên thân lá cao (thực vật tích lũy kim loại chủ yếu trong thân và lá) (Marchiol và ctv, 2004). Kết quả tính giá trị của hệ số vận chuyển của cây Phát tài ở hình 3.17 cho thấy, TF ở tất cả nồng độ và thời gian đều < 1. Điều này cho biết, khả năng vận chuyển Pb của cây Phát tài từ rễ lên thân lá thấp, phần lớn Pb hấp thụ được cây tích lũy chủ yếu trong rễ, chỉ một phần nhỏ được chuyển lên

thân và lá. Ở một số loài thực vật được khảo sát, Cheraghi và ctv (2011) đã phát hiện 2 loài *Cirsium congestum* và *Cardaria draba* cũng tích lũy Pb trong rễ cao hơn trong chồi. *Cirsium congestum* tích lũy 7073,7 mg/kg trong rễ và 2473 mg/kg trong chồi. *Cardaria draba* tích lũy 6119,3 mg/kg trong rễ và 4251mg/kg trong chồi. Cây dương xỉ (*Pteris vittata*) tích lũy 3157,89 mg/kg trong rễ và 112,50 mg/kg trong thân sau 2 tháng thí nghiệm. Việc tích lũy chì chủ yếu trong rễ cũng đã được báo cáo ở nhiều loài: *Vicia faba*, *Pisum sativum* (Malecka và ctv, 2009), *Lathyrus sativus* (Brunet và ctv, 2008) và *Phaseolus vulgaris* (Shahid và ctv, 2011).



Hình 3.17. Hệ số vận chuyển Pb (TF) ở cây Phát tài

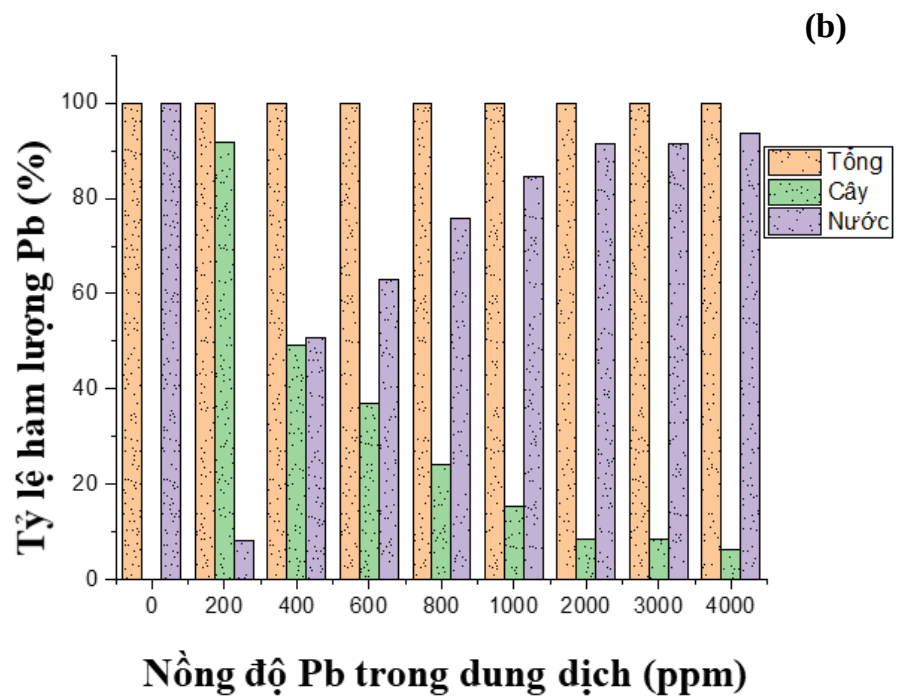
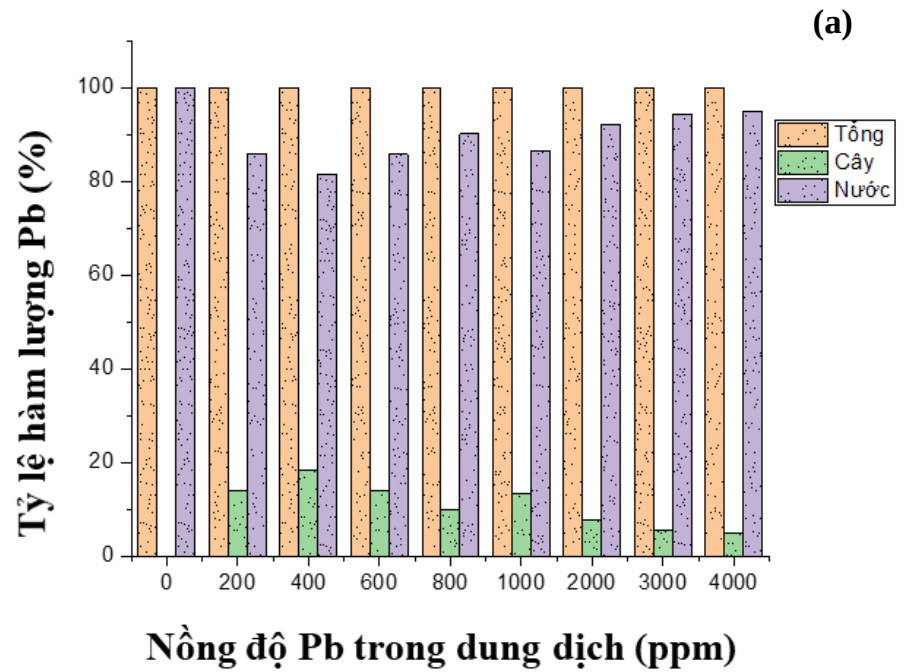
Những loài thực vật có $TF > 1$ được coi là cây siêu hấp thụ thích hợp cho quá trình thu hút chất ô nhiễm của thực vật (phytoextraction), trong khi những cây có $TF < 1$ không thích hợp cho phytoextraction. Tuy nhiên những cây có $TF < 1$ được coi là những cây có tiềm năng cố định hoặc lọc KLN thích hợp cho quá trình cố định chất ô nhiễm (phytostabilization) hoặc lọc độc chất (phytofiltration) (Marchiol và ctv, 2004). Cây Phát tài có giá trị $TF < 1$ ở tất cả các nghiệm thức Pb, cho thấy rằng Phát tài là cây không có hiệu quả cao trong việc vận chuyển Pb từ rễ lên chồi, nhưng có hiệu quả trong việc lọc và tích lũy Pb trong vùng rễ.

3.2.2.3. Sự cân bằng Pb trong nước và trong cây và hiệu quả loại bỏ Pb của cây Phát tài

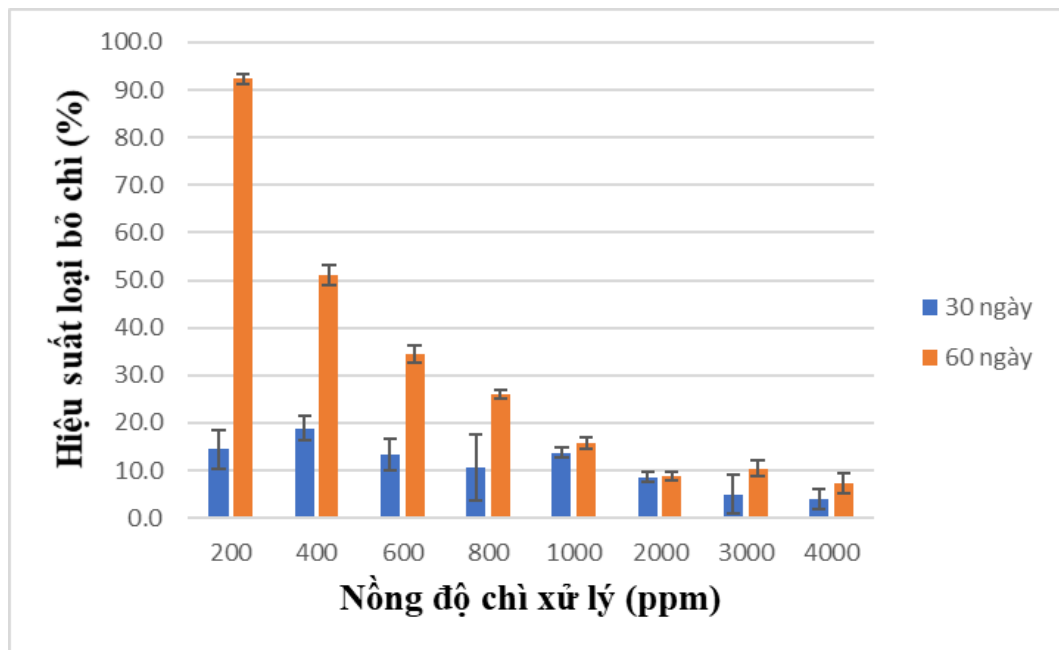
Hàm lượng Pb trong cây và trong nước trong mỗi nồng độ ở 2 mốc thời gian 30 ngày và 60 ngày được thể hiện ở hình 3.18. Sau 30 ngày thí nghiệm, tương ứng ở các nồng độ 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000 và 4000 ppm, hàm lượng Pb trong cây chiếm 14,11%; 18,34%; 14,16%; 9,83%; 13,48%; 7,83%; 5,60% và 5,04% và hàm lượng Pb trong nước chiếm 85,89%; 81,66%; 85,84%; 90,17%; 86,52%; 92,17%; 94,40% và 94,96% lượng Pb trong hệ thống. Sau 60 ngày thí nghiệm, tỷ lệ Pb trong cây ở các nồng độ tăng lên tương ứng là 91,77%; 49,23%; 37,03%; 24,22%; 15,47%; 8,41%; 8,56% và 6,21%, tỷ lệ Pb trong nước giảm xuống lần lượt còn 8,23%; 50,77%; 62,97%; 75,78%; 84,53%; 91,59%; 91,44% và 93,79%.

Tỷ lệ Pb trong cây sau 30 ngày thí nghiệm ở các nghiệm thức không khác biệt nhiều (biến động trong khoảng 5,04% đến 18,34%) (hình 3.18a), tuy nhiên sau 60 ngày thí nghiệm thì tỷ lệ Pb trong cây ở các nghiệm thức có sự khác biệt đáng kể (biến động từ 6,21% đến 91,77%) (hình 3.18b). Kết quả này cho thấy, ở môi trường nhiễm độc Pb cao, cây Phát tài hạn chế hấp thụ Pb (cụ thể như ở nồng độ 4000 ppm, sau 30 ngày hàm lượng Pb trong cây là 5,04%, nhưng sau 60 ngày chỉ tăng thêm 1,17%) cho nên dẫn đến hiệu quả loại bỏ Pb thấp.

Khảo sát về hiệu quả loại bỏ Pb khi phân tích hàm lượng Pb còn lại trong dung dịch thí nghiệm cho thấy, hàm lượng Pb được loại bỏ tăng theo thời gian ở tất cả nồng độ Pb khảo sát. Hiệu quả loại bỏ Pb càng giảm khi nồng độ Pb gây nhiễm càng tăng. Cây Phát tài trồng ở nồng độ Pb 200 ppm sau 60 ngày phơi nhiễm cho hiệu suất loại bỏ cao nhất (92,3%) và ở nồng độ Pb 4000 ppm cho hiệu suất loại bỏ thấp nhất (7,2%) (hình 3.19). Điều này cho thấy, hàm lượng Pb loại bỏ khỏi môi trường nước thí nghiệm tương đồng với hàm lượng Pb cây hấp thụ (hàm lượng Pb bám dính lên bề mặt vật liệu thí nghiệm và bề mặt rễ không đáng kể).



Hình 3.18. Sự cân bằng Pb trong môi trường nước và cây. (a): Thời gian 30 ngày, (b): Thời gian 60 ngày



Hình 3.19: Hiệu suất loại bỏ Pb của cây Phát tài

Trong những năm qua, hầu hết các nghiên cứu đều quan tâm đến khả năng tích lũy kim loại nặng trong cơ thể thực vật và cho rằng thực vật có khả năng loại bỏ kim loại trong môi trường ô nhiễm nếu chúng có khả năng hấp thụ và tích lũy kim loại, nhưng các nghiên cứu về hiệu quả loại bỏ Pb của thực vật trong môi trường ô nhiễm còn khá ít. Việc nghiên cứu thêm hiệu quả loại bỏ kim loại trong môi trường được xem là tiền đề cho ứng dụng xử lý trong thực tiễn. Với kết quả này cho thấy, cây Phát tài khi xử lý ở nồng độ 200 ppm cho hiệu quả xử lý khá cao (92%), cho thấy cây Phát tài rất hữu ích trong xử lý Pb ô nhiễm ở nồng độ 200 ppm. Thời gian xử lý tốt nhất là 60 ngày. Hiệu quả loại bỏ Pb ở nồng độ 200 ppm của cây Phát tài cao hơn so với nhiều loài thực vật khác đã được báo cáo như: cỏ chân vịt (*lemna minor*) xử lý ở nồng độ 20 ppm (Singh và ctv, 2012); lục bình (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) xử lý ở nồng độ 10 ppm (Patel và ctv, 2018) với hiệu quả loại bỏ theo thứ tự là 90%, 67%.

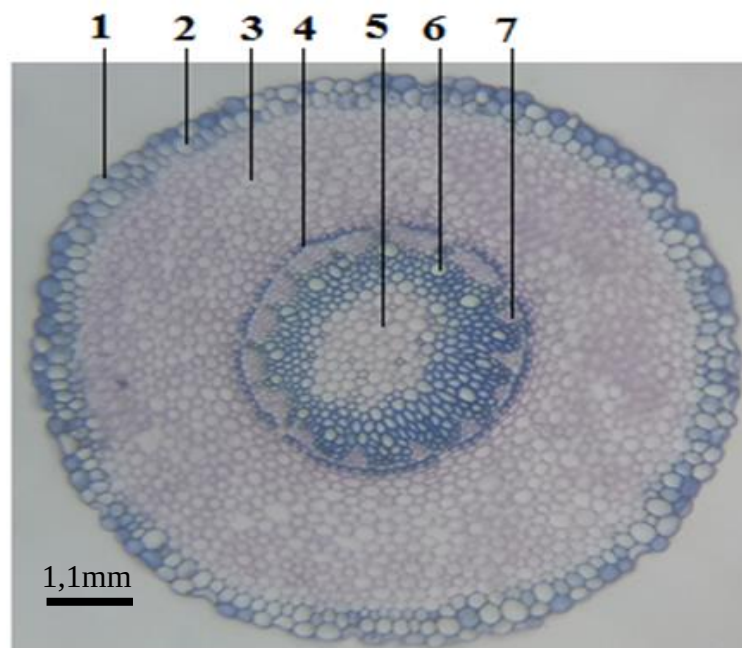
Ở nồng độ cao hơn (kể cả nồng độ 4000 ppm) vẫn có thể sử dụng cây Phát tài để xử lý, tuy nhiên cần phải trồng cây mới nhiều đợt để tăng hiệu quả loại bỏ Pb và cần có phương pháp xử lý sinh khối thực vật sau khi cây hấp thụ Pb. Theo cơ quan bảo vệ môi trường (EPA, 2000), hiện có nhiều phương pháp xử lý sinh

khối sau khi hấp thụ KLN như: đóng rắn đem chôn lấp ở các bãi chôn lấp; ly trích thu hồi Pb tái sử dụng cho công nghiệp. Trong điều kiện Việt Nam, phương pháp đóng rắn đem chôn lấp ở các bãi chôn lấp hợp vệ sinh là khả thi.

3.2.3. Sự phân bố chì trong phạm vi tế bào của cây Phát tài

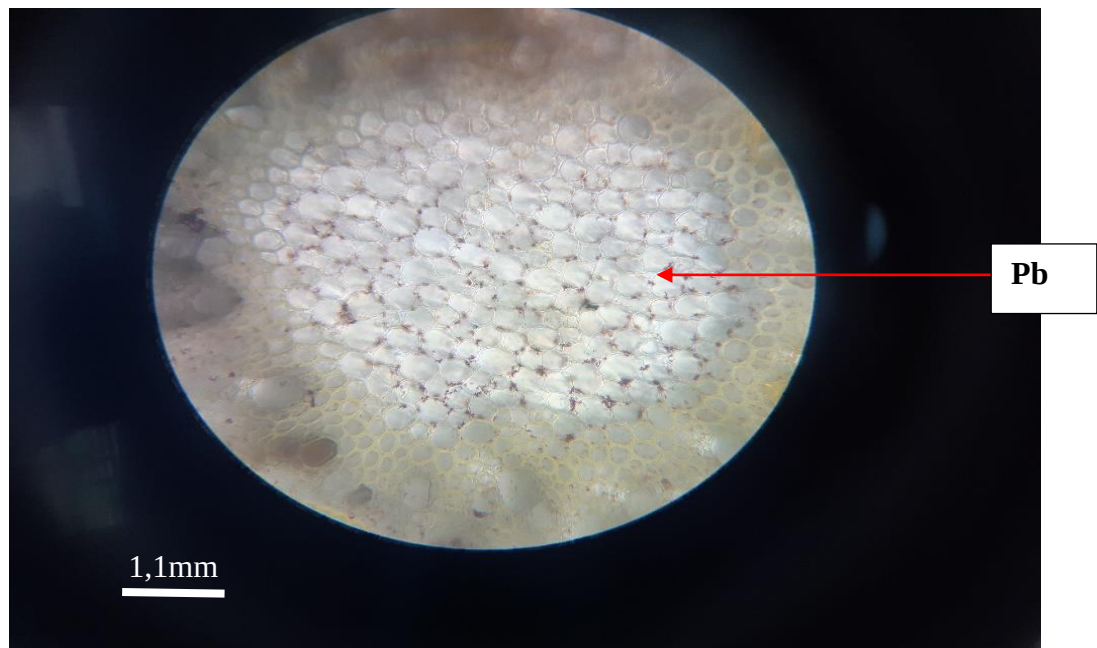
3.2.3.1. Sự phân bố chì trong rễ

Phát tài là một loài cây có rễ chùm, ngắn và thường có màu trắng. Cấu trúc của mô rễ gồm ba phần chính: Lớp biểu bì rễ, mô mềm vỏ (nhu mô rễ) và phần trung trụ (gỗ). Để bảo vệ lớp mô mềm vỏ, ở rễ phát tài có thêm một lớp tế bào vỏ ngoài. Phần trung trụ có cấu tạo gồm một lớp tế bào nội bì có đai caspari, các tế bào gỗ; các tế bào libe; mô mềm ruột (hình 3.20).

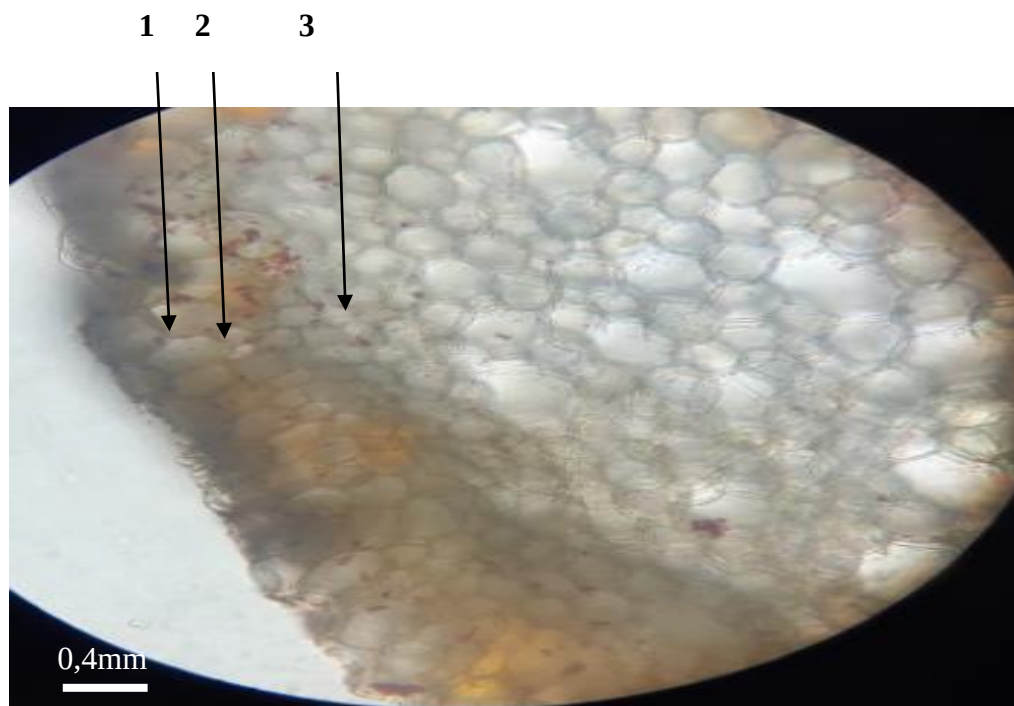


Hình 3.20. Cấu trúc giải phẫu chung của rễ cây Phát tài (Hình xem ở vật kính 10X) (1: Biểu bì; 2: Vỏ ngoài; 3: Mô mềm vỏ; 4: Nội bì với đai caspari; 5: mô mềm ruột; 6: Gỗ; 7: Libe)

Thuốc nhuộm sodium rhodizonate cho màu đỏ đến nâu đen khi nhuộm lên chì trong các mô cây (Tupan và ctv, 2016). Sự xuất hiện của vết màu đỏ (chính là chì) được tìm thấy ở hình thức dạng hạt trong các mô rễ khảo sát (hình 3.21).



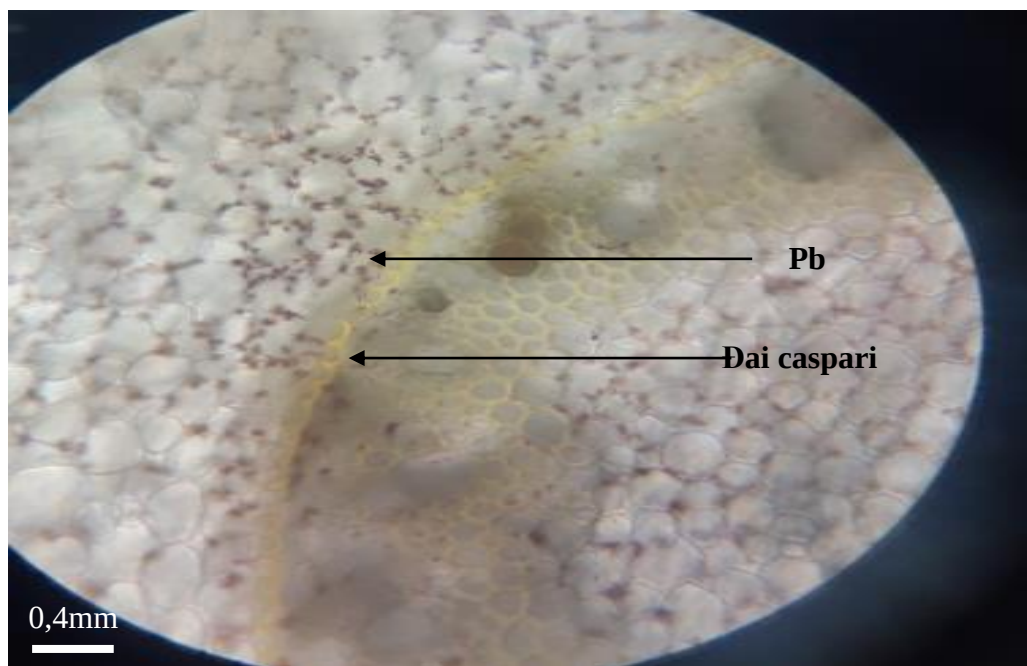
Hình 3.21. Sự bắt màu thuốc nhuộm của Pb (Hình xem ở vật kính 10X)



Hình 3.22. Sự phân bố của Pb ở mô biểu bì, vỏ ngoài và mô mềm vỏ của rễ cây phát tài (Hình xem ở vật kính 40X)(1: Chì liên kết ở vách tế bào biểu bì; 2: Chì liên kết với vách tế bào vỏ ngoài; 3: Chì liên kết với vách tế bào mô mềm vỏ)

Tại các mô rễ của cây Phát tài có thể thấy, chì xuất hiện dạng hạt, phân bố chủ yếu trong gian bào và liên kết với vách tế bào (hình 3.22 và hình 3.23). Sự

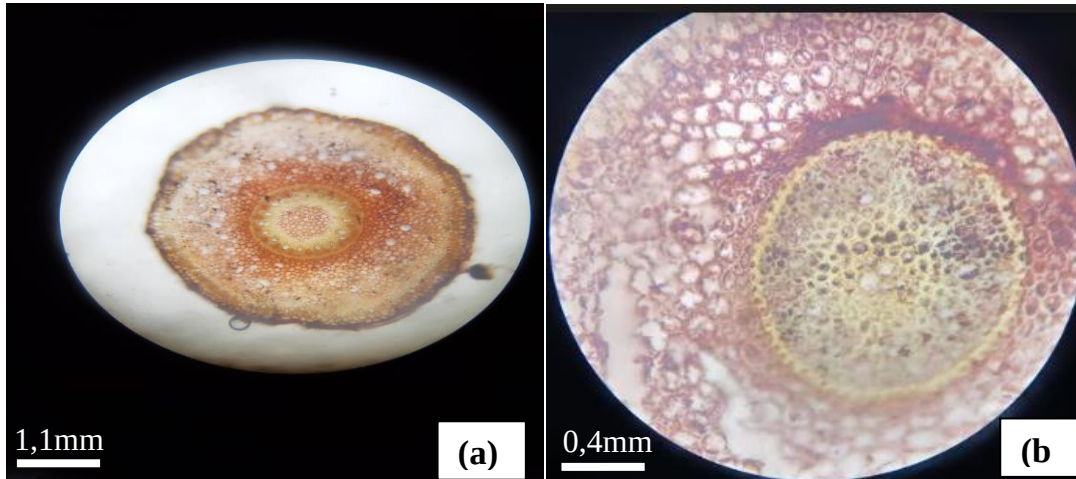
phân bố Pb trong gian bào và liên kết với vách tế bào là cơ chế phân bố chính trong mô rễ của Pb và là chiến lược chống chịu và hạn chế độc tính của Pb (Al-Saadi và ctv, 2013). Pb liên kết với vách tế bào là bởi vì Pb có ái lực cao với các thành phần của vách tế bào như lignin, pectin, polysaccharide, cellulose (Al-Saadi và ctv, 2013). Hơn 90% Pb tích lũy trong rễ đã được tìm thấy ở dạng không hòa tan có ở gian bào và liên kết chặt chẽ với vách tế bào (Jiang và Liu, 2010).



Hình 3.23. Sự phân bố của Pb ở nội bì của rễ cây phát tài (hình xem ở vật kính 40X)

Trong rễ, Pb có xu hướng di chuyển đến mô gỗ để được vận chuyển lên thân lá, tuy nhiên do rào cản nội bì, sự di chuyển Pb bị hạn chế. Cho nên Pb tích lũy gia tăng ở nội bì, đặc biệt là trên đai caspari với màu đỏ sẫm (Hình 3.23). Ở nồng độ Pb gây chết cây (4000 ppm), rào cản này bị phá vỡ và dòng Pb xâm nhập đầy vào các mô mạch (hình 3.24). Nội bì hoạt động như một rào cản đối với sự di chuyển của Pb từ rễ lên thân lá (Azmat và ctv, 2006). Điều này có thể giải thích một phần cho kết quả về sự tích lũy Pb trong rễ cao hơn so với thân và lá. Sự tích

lũy Pb trong rễ cao là do sự liên kết của Pb với các vị trí trao đổi ion trên vách tế bào và sự kết tủa ở nội bào (Azmat và ctv, 2006).



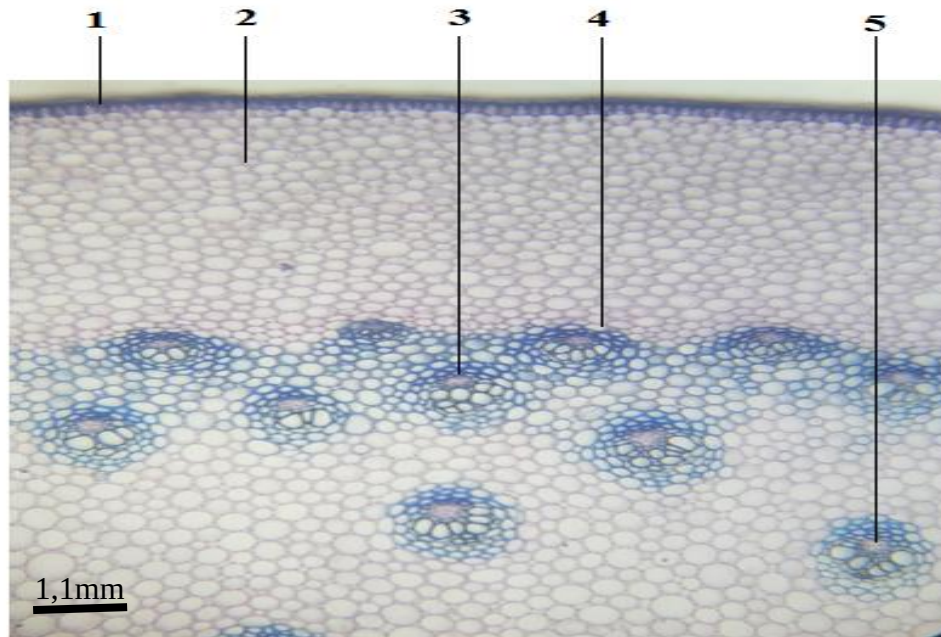
Hình 3.24. Pb phân bố trong mô rễ ở nồng độ 4000 ppm

(a): Hình xem ở vật kính 10X và (b) 40X

3.2.3.2. Sự phân bố Pb trong thân

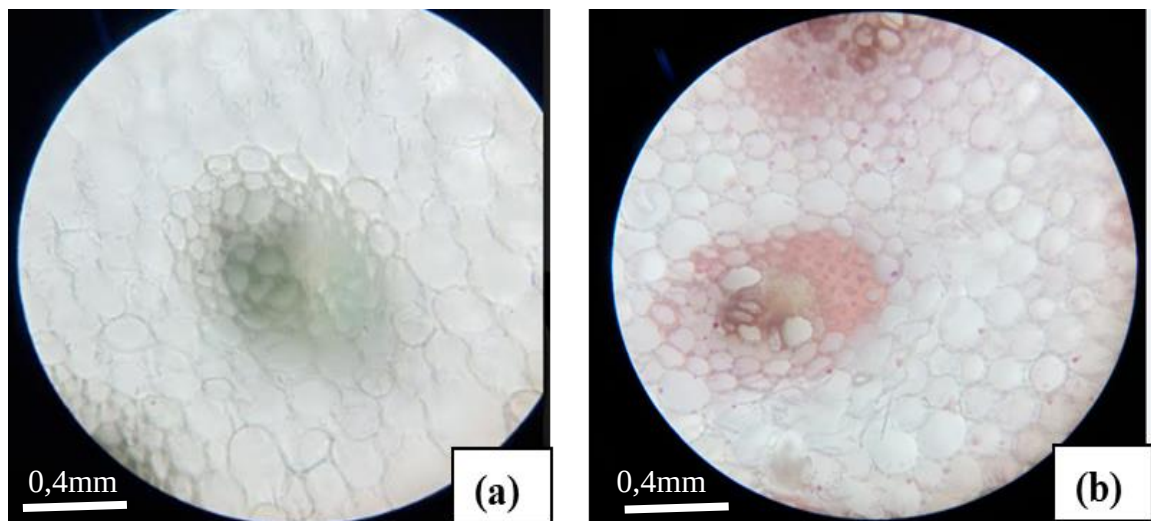
Kết quả giải phẫu thân của cây Phất tài cho thấy thân được bao bọc bên ngoài là một lớp biểu bì gồm các tế bào hình đa giác, mô mềm vỏ gồm nhiều lớp tế bào hình tròn, sắp xếp lộn xộn chứa những khoảng gian bào nhỏ. Ngăn cách giữa phần mô mềm vỏ và phần gỗ là các tế bào vòng dày. Phần gỗ được cấu tạo gồm nhiều bó dẫn, mỗi bó dẫn được cấu tạo gồm mô cứng, libe và gỗ (hình 3.25).

Trong mô thực vật, Pb có thể lắng đọng ở 2 dạng là khuếch tán và dạng hạt (Tupan và ctv, 2016). Quan sát giải phẫu thân Phất tài cho thấy, dạng Pb phân bố chủ yếu trong thân là dạng khuếch tán và một phần nhỏ ở dạng hạt. Trong thân, Pb phân bố chủ yếu xung quanh các bó mạch (dạng khuếch tán) và có xu hướng khuếch tán ra các mô mềm lân cận (dạng hạt) (hình 3.26).



Hình 3.25. Cấu trúc chung của thân cây phát tài (Hình xem ở vật kính 10X)

1- Biểu bì; 2- Mô mềm; 3- Bó dẫn thứ cấp, 4- Vòng dày; 5- Bó dẫn sơ cấp

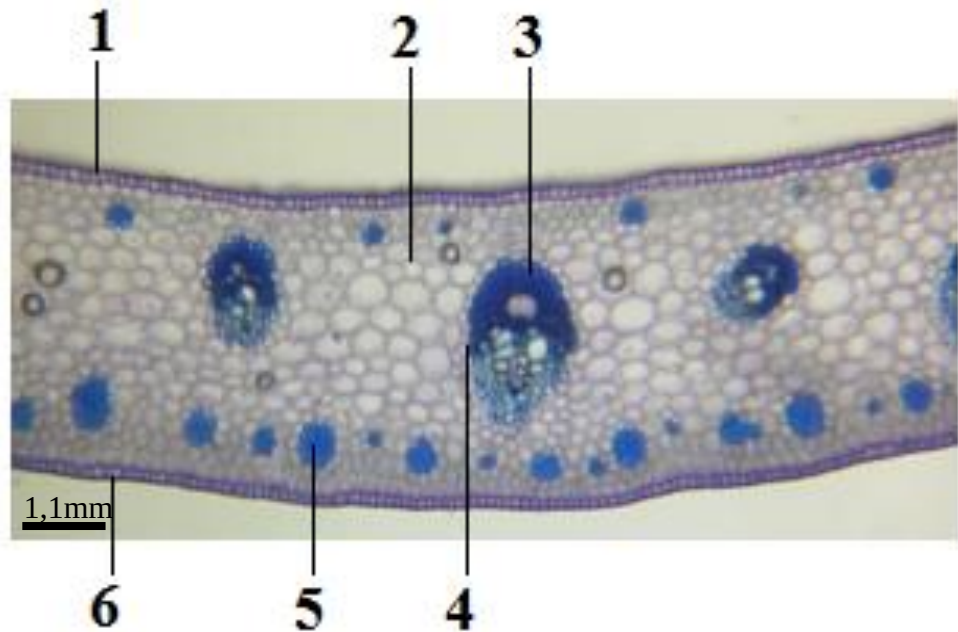


Hình 3.26. Sự phân bố Pb trong mô thân Phát tài (hình xem ở vật kính 40X).

(a): đối chứng; (b): 3000 ppm

3.2.3.3. Sự phân bố Pb trong lá

Kết quả giải phẫu lá Phất tài được thể hiện qua hình 3.27.



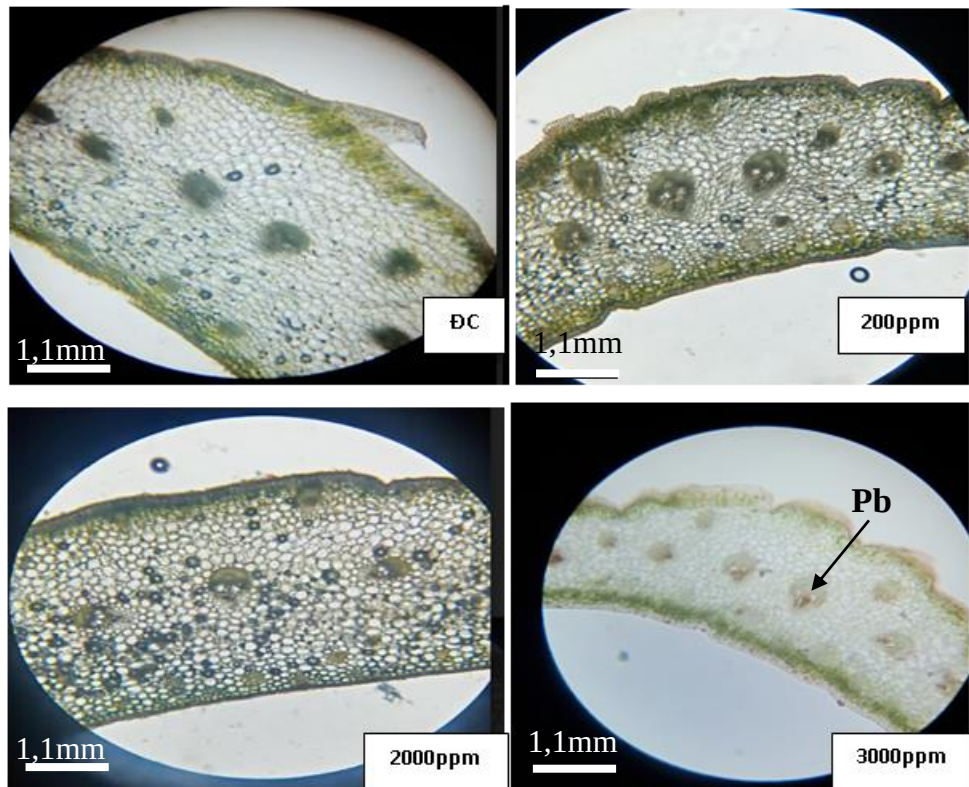
Hình 3.27. Cấu trúc giải phẫu của lá Phất tài (Hình xem ở vật kính 10X)

1-Biểu bì trên; 2- Thịt lá; 3- Bó mạch dẫn; 4- Tế bào bao bó mạch; 5- Cụm mô cứng; 6- Biểu bì dưới

Kết quả giải phẫu lá Phất tài cho thấy gồm các mô: lớp mô biểu bì gồm biểu bì trên và biểu bì dưới, dưới lớp biểu bì là phần thịt lá (nhu mô lá) gồm nhu mô dậu và nhu mô khuyết, trong đó nhu mô dậu là nơi chứa lục lạp và thực hiện quang hợp chính của cây. Ở giữa là phần trung trụ gồm các bó dẫn có libe và gỗ tạo thành vòng cung. Ngoài ra còn có nhiều cụm mô cứng nằm xen lẫn trong vùng nhu mô dậu, biểu bì trên và biểu bì dưới cũng có nhiều khí khổng (hình 3.27).

Kết quả phân bố Pb trong các mô ở lá Phất tài cho thấy, vết màu đỏ (Pb) không được phát hiện ở các mô trong lá của cây Phất tài tiếp xúc Pb ở nồng độ 200 ppm đến 2000 ppm. Vết màu đỏ chỉ được phát hiện ở nồng độ 3000 ppm và 4000 ppm (hình 3.28). Kết quả cho thấy, màu sắc ở các mô lá không khác nhau giữa đối chứng, nồng độ 200 ppm và nồng độ 2000 ppm. Ngược lại, vết màu đỏ được phát hiện ở nồng độ 3000 ppm và quan sát thấy tập trung ở bó mạch. Có

thể do nồng độ Pb tích lũy trong lá ở nồng độ xử lý thấp hơn 3000 ppm ít nên màu chưa được nhìn thấy.



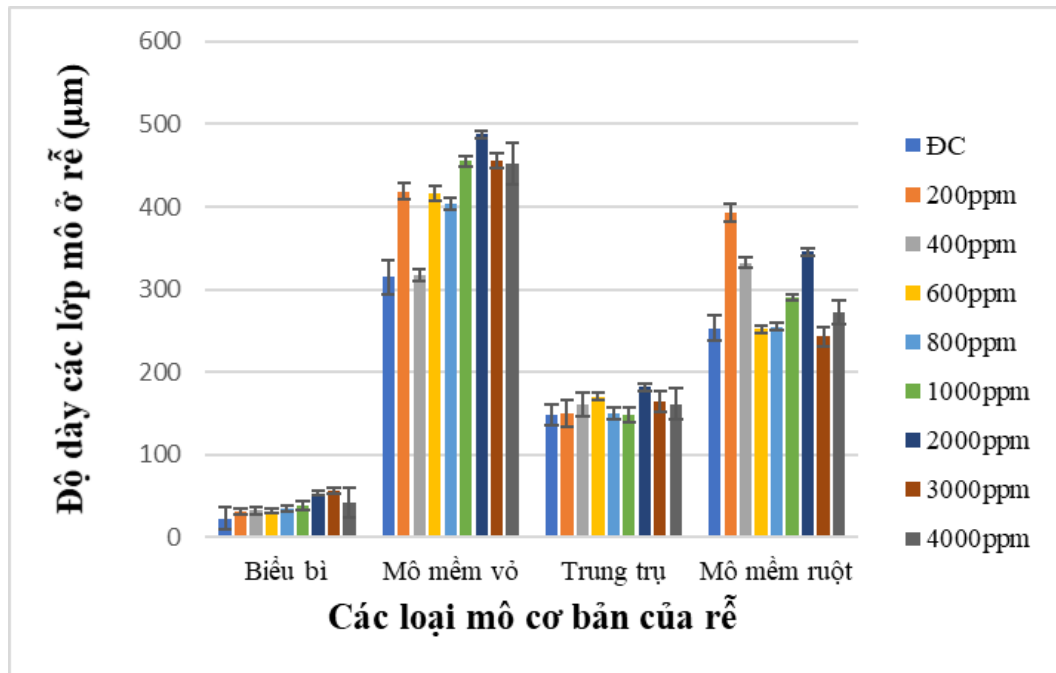
Hình 3.28. Sự phân bố Pb trong lá Phát tài ở một số nồng độ xử lý (hình xem ở vật kính 10X)

3.2.4. Phản ứng của mô thực vật Phát tài trong điều kiện nhiễm độc Pb

3.2.4.1. Phản ứng của các mô ở rễ

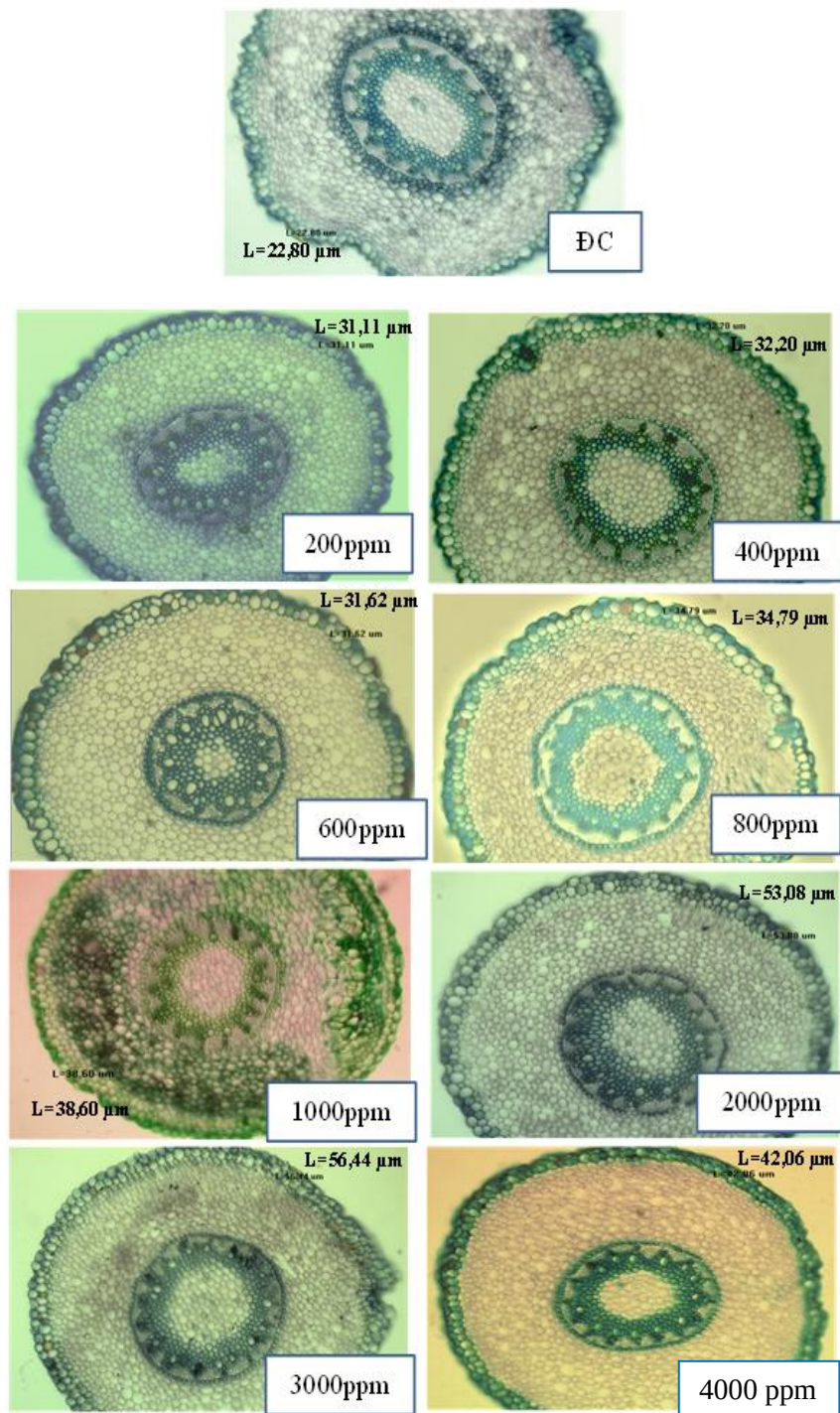
Kết quả ở hình 3.29 cho thấy có một số thay đổi ở các mô của rễ cây Phát tài khi có sự tích lũy và phân bố Pb. Mô biểu bì, mô mềm vỏ, mô mềm ruột và cả trung trụ đều có kích thước tăng ở các cây nhiễm độc chì và tăng hơn so với cây đối chứng. Các mô này có xu hướng tăng khi nồng độ Pb gây nhiễm tăng. Đặc biệt mô biểu bì (hình 3.30) và mô mềm vỏ (hình 3.31) có sự tăng kích thước rất rõ rệt so với đối chứng.

Nồng độ Pb càng cao càng làm cho lớp mô biểu bì, mô mềm vỏ dày hơn. Các mô dày hơn có thể là do sự tích lũy Pb làm đẩy nhanh sự trưởng thành của các tế bào cũng như sự hình thành vách thứ cấp. Khi tế bào thực vật tiếp xúc với Pb, quá trình tổng hợp polysaccharides tăng dẫn đến làm dày lên đáng kể của vách tế bào (Khan và ctv, 2018).

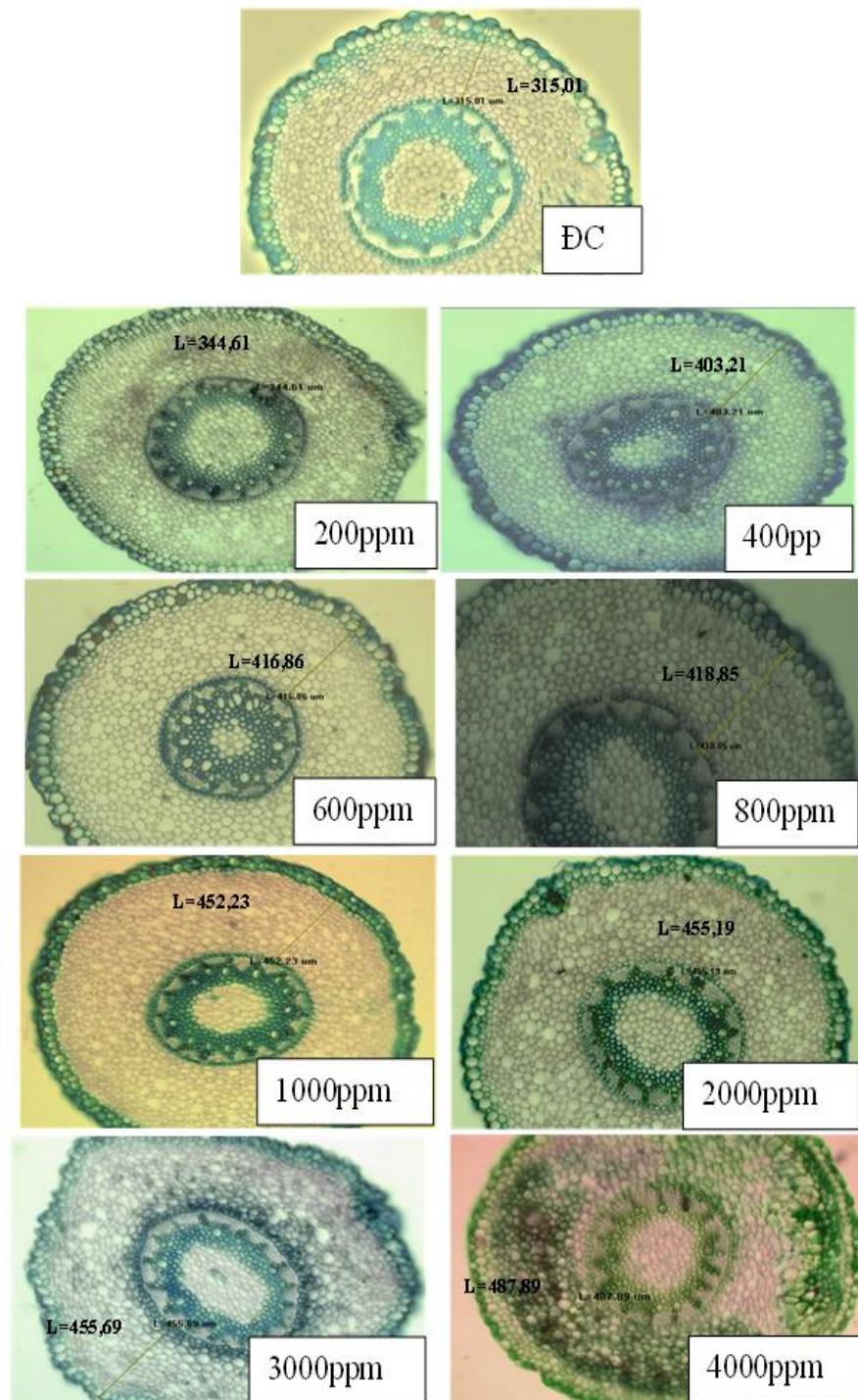


Hình 3.29. Kích thước các lớp mô của rễ ở các nồng độ chì

Các mô ở rễ dày hơn cũng có thể là một phương thức giải độc của cây Phát tài nhằm làm tăng kích thước rào cản vật lý, giảm sự dịch chuyển Pb đến các bộ phận bên trên của cây. Kết quả tương tự cũng đã được báo cáo bởi Tupal và ctv (2016) khi cho biết rằng mô vỏ và mô nội bì ở rễ của cây *Thalassia hemprichii* (một loài cây tích lũy Pb khá cao trong rễ khoảng 17435-18630 ppm) có kích thước tăng hơn khi nhiễm độc Pb. Số lớp trung trụ ở loài *Lens culinaris* tăng hơn 3 lớp so với đối chứng khi nồng độ Pb xử lý 250 ppm (Azmat và ctv, 2006). Ngoài ra, việc dày lên của vách tế bào cũng sẽ tạo ra nhiều vị trí để gắn kết Pb và do đó tăng khả năng cô lập ngoại bào. Vách tế bào dày hơn cũng đã được phát hiện ở loài *F. hygrometrica protonema* (Khan và ctv, 2018).

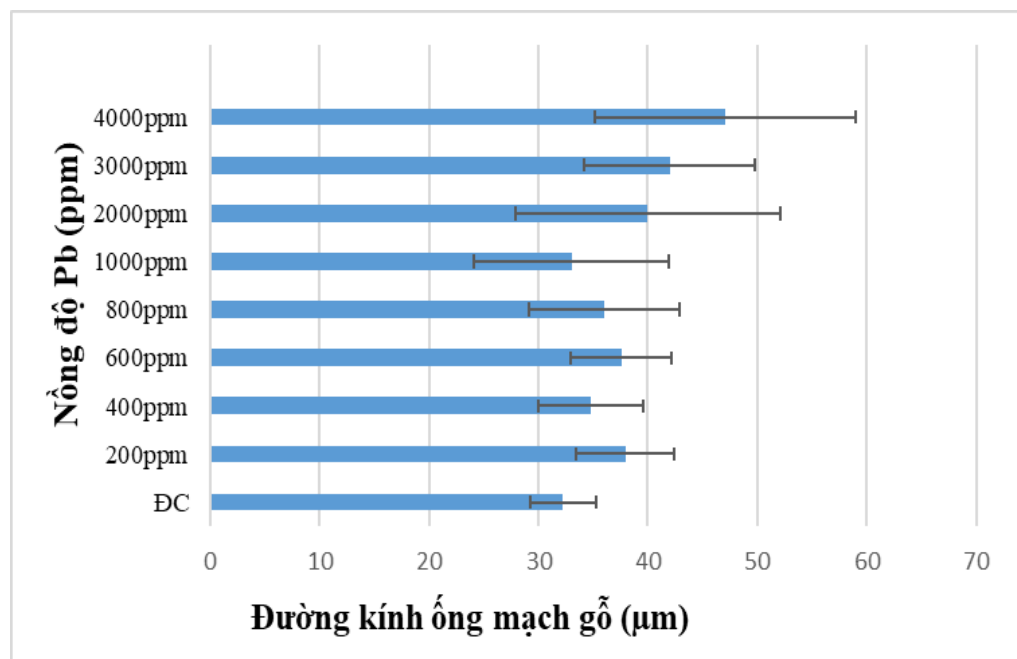


Hình 3.30. Sự thay đổi độ dày biểu bì rễ của cây phát tài khi tiếp xúc với Pb ở các nồng độ khác nhau (μm) (Hình được xem ở vật kính 10x)



Hình 3.31. Sự thay đổi độ dày mô mềm rễ của cây phát tài khi tiếp xúc với Pb ở các nồng độ khác nhau (μm) (Hình được xem ở vật kính 10x)

Ngoài ra, đường kính ống mạch gỗ ở rễ cây nhiễm độc Pb cũng tăng cao hơn so với đối chứng và đặc biệt là tăng khá cao ở các nồng độ Pb 2000, 3000 và 4000 ppm, với đường kính theo thứ tự là 40,00 μm , 41,98 μm và 47,10 μm (hình 3.32). Đường kính ống mạch gỗ tăng ở nồng độ Pb cao cũng đã được báo cáo trên 2 loài *Lens culinaris* và *Phaseolus mungo* (Azmat và ctv, 2006). Đường kính ống mạch tăng khi xử lý Pb có thể là kết quả giúp rễ tăng khả năng hút nước, muối khoáng và dinh dưỡng để cung cấp cho cây giúp cây có thể chống chịu hơn trong điều kiện nhiễm độc và tạo điều kiện cho việc vận chuyển oxy đến vùng rễ.

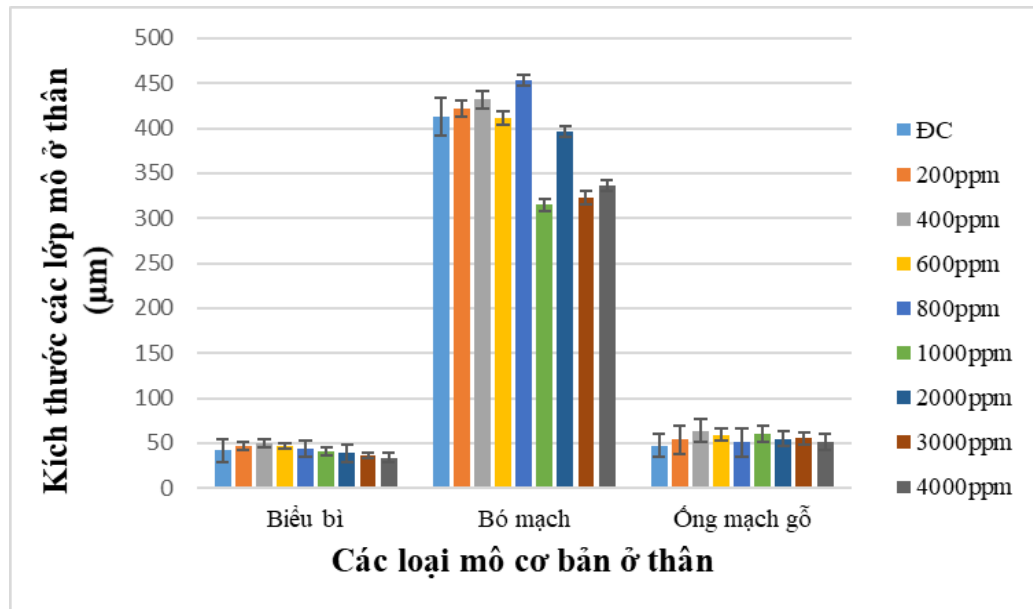


Hình 3.32. Sự thay đổi đường kính ống mạch gỗ ở rễ của cây Phat tai khi tiếp xúc với Pb ở các nồng độ khác nhau (μm)

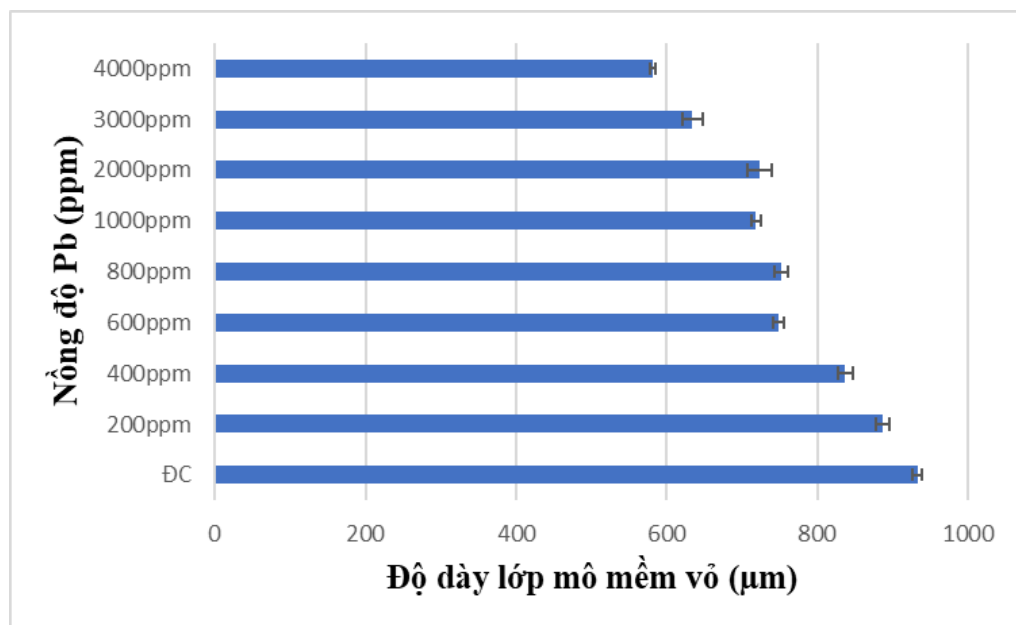
3.2.4.2. Phản ứng của các mô ở thân

Kết quả thu được ở hình 3.33, 3.34, 3.35 và 3.36 cho thấy nồng độ Pb có ảnh hưởng đến cấu trúc các mô ở thân. Ở nồng độ Pb 200 - 800 ppm, phần lớn các mô đều tăng hơn so với đối chứng (lớp biểu bì dày hơn 5 - 18%; đường kính bó mạch mở rộng hơn 2 - 9% và đường kính ống mạch gỗ tăng hơn 8% - 35%). Ở nồng độ Pb 1000 - 4000 ppm, phần lớn các mô đều giảm hơn so với đối chứng (lớp biểu bì giảm đi 6 - 18%; lớp mô mềm vỏ kể cả kích thước bó mạch giảm xuống 4 - 23%).

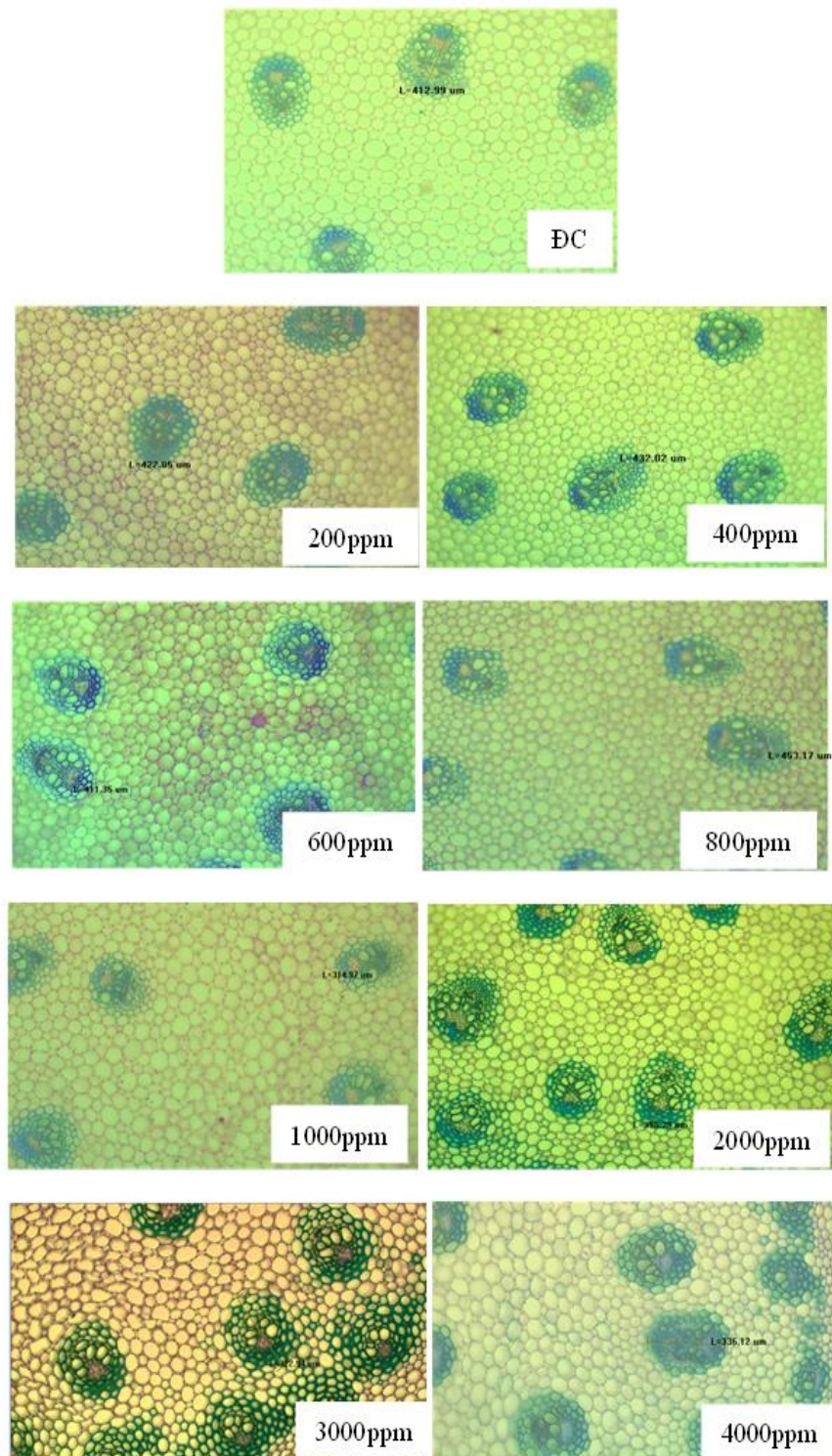
Kết quả này có thể là phản ứng của cây dưới tác động gây độc của Pb ở nồng độ cao (Khan và ctv, 2018). Kết quả Pb phân bố nhiều ở bó mạch cũng sẽ làm giảm kích thước bó mạch và mở rộng không gian của ống mạch gỗ (Al-Saadi và ctv, 2013).



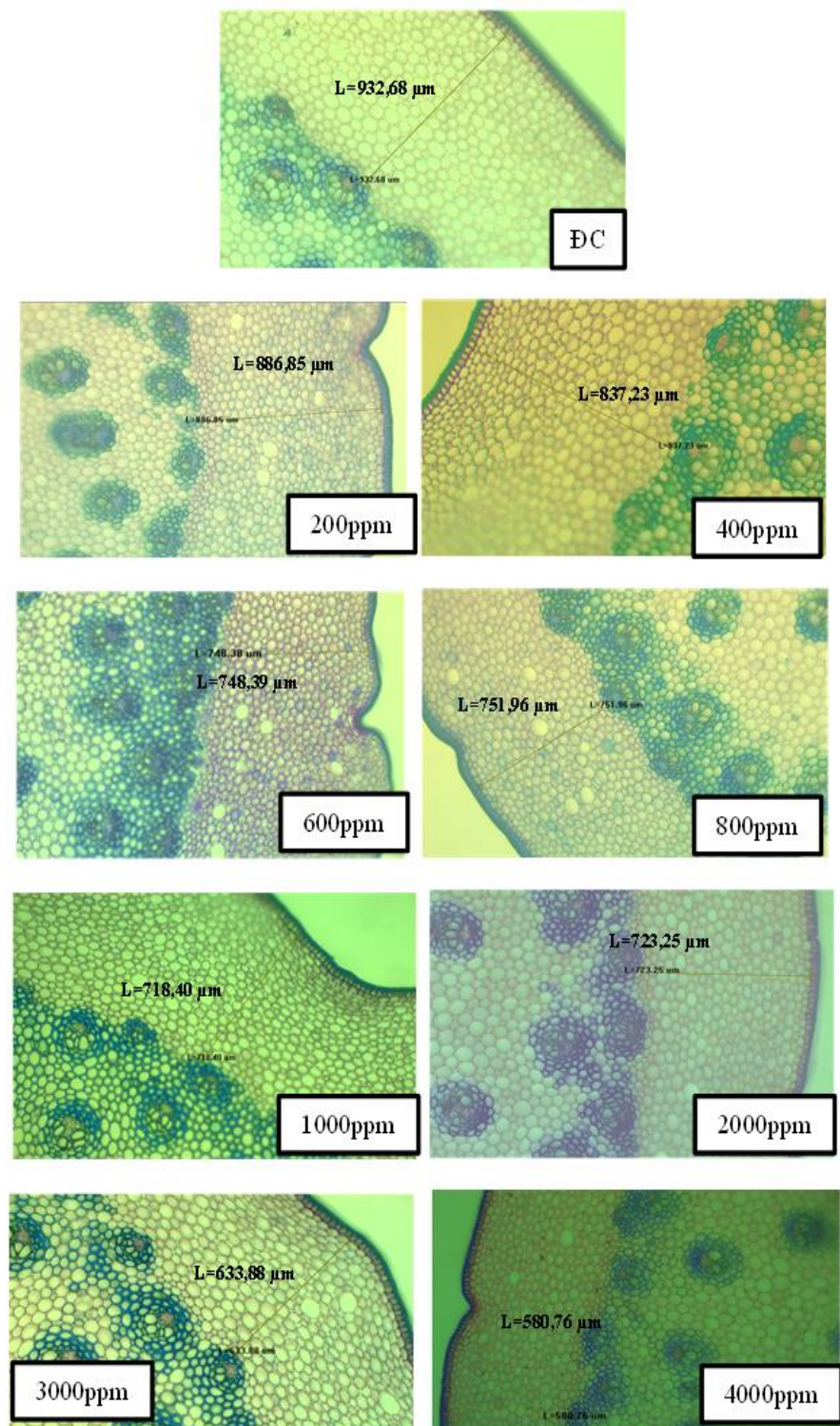
Hình 3.33. Kích thước các lớp mô của thân ở các nồng độ chì (μm)



Hình 3.34. Sự thay đổi độ dày (μm) lớp mô mềm vỏ ở thân cây Phát tài khi tiếp xúc ở các nồng độ Pb khác nhau



Hình 3.35. Sự thay đổi đường kính bó mạch của thân ở các nồng độ Pb
(Hình xem ở vật kính 10x)



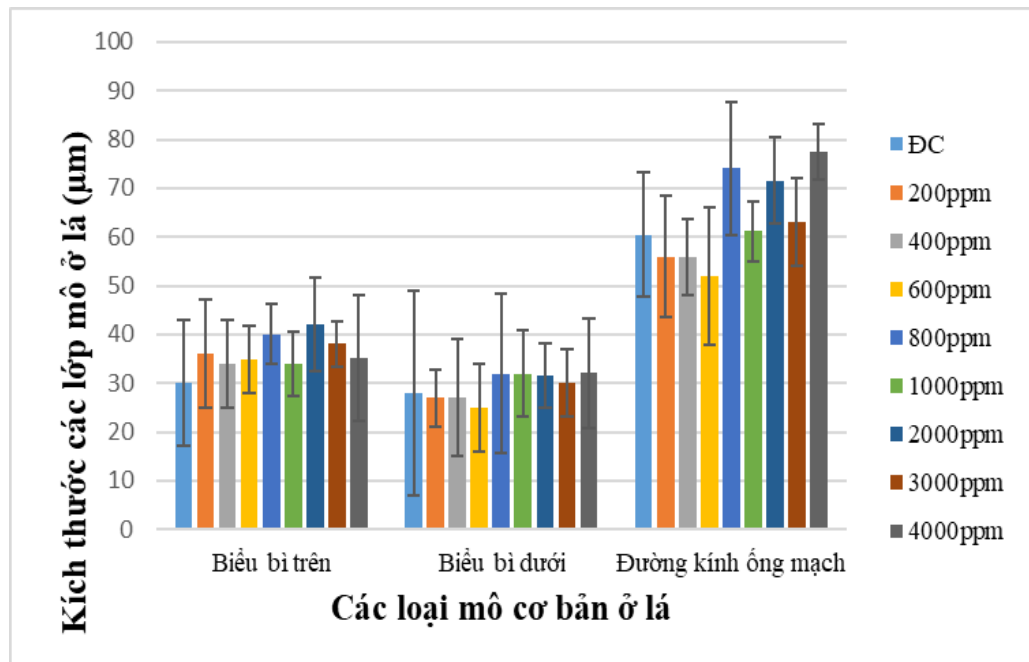
Hình 3.36. Độ dày (μm) lớp mô mềm vỏ ở thân cây phát tài ở các nồng độ Pb
(Hình xem ở vật kính 10x)

Là một loài thực vật có thể sống được ở cả 2 môi trường đất và nước. Khi sống trong môi trường nước, bản thân cây Phất tòi cũng giống như các loài thực vật thủy sinh khác cần có khoảng gian bào lớn để đưa oxy đến rễ. Chính vì thế, trong cấu trúc giải phẫu thân Phất tòi, tất cả nồng độ Pb đều có tác động làm tăng đường kính ống mạch gỗ so với đối chứng (tăng 8% đến 35%) (hình 3.33). Kết quả này có thể là cách để cây vừa chống lại sự mất oxy vừa vận chuyển Pb. Al-Saadi và ctv (2013) đã tìm thấy những thay đổi trong ống mạch gỗ ở thân của một loài cây thủy sinh *Potamogeton sp.* và kết luận rằng sự thay đổi là do kim loại được vận chuyển bên trong nên ống mạch phải rộng ra để vừa có thể vận chuyển cả oxy và Pb. Việc gia tăng kích thước ống mạch có thể là một chiến lược quan trọng của thực vật sống được trong môi trường nước nhiễm kim loại nặng, không chỉ tạo điều kiện cho việc vận chuyển oxy đến vùng rễ mà còn vận chuyển Pb.

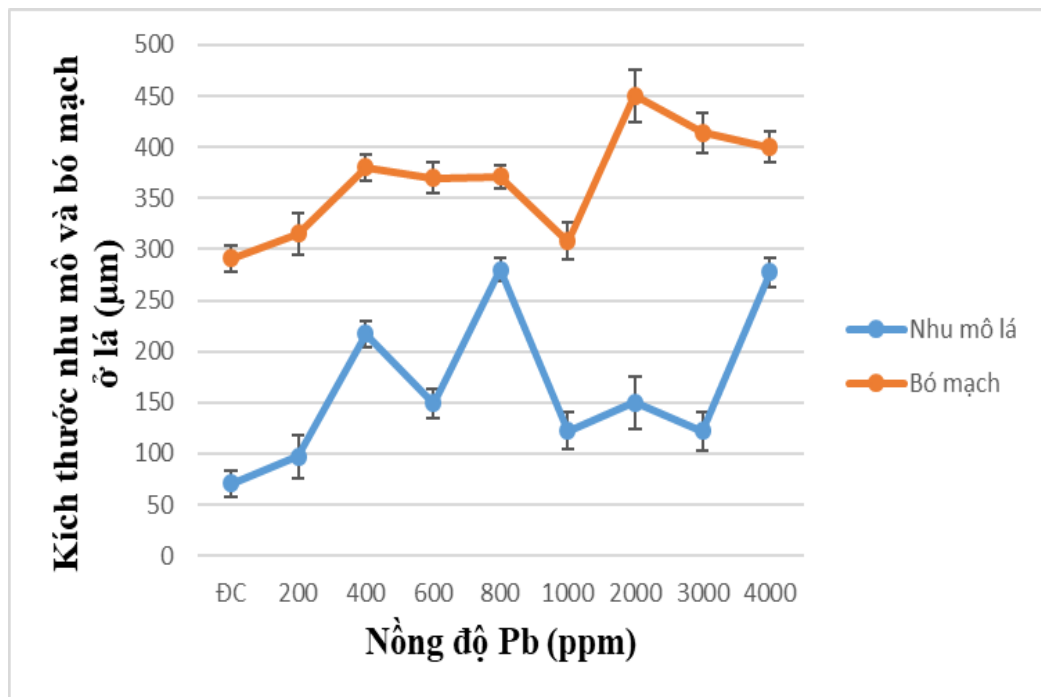
3.2.4.3. Phản ứng của các mô ở lá

Kết quả giải phẫu lá cho thấy có sự khác nhau về kích thước các lớp mô của lá ở các nghiệm thức. Độ dày của biểu bì trên, kích thước nhu mô lá và bó mạch đều tăng và cao hơn so với đối chứng. Tuy nhiên sự tăng kích thước ở các mô này khác nhau tùy theo nồng độ chì và loại mô. Cấu trúc của các loại mô khác như biểu bì dưới, ống mạch cũng có sự thay đổi theo nồng độ Pb. Độ dày của biểu bì dưới và kích thước của ống mạch ở các nồng độ Pb 200, 400 và 600 ppm giảm hơn nhưng không nhiều so với đối chứng, nhưng lại tăng hơn so với đối chứng ở nồng độ Pb 800, 1000, 2000, 3000 và 4000 ppm (hình 3.37, 3.38 và 3.39).

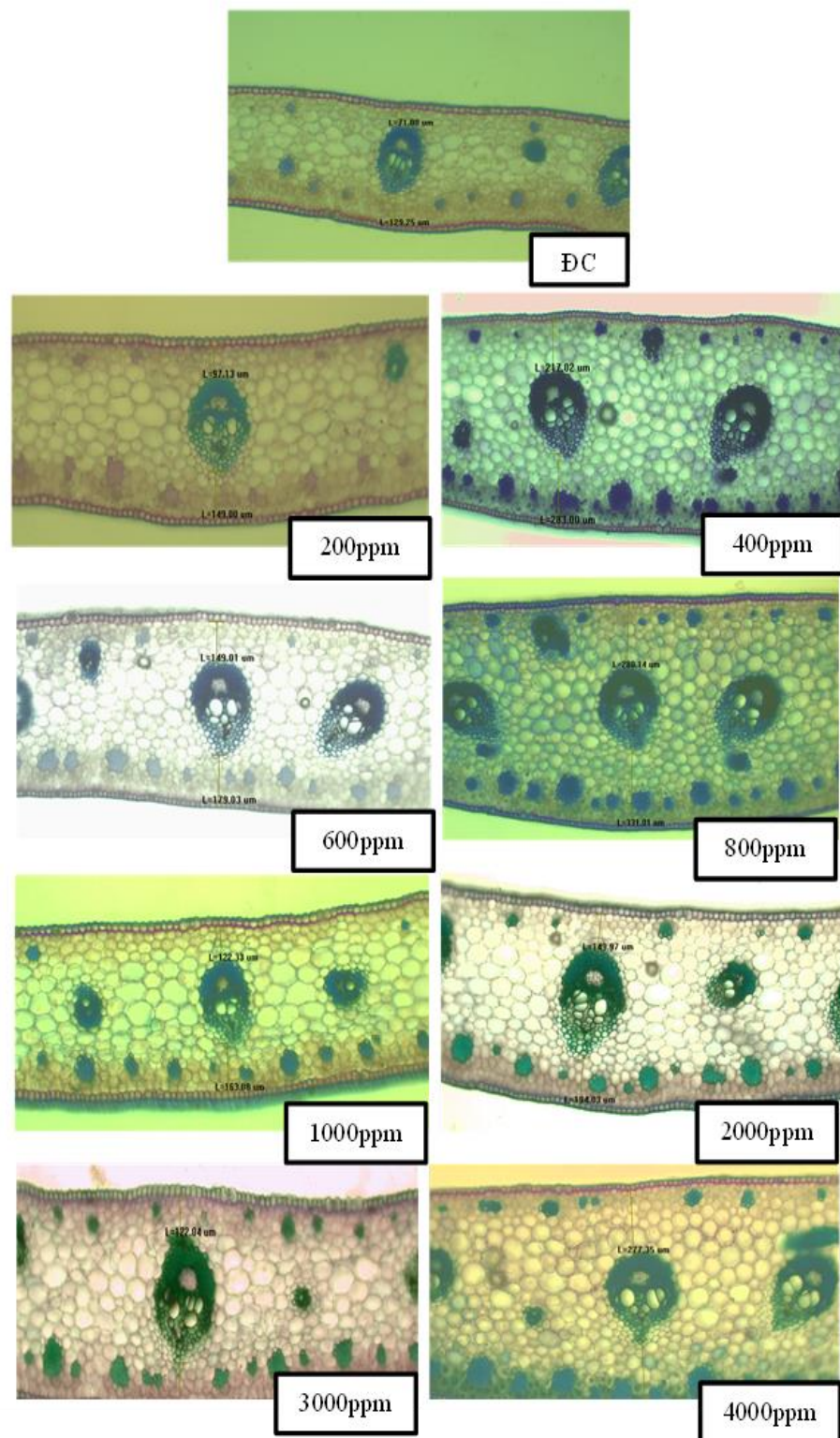
Khi thực vật bị nhiễm độc Pb cao, thực vật có một số cơ chế chống chịu Pb, cô lập Pb trong không bào lá là một trong những cơ chế đó. Để tích lũy Pb trong không bào, kích thước không bào phải kéo dài ra kéo theo làm thay đổi cấu trúc giải phẫu lá đặc biệt là mô biểu bì. Phản ứng tăng đường kính ống mạch ở nồng độ Pb > 1000 ppm phù hợp với kết quả phân bố Pb ở lá.



Hình 3.37. Kích thước các lớp mô của lá Phát tài ở các nồng độ Pb



Hình 3.38. Kích thước nhu mô và bó mạch của lá Phát tài ở các nồng độ Pb



Hình 3.39. Độ dày (μm) lớp nhu mô lá phát tài ở các nồng độ Pb
(Hình xem ở vật kính 10x)

Tóm tắt:

Tác động của Pb đến sinh trưởng: Nồng độ Pb < 1000 ppm có ảnh hưởng không đáng kể đến sinh trưởng của cây Phát tài. Ở nồng độ Pb 200, 400, 600 và 800 ppm, sự tăng trưởng chiều cao cây và chiều dài rễ không khác biệt so với đối chứng, sinh khối tươi, sinh khối khô, hàm lượng diệp lục tố và hàm lượng nước giảm không đáng kể so với đối chứng. Ngược lại, nồng độ Pb $\geq$ 1000 ppm có tác động nghiêm trọng đến sinh trưởng của cây Phát tài. Nồng độ Pb từ 1000 đến 4000 ppm làm giảm tất cả các chỉ tiêu chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và khô, hàm lượng diệp lục tố và hàm lượng nước. Các triệu chứng của nhiễm độc Pb là cây không tăng trưởng, ức chế mạnh sự phát triển của rễ. Những triệu chứng này có thể là hậu quả của sự giảm sắc tố quang hợp, giảm hàm lượng nước, giảm khả năng tổng hợp sinh khối. Nồng độ gây chết ở cây Phát tài là 4000 ppm, hầu hết cây đều chết sau 60 ngày thí nghiệm. Nồng độ Pb cao gây ra quá trình peroxy hóa lipid, làm hỏng các axit nucleic và protein, đồng thời làm thay đổi carbohydrate chuyển hóa, dẫn đến rối loạn chức năng và chết tế bào (Hasanuzzaman và ctv, 2020).

Pb không phải là chất dinh dưỡng thiết yếu nên ở nồng độ cao sẽ ức chế sự sinh trưởng của cây. Sự khác nhau rõ rệt về sinh trưởng giữa cây ngộ độc Pb và cây bình thường cho thấy phản ứng chính của thực vật đối với độc tính Pb là ức chế sự sinh trưởng của cây. Việc Pb ở nồng độ < 1000 ppm không làm ảnh hưởng đáng kể đến các chỉ tiêu sinh trưởng, cho thấy cây Phát tài có khả năng chống lại stress Pb và có thể có cơ chế hiệu quả để chống chịu Pb.

Nhiều loài cây đã được sử dụng trong công nghệ phytoremediation cho ô nhiễm Pb bởi vì chúng có thuộc tính chống chịu. Ở cây Phát tài, khả năng chống chịu Pb đã được tìm thấy. Cây có khả năng chống chịu tốt với Pb ở nồng độ 200 đến 800 ppm khoảng 80,38% đến 114,47%. Điều này cho thấy cây Phát tài có thể thích hợp sử dụng cho xử lý Pb ở nồng độ đến 800 ppm.

Ngưỡng Pb gây độc cho cây Phát tài: Cây Phát tài cũng như tất cả các loài thực vật khác có khả năng chịu đựng chất độc (Pb) đến một mức độ nhất định,

mức độ này được gọi là “ngưỡng”. Nếu giá trị chất độc (Pb) nhỏ hơn giá trị ngưỡng thì quá trình sinh trưởng của cây bị ảnh hưởng không đáng kể bởi tác động gây độc của Pb. Nếu nồng độ Pb vượt quá mức độ ngưỡng thì tăng trưởng của cây sẽ bị ảnh hưởng đáng kể. Pb trong nước ≥ 1000 ppm đã gây ngộ độc cho bộ rễ, làm giảm hàm lượng nước trong cây, ức chế tổng hợp diệp lục tố, làm giảm khả năng tổng hợp các chất dẫn đến giảm sinh khối và giảm tăng trưởng chồi. Nồng độ ≥ 1000 ppm Pb trong nước đã vượt quá ngưỡng chịu đựng đối với cây Phất tài nên các biểu hiện ngộ độc xuất hiện rõ rệt (héo khô cả lá, rễ co ngắn). Ngưỡng nồng độ Pb gây độc cho cây Phất tài là 1000 ppm.

Cây siêu tích lũy: Việc xác định thực vật siêu tích lũy kim loại (hyperaccumulator) có thể dựa trên 3 tiêu chí: (a) tỉ lệ nồng độ kim loại giữa thân lá và rễ (tỉ lệ giữa nồng độ kim loại trong thân lá và nồng độ kim loại trong rễ > 1); (b) Nồng độ KLN hấp thụ phải cao hơn gấp 10 đến 500 lần so với thực vật thông thường (thực vật không bị nhiễm Pb) (Henry, 2000); (c) tích lũy cao hơn 0,1% đối với Pb (Rotkittikhun và ctv, 2006). Trong 3 tiêu chí này, cây Phất tài đã đáp ứng được 2 tiêu chí: hấp thụ Pb cao hơn 500 lần, tích lũy Pb cao hơn 1% trọng lượng cây (hàm lượng Pb tích lũy trong cây Phất tài đạt 2,9% trọng lượng của cây), cho nên cây Phất tài có thể được xem là cây siêu tích lũy Pb (hyperaccumulator). Tuy nhiên, hàm lượng Pb tích lũy chủ yếu trong rễ nên cây Phất tài chỉ phù hợp cho cơ chế phytofiltration để xử lý Pb.

Cơ chế chống chịu Pb: Sự có mặt của Pb trong cây đã làm cho Phất tài có các chiến lược khác nhau để đối phó với độc tính của nó. Ở rễ, Phất tài đã sử dụng chiến lược loại bỏ Pb ra khỏi tế bào bằng cách cô lập Pb trong gian bào. Tại đây, Pb có thể ở dạng liên kết với các thành phần trên vách tế bào hoặc kết tủa trong gian bào. Do một lượng lớn Pb tích lũy chủ yếu trong rễ, nên để đảm bảo có nhiều vị trí để cô lập Pb trong gian bào, Phất tài đã có thể có phản ứng làm dày vách tế bào. Sự dày lên của vách tế bào có thể là kết quả làm tăng kích thước của mô mềm rễ (hình 6 – phụ lục 4). Mặc khác sự dày lên của trung trụ cũng có thể là một chiến lược của cây Phất tài để ngăn chặn sự di chuyển Pb lên

các bộ phận bên trên của cây. Ở thân và lá, phản ứng rõ rệt của cây Phát tài đối với sự có mặt của Pb trong môi trường nước là tăng đường kính của ống mạch gỗ nhằm có thể vừa vận chuyển Pb và vừa vận chuyển dinh dưỡng và nước.

3.3. SỰ BIỂU HIỆN GEN CHỐNG OXY HÓA Ở CÂY PHÁT TÀI TRONG MÔI TRƯỜNG NHIỄM ĐỘC Pb

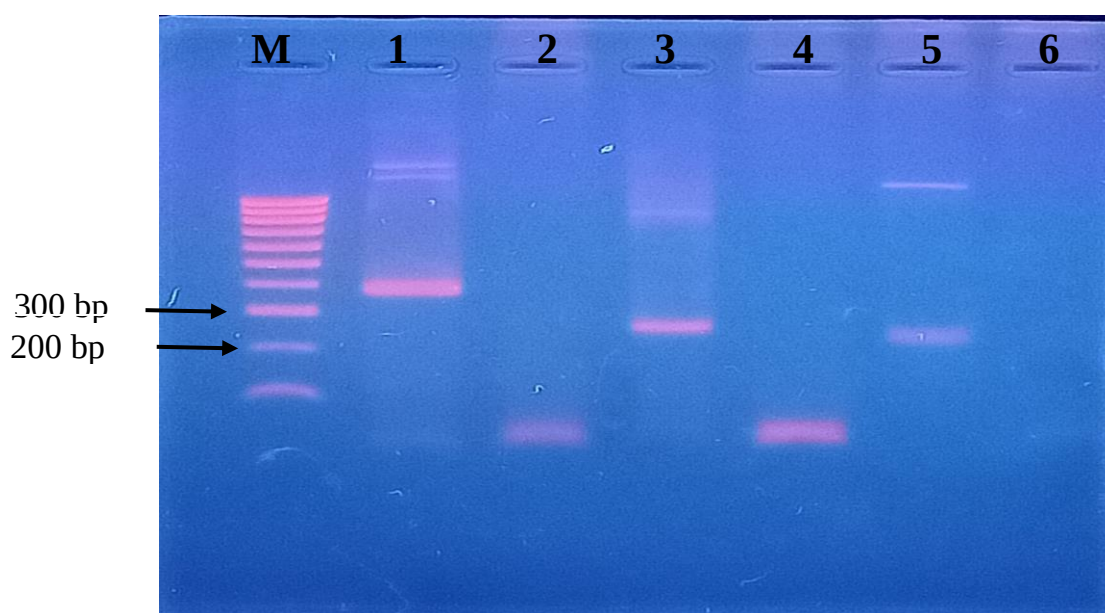
3.3.1. Kiểm tra sản phẩm RNA ly trích của các mẫu nghiên cứu

RNA thông tin là vật liệu di truyền rất cần thiết được sử dụng trong các kỹ thuật sinh học phân tử để đánh giá biểu hiện gen. Để thực hiện phản ứng PCR, RNA luôn được chuyển thành cDNA. Cho nên chất lượng cũng như nồng độ RNA thông tin thu được sẽ ảnh hưởng đến chất và lượng cDNA và cũng quyết định mức độ thành công của phản ứng PCR. Do vậy việc ly trích RNA có chất lượng cao và nồng độ thích hợp là rất cần thiết.

Độ tinh sạch của RNA được thể hiện ở tỷ số OD260/OD280 nm. Sau khi RNA tổng số được ly trích, nồng độ và độ tinh sạch của RNA tổng số được kiểm tra bằng máy quang phổ và kết quả được trình bày ở phụ lục 2. Kết quả kiểm tra tỷ số OD260/OD280 nm của các mẫu ly trích là 1,8 - 2,0 và nồng độ RNA tổng số đạt 17 - 50 µg/ml. Điều này cho thấy RNA tổng số có độ tinh sạch cao và có nồng độ phù hợp cho các phản ứng PCR.

3.3.2. Khuếch đại trình tự gen chống oxy hoá ở cây Phát tài

Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại các đoạn cDNA của trình tự gen chống oxy hoá được thể hiện ở hình 3.40 cho thấy, sản phẩm khuếch đại từ các cặp primer *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* cho băng có kích thước lần lượt là khoảng 362, 221 và 202 bp so với thang chuẩn, điều này đúng với lý thuyết dự kiến các sản phẩm khuếch đại từ các cặp primer *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* lần lượt là 362, 221 và 202 bp. Sản phẩm PCR mẫu chứng âm (mẫu nước khử ion thay cho mẫu cDNA) không xuất hiện băng sản phẩm kích thước trên 100 bp.



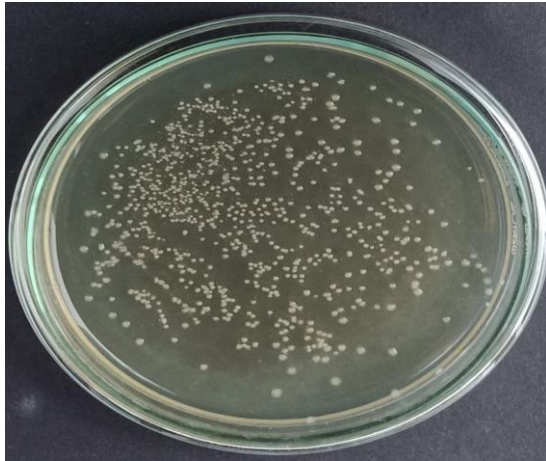
Hình 3.40. Kết quả PCR gen chống oxy hoá từ mẫu cDNA cây Phát tài
(M: Ladder 100 bp; 1: gen *GST*; 3: gen *Cyt-Cu/Zn SOD*; 5: gen *GPX*; 2,4,6: đối chứng âm)

3.3.3. Tạo dòng gen chống oxy hóa

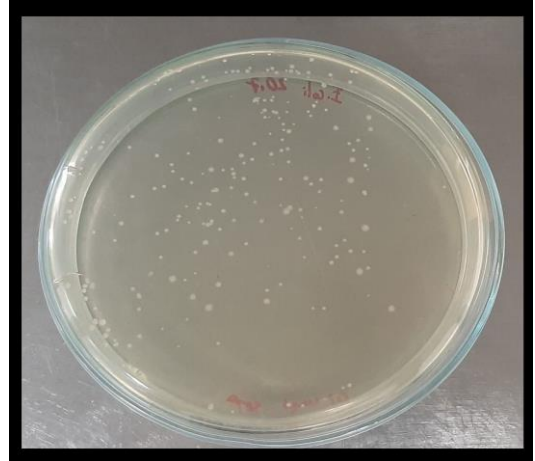
Do việc chọn lọc các dòng tế bào *E. coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp (*E. coli* DH5 α - pGEM-T Easy - *Cyt-Cu/Zn SOD/GPX/GST*) được tiến hành bằng phương pháp PCR khuẩn lạc, cho nên trước tiên đề tài phải chọn ra được các khuẩn lạc của dòng *E. coli* mang vector tái tổ hợp. Kết quả nuôi cấy vi khuẩn được thể hiện ở hình 3.41. Dịch vi khuẩn sau khi tạo dòng được nuôi cấy trên môi trường LB, bổ sung IPTG, ampicillin và X-gal. Sau 24 giờ nuôi cấy, xuất hiện các khuẩn lạc màu trắng, tròn trên môi trường (hình 3.41). Từ các khuẩn lạc hình thành ở các đĩa nuôi cấy, lựa chọn một số khuẩn lạc rời rạc để kiểm tra sự hiện diện của các gen *Cyt-Cu/Zn SOD*, *GPX* và *GST* sau khi biến nạp.

Các mẫu khuẩn lạc của dòng *E. coli* mang vector tái tổ hợp chứa đoạn gen *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* sau khi chọn ra đã được tiến hành phản ứng PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc cho thấy xuất hiện băng có kích thước tương ứng với kích thước sản phẩm PCR gen chống oxy hóa đoạn gen mục tiêu *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* lần lượt là 362, 221 và 202 bp (hình 3.42). Điều

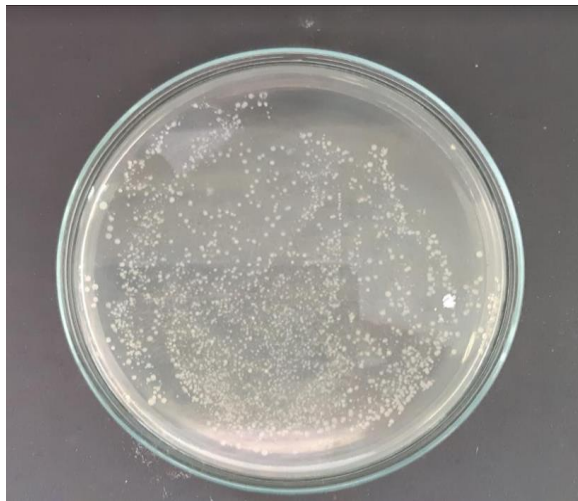
này, chứng tỏ plasmid mang gen chống oxy hoá đã được chuyển thành công vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α .



(a)

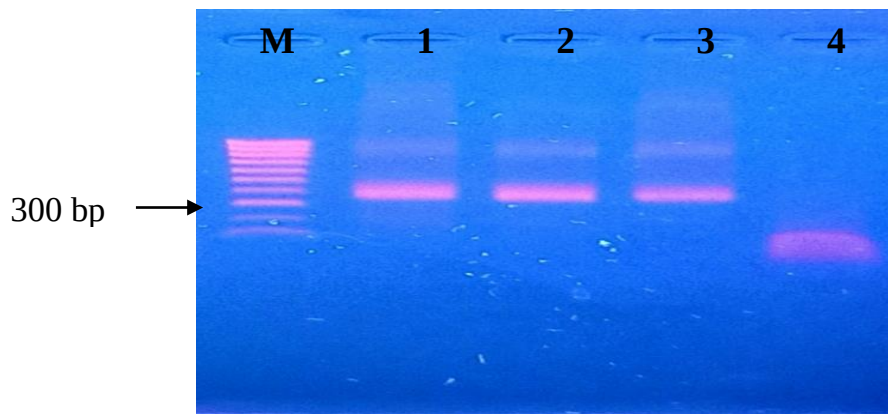


(b)

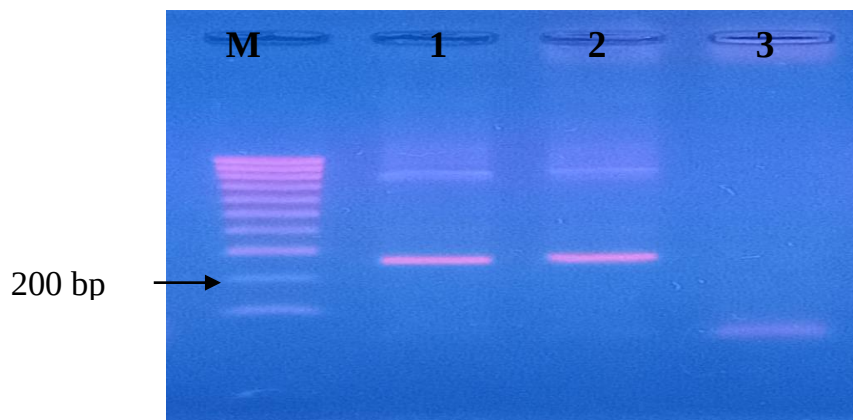


(c)

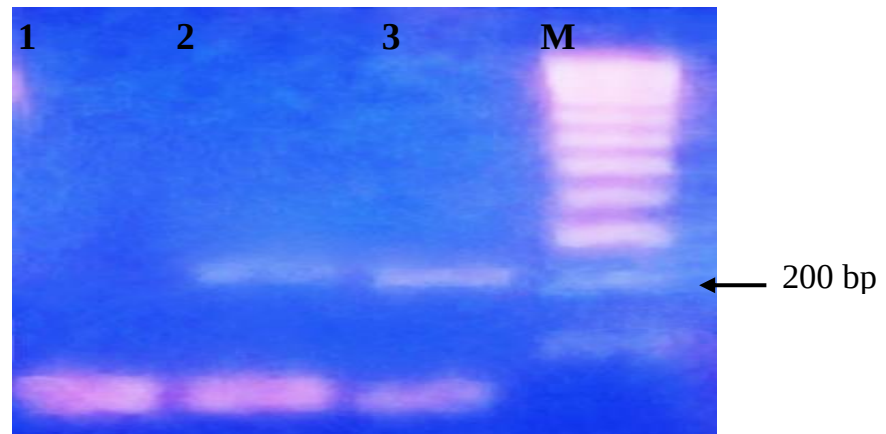
Hình 3.41 Khuẩn lạc *E. coli* đã tạo dòng gen trên môi trường LB. (a): gen *GST*; (b): gen *Cyt-Cu/Zn SOD* và (c): gen *GPX*



(a)



(b)

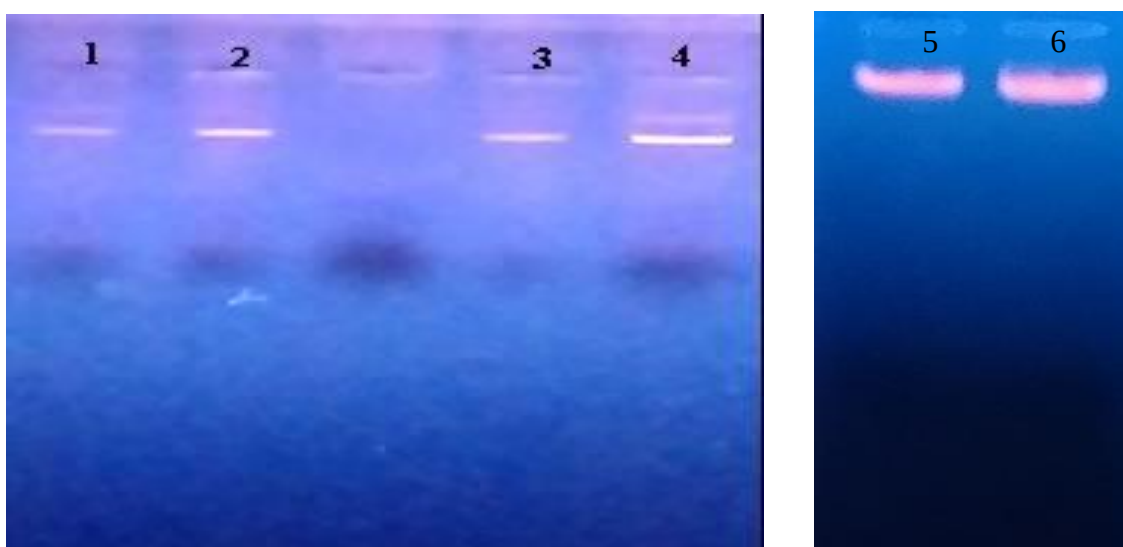


(c)

Hình 3.42. Kết quả PCR gen *GST* (a), *Cyt-Cu/Zn SOD* (b) và *GPX* (c) từ khuẩn lạc vi khuẩn. (M: Ladder 100 bp; (a) 1-3: gen *GST* từ vi khuẩn; 4: đối chứng âm; (b) 1-2: Gen *Cyt-Cu/Zn SOD* từ vi khuẩn; 3: đối chứng âm; (c) 2,3: gen *GPX* từ vi khuẩn; 1: đối chứng âm)

3.3.4. Ly trích DNA tái tổ hợp

Các mẫu khuẩn lạc của dòng *E. coli* đã biến nạp thành công mang vector tái tổ hợp chứa gen chống oxy hoá đã được tăng sinh trong môi trường LB bổ sung Ampicillin nồng độ 100 µg/ml (16 giờ ở 37°C). Sau đó 6 mẫu DNA plasmid đã được ly trích và kiểm tra bằng điện di trên gel (hình 3.43). Kết quả điện di cho thấy DNA tái tổ hợp được ly trích tốt, các giếng xuất hiện băng sáng rõ.



(a) (b)
Hình 3.43. Kết quả ly trích DNA tái tổ hợp. (a) 1-2: pGEM-T Easy/GST từ vi khuẩn; 3-4: pGEM-T Easy/Cyt-Cu/Zn SOD từ vi khuẩn; (b) 5-6: pGEM-T Easy/GPX từ vi khuẩn)

3.3.5. Giải trình tự các gen chống oxy hóa

3.3.5.1. Trình tự gen *GST*

Kết quả giải trình tự đoạn gen *GST* cho thấy đoạn gen có kích thước 362 bp, bằng đúng với kích thước đoạn gen mục tiêu cần tìm. Điều này chứng tỏ có sự hiện diện của gen *GST* mã hóa cho enzyme glutathione S-transferase trong cây Phát tài và cặp primer thiết kế có độ đặc hiệu cao.

Đoạn gen *GST* ở cây Phát tài có trình tự nucleotide như sau:

CACAAGAAGAACCCGGTCCTCCTCCACGACGGCAAGCCCGTCTG
 CGAGTCGTCGATCATCGTCCAATACATCGACGAGGTGTGGGCCGACA
 AAGCTCCGATCTTGCCCAAGGACCCCTATGGCCGGGCCCAAGCGAGA
 TTCTGGGCCGATTTTCATCGACAAGAAGATATACGAGTGCGGAAGTAG
 GCTGTGGAAGCTGAAGGGAGAAGCCCACGAGGAAGCCAAGAAGGAA
 TTCATCGAAATCTTGAAGCTGTTGGAGGGCGAGCTCGGCGACAAGAA
 ATTCTTTGGTGGTGATGAATTTGGGTTTGTGCGACATTACTCTTGTGCC
 CTTACCGCATGGTTCTACACCTACGAGACCTGCGC

Glutathione S- transferase (GST), một enzyme phổ biến và có nhiều chức năng đã được phát hiện đầu tiên ở động vật vào năm 1960, có vai trò quan trọng trong giải độc và vai trò bảo vệ thực vật của GST chống lại độc chất của thuốc diệt cỏ đã được chú ý và nghiên cứu rộng rãi vào năm 1970 (Wilce và Parker, 1994). Sau đó, các nghiên cứu về chức năng và các gen có liên quan đến enzyme này đã được nghiên cứu nhiều. Khá nhiều gen *GST* đã được xác định từ nhiều loài thực vật như *Arabidopsis thaliana* (55 gen), *Oryza sativa* (79 gen), *Capsella rubella* (49 gen), *Hordeum vulgare* (84 gen), *Citrus sinensis* (23 gen), *Gossypium arboreum* (49 gen), *Gossypium raimondii* (59 gen), *Brassica rapa* (75 gen) và *Solanum lycopersicum* (90 gen) (Wang và ctv, 2019). Thế nhưng, cho đến hiện tại, chưa có công bố chính thức nào về trình tự gen *GST* trên cây Phát tài. Do đó việc phát hiện trình tự gen *GST* sẽ góp phần bổ sung vào cơ sở di truyền các gen liên quan đến chống chịu stress phi sinh học.

Để so sánh mức độ tương đồng giữa các vùng gen, đề tài đã sử dụng trình tự gen *GST* trên loài cùng chi là cây huyết giác (*Dracaena cambodiana*) và kết quả sử dụng công cụ blast trên ngân hàng gen cho thấy mức độ tương đồng đến 98,62% với trình tự gen *GST* (glutathione-S-transferase) trên cây huyết giác (hình 3.44).

Sequences producing significant alignments

Download ▾

Manage Columns ▾

Show 10 ▾

☐ select all 0 sequences selected

[GenBank](#)

[Graphics](#)

[Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☐	Dracaena cambodiana glutathione S-transferase (GSTU5) mRNA, complete cds	641	641	100%	6e-180	98.62%	KU565013.1
☐	Dracaena cambodiana glutathione S-transferase (GSTU9) mRNA, partial cds	388	388	90%	9e-104	87.99%	KU565017.1
☐	PREDICTED: Asparagus officinalis probable glutathione S-transferase parA (LOC109844905), mRNA	339	339	100%	9e-89	83.65%	XM_020414071.1
☐	PREDICTED: Musa acuminata subsp. malaccensis probable glutathione S-transferase parA (LOC103999064), mRNA	265	265	99%	2e-66	80.00%	XM_009420713.2
☐	PREDICTED: Elaeis guineensis uncharacterized LOC105059433 (LOC105059433), partial mRNA	250	250	99%	4e-62	79.50%	XM_010942728.2
☐	PREDICTED: Elaeis guineensis probable glutathione S-transferase parA (LOC105037017), mRNA	244	244	99%	2e-60	79.22%	XM_010912722.3
☐	PREDICTED: Elaeis guineensis probable glutathione S-transferase parA (LOC105046779), transcript variant X2, mRNA	239	239	100%	9e-59	78.96%	XM_019851392.2
☐	PREDICTED: Elaeis guineensis probable glutathione S-transferase parA (LOC105046779), transcript variant X1, mRNA	239	239	100%	9e-59	78.96%	XM_010925498.3
☐	PREDICTED: Ananas comosus probable glutathione S-transferase parA (LOC109712989), mRNA	231	231	100%	2e-56	78.30%	XM_020236892.1
☐	PREDICTED: Musa acuminata subsp. malaccensis probable glutathione S-transferase parA (LOC103999069), mRNA	230	230	99%	6e-56	78.30%	XM_009420719.2

Hình 3.44. Kết quả tìm kiếm trình tự gen *GST* của cây Phát tài trên ngân hàng gen

Khi so sánh sự khác biệt giữa hai trình tự gen *GST* trên cây Phát tài và cây huyết giác (*Dracaena cambodiana* - mã số gen KU56013.1), có thể nhận thấy giữa hai trình tự có độ sai khác rất nhỏ, chỉ 2,38%, vùng trình tự sai khác nằm rải rác, mỗi điểm không vượt quá ba nucleotide (hình 3.45). Kết quả này cho biết rằng có sự hiện diện của gen mã hóa chất chống oxy hóa glutathione-S-transferase trên cây Phát tài. Trình tự gen *GST* trên cây Phát tài cũng tương đồng đến 87,99% với trình tự của một gen *GST* khác trên cây huyết giác (mã số gen KU56017.1) và nhiều loài cây khác như *Asparagus officinalis*, *Musa acuminata*, *Rhodamnia argentea*, *Eutrema salsugineum* (78% đến 83%). Điều này cho thấy, họ gen *GST* có rất nhiều loại gen *GST* khác nhau. Wang và ctv (2019) đã minh chứng cho vấn đề này khi phát hiện có đến 330 gen *GST* khác nhau trên genome cây lúa mì (*Triticum aestivum* L.)

KU565017.1 GST	-----GACGGCAAGCCCGTCTGCGAGTCGTCATCATC CACAAGAAGAACCCTCCTCCACGACGGCAAGCCCGTCTGCGAGTCGTCATCATC *****	33 60
KU565017.1 GST	GTCGAGTACATCGACGAGGTGTGGGCTACAAAGCTCCGATCTTGCCCAAGAGCCCTTAC GTCCAATACATCGACGAGGTGTGGGCGACAAAGCTCCGATCTTGCCCAAGGACCCCTAT *** * *****	93 120
KU565017.1 GST	GCCAGGGCCCAAGCCAGATTCTGGGCGGATTTCGTTGACAAGAAGATATACGAGTGCGGC GGCCGGGCCCAGCGAGATTCTGGGCGGATTTCATCGACAAGAAGATATACGAGTGCGGA * * *****	153 180
KU565017.1 GST	ACCAGGCTTTGAACTGAAGCCGAGAAAGCTCAGGAGGCAGCAAGAAGGAATTCATC ACTAGGCTGTGGAAGCTGAAGGGAG--AAGCCACGAGGAAGCCAAGAAGGAATTCATC ** *****	213 237
KU565017.1 GST	GAGCAGTGAAGTTGTGGAGGGAGAGCTCGGCGACAAGAAGTACTTTGGTGGTGATGAG GAAATCTTGAAGCTGTTGGAGGGGAGCTCGGCGACAAGAATTCCTTTGGTGGTGATGAA ** *****	273 297
KU565017.1 GST	TTTGGGTTTGTGACATTGCTCTCGTGCCCTTCACTGCATGGTTCTATAGCTACGGGACT TTTGGGTTTGTGACATTACTCTTGTGCCCTTCACTGCATGGTTCTACACCTACGAGACC *****	333 357
KU565017.1 GST	TTTGCCAACCTTCAGCGTGGAGGAGGAGGTGCCGAAGCTGGCTGCTTGGGGAAAGAGGTGC TGCGC----- * **	393 362

Hình 3.45. Kết quả so sánh trình tự gen *GST* trên *Dracaena sanderiana* và *Dracaena cambodiana* (KU565013.1) được công bố trên Genbank. Các vị trí nucleotide sai khác được biểu diễn bằng chữ màu đen có khung bên ngoài.

3.3.5.2. Trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD*

Trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* trên cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) với kích thước 221 bp:

GACACAACAAATGGATGCATGTCCACTGGACCTCATTTCAATCC
TGCTGAAAAGGAACACGGGGCACCTGAGGATGAGAACCGCCATGCC
GGTGATCTTGGAATGTGACTGCTGCTGAGGATGGAAGTCTCCTATT
AACGTTACTGACAACCAGATTCCACTCACTGGGCCAAATTCAATTGTT
GGAAGGGCTGTTGTTGTCCATGCCGATCCGGATGA

Cho đến nay, nhóm gen *SOD* đã được phát hiện ở nhiều loài thực vật như *Arabidopsis thaliana*, *Musa acuminata*, *Sorghum bicolor*, và *Populus trichocarpa*. Gen *SOD* gồm có 3 loại *Cu/ZnSOD*, *FeSOD* và *MnSOD*. Năm 2016, Feng đã xác định 9 gen *SOD* trên cây cà chua (*Solanum lycopersicum* L.) (4 gen *Cu/ZnSOD*, 4 gen *FeSOD* và 1 gen *MnSOD*) (Feng và ctv, 2015). Năm 2019, 26 gen *SOD* đã được xác định từ bộ gen lúa mì, gồm 17 gen *Cu/Zn-SOD*, 6 gen *Fe-SOD* và 3 gen *Mn-SOD* (Jiang và ctv, 2019). Trên cây Phát tài, chưa có

công bố chính thức nào về trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* trên ngân hàng gen. Do đó, sử dụng trình tự các gen *SOD* trên những loài thực vật khác để làm cơ sở so sánh mức độ tương đồng. Kết quả cho thấy, mức độ tương đồng của đoạn gen *Cyt-Cu/Zn SOD* ở cây Phát tài với một số cây trong chi cọ, măng tây lên đến 88%, độ che phủ 100% (hình 3.46).

Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100	?
☒ select all 100 sequences selected											
							GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
☒	PREDICTED: <i>Asparagus officinalis</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] 2-like (LOC109819605). mRNA	265	265	100%	9e-67	88.29%	XM_020385384.1				
☒	PREDICTED: <i>Elaeis guineensis</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC105059944). transcript variant X1. mRNA	254	254	100%	2e-63	87.33%	XM_010943475.3				
☒	PREDICTED: <i>Elaeis guineensis</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC105059944). transcript variant X2. mRNA	220	220	87%	2e-53	87.11%	XM_010943477.2				
☒	PREDICTED: <i>Asparagus officinalis</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 (LOC109831775). transcript variant X2. mRNA	248	248	100%	9e-62	86.94%	XM_020399187.1				
☒	PREDICTED: <i>Asparagus officinalis</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 (LOC109831775). transcript variant X1. mRNA	248	248	100%	9e-62	86.94%	XM_020399186.1				
☒	PREDICTED: <i>Elaeis guineensis</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC105036933). transcript variant X2. mRNA	215	215	100%	9e-52	84.16%	XM_029262279.1				
☒	PREDICTED: <i>Elaeis guineensis</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC105036933). transcript variant X1. mRNA	215	215	100%	9e-52	84.16%	XM_010912651.3				
☒	PREDICTED: <i>Amborella trichopoda</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC18445195). transcript variant X4. mRNA	215	215	100%	9e-52	84.16%	XM_020674150.1				
☒	PREDICTED: <i>Amborella trichopoda</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC18445195). transcript variant X3. mRNA	215	215	100%	9e-52	84.16%	XM_011629099.2				
☒	PREDICTED: <i>Amborella trichopoda</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC18445195). transcript variant X2. mRNA	215	215	100%	9e-52	84.16%	XM_020674149.1				
☒	PREDICTED: <i>Amborella trichopoda</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC18445195). transcript variant X1. mRNA	215	215	100%	9e-52	84.16%	XM_020674148.1				
☒	PREDICTED: <i>Vitis riparia</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC117931459). mRNA	209	209	100%	4e-50	83.71%	XM_034852474.1				
☒	PREDICTED: <i>Elaeis guineensis</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC105037251). mRNA	209	209	100%	4e-50	83.71%	XM_010912937.2				
☒	PREDICTED: <i>Vitis riparia</i> superoxide dismutase [Cu-Zn]-like (LOC117930961). transcript variant X3. mRNA	204	204	100%	2e-48	83.26%	XM_034851781.1				

Hình 3.46. Kết quả tìm kiếm trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* của cây Phát tài trên ngân hàng gen

Trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* trên cây Phát tài có sự tương đồng rất cao với một số loài đã được công bố trên ngân hàng gen như măng tây *Asparagus officinalis*, cọ dầu *Elaeis guineensis*, nho sừng *Vitis riparia*, *Vitis vinifera*, *Amborella trichopoda*. Tuy vậy, vẫn có một số vị trí có các nucleotide khác biệt giữa vùng gen *Cyt-Cu/Zn SOD* của cây Phát tài so với các loài khác, tỷ lệ khác biệt khoảng 12 - 17% (hình 3.46).

Khi so sánh trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* trên cây Phát tài với cây măng tây *Asparagus officinalis* và cây cọ dầu *Elaeis guineensis*, kết quả cho thấy các nucleotide khác biệt nằm rải rác trong toàn bộ vùng gen *Cyt-Cu/Zn SOD*, độ phân tán đồng đều. Tại mỗi điểm sai khác, số nucleotide

không vượt quá 03 (ba) nucleotide (hình 3.47). Kết quả này xác nhận rằng có sự hiện diện của gen *Cyt-Cu/Zn SOD* trên cây Phát tài, cặp môi sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự gen là đặc hiệu.

XM_010943475.3	CCACTGGGCCACATTTTAATCCTGCTGGAAGGAACATGGGGCACCTGAAGATGAGAACC	380
XM_010943477.2	ATGCAGGGCCACATTTTAATCCTGCTGGAAGGAACATGGGGCACCTGAAGATGAGAACC	317
XM_020399186.1	CCACTGGACCTCATTTCAATCCTGCTGGAAGGAACATGGAGCGCCTAATGATGAGAACC	395
XM_020399187.1	CCACTGGACCTCATTTCAATCCTGCTGGAAGGAACATGGAGCGCCTAATGATGAGAACC	344
CYT	CCACTGGACCTCATTTCAATCCTGCTGGAAGGAACACGGGGCACCTGAGGATGAGAACC	82
XM_020385384.1	CCACTGGACCTCATTTCAATCCTGCTGGAAGGAACATGGGGCACCTGAAGATGAGAATC	357
***** ** ** *		
XM_010943475.3	GCCATGCCGGTGATCTTGAAATGTGACTGCTGGCGAAGATGGTACTGTTAATTTAGCA	440
XM_010943477.2	GCCATGCCGGTGATCTTGAAATGTGACTGCTGGCGAAGATGGTACTGTTAATTTAGCA	377
XM_020399186.1	GCCATGCTGGTGACCTTGAAATGTGACTGCTACTGAGGATGGGACTGCTAGCTTCAGTA	455
XM_020399187.1	GCCATGCTGGTGACCTTGAAATGTGACTGCTACTGAGGATGGGACTGCTAGCTTCAGTA	404
CYT	GCCATGCCGGTGATCTTGAAATGTGACTGCTGCTGAGGATGGAACTGCTCCTATTAACG	142
XM_020385384.1	GCCATGCTGGTGACCTTGAAATGTGACTGTTGCTGAGGATGGGACCGTACTTTCAGTA	417
***** ** ** *		
XM_010943475.3	TTATTGACAAGCAGATTCTCTTAGTGACCAGAAATTCATTATTGGAAGGGCTGTTGTTG	500
XM_010943477.2	TTATTGACAAGCAGATTCTCTTAGTGACCAGAAATTCATTATTGGAAGGGCTGTTGTTG	437
XM_020399186.1	TTGTTGACAGCCAGATTCCACTCACTGGGCCAGAAATTCATTATAGGAAGGGCTGTTGTTG	515
XM_020399187.1	TTGTTGACAGCCAGATTCCACTCACTGGGCCAGAAATTCATTATAGGAAGGGCTGTTGTTG	464
CYT	TTACTGACAACAGATTCCACTCACTGGGCCAGAAATTCATTGTTGGAAGGGCTGTTGTTG	202
XM_020385384.1	TTACTGACAGTCAGATTCCACTCACTGGGCCAGAAATTCATTATTGGAAGAGCTGTTGTTG	477
** ***** ** ** *		
XM_010943475.3	TCCATGCCGATCCTGATGACCTTGAAAGGGTGGACATGAGCTTAGCAAAAGCACTGGAA	560
XM_010943477.2	TCCATGCCGATCCTGATGACCTTGAAAGGGTGGACATGAGCTTAGCAAAAGCACTGGAA	497
XM_020399186.1	TCCATGCTGATCCCGATGATCTTGAAAGGGTGGGATGAGCTTAGCAAAAGCACCGGAA	575
XM_020399187.1	TCCATGCTGATCCCGATGATCTTGAAAGGGTGGGATGAGCTTAGCAAAAGCACCGGAA	524
CYT	TCCATGCCGATCCGGATGA-----	221
XM_020385384.1	TCCATGCTGACCTGATGATCTTGAAAGGGTGGACACGAGCTTAGCAAAAGCACTGGAA	537
***** ** ** *		

Hình 3.47. Kết quả so sánh trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* trên *Dracaena sanderiana* với trình tự gen của *Elaeis guineensis* và *Asparagus officinalis* (Các vị trí nucleotide sai khác được biểu diễn bằng chữ màu đen có khung bên ngoài. CYT: trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* của cây Phát tài; XM_010943475.3 và XM_010943477.2: Trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* cây *Elaeis guineensis*; XM_020399186.1, XM_020399187.1 và XM_020385384.1: Trình tự gen *SOD* cây *Asparagus officinalis*)

3.3.5.2. Trình tự gen *GPX*

Kết quả giải trình tự đoạn gen *GPX* cho thấy đoạn gen có kích thước 202 bp, bằng đúng với kích thước đoạn gen mục tiêu cần tìm. Điều này chứng tỏ có sự hiện diện của gen *GPX* trong cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*). Trình tự nucleotide của đoạn gen *GPX* trên cây Phát tài được xác định như sau:

TTTCCGTGCAATCAGTTTGGATCACAAGAGCCTGGGAGCAA
CGAGGAGATTTTAGAATTTGCTTGCCTTCAAGGCTGAAT

ATCCCATCTTTGACAAGGTTGATGTGAATGGGCAAAATGCTGCA
 CCCATCTATAAGTTCTTGAAGTCGCAGAAAGGTGGCATATTTGG
 AGATGGCATCAAGTGGAACCTTCTCCAAGT

Gen GPX đã được tìm thấy trên nhiều loài thực vật có vai trò điều chỉnh H_2O_2 trong điều kiện stress lạnh và hạn như 5 gen GPX được tìm thấy trên cây lúa, 8 gen *AtGPX* trên *Arabidopsis*, 6 gen *GPX* trên *Cucumis sativus* (Ozyigit và ctv, 2016). Gần đây, Zhou và ctv (2018) cũng đã xác định được 6 gen *CsGPX* trên loài thực vật *Cucumis sativus*.

Hiện tại, trên cây Phát tài *Dracaena sanderiana*, chưa có trình tự gen chống oxy hóa *GPX* nào được công bố trên ngân hàng gen. Do đó, sử dụng trình tự các gen *GPX* trên những loài thực vật khác để làm cơ sở so sánh. Khi đem trình tự gen *GPX* trên cây Phát tài so sánh với các loài cây khác trên ngân hàng gen, kết quả cho thấy trình tự gen phát hiện trên cây phát tài giống nhất với trình tự gen của cây măng tây *Asparagus officinalis* với mức độ tương đồng là 87,75% (Hình 3.48). Ngoài ra trình tự gen *GPX* của cây Phát tài cũng tương đồng trên 80% với nhiều loài thực vật khác như cây sen *Nelumbo nucifera*, cây cao lương *Sorghum bicolor* và cây sấu riêng *Durio zibethinus*.

Đề tài cũng đã sử dụng phần mềm BLAST để dịch mã từ trình tự nucleotide thành protein, và kết quả cho thấy protein được mã hóa từ trình tự gen *GPX* trên cây Phát tài giống với enzyme glutathione peroxidase của cây khoai mì *Manihot esculenta* đến 92,54%, cây thầu dầu *Ricinus communis* đến 91,04%, cây lồi công đằng *Tripterygium wilfordii* đến 92,54% (Hình 3.49). Điều này khẳng định có sự hiện diện của gen *GPX* trong cây Phát tài *Dracaena sanderiana*.

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	PREDICTED: <i>Asparagus officinalis</i> probable phospholipid hydroperox... garden a...		235	235	100%	7e-58	87.75%	998	XM_020405031.1
✓	PREDICTED: <i>Nelumbo nucifera</i> probable phospholipid hydroperoxid... sacred lot...		191	191	100%	1e-44	83.90%	912	XM_010274762.2
✓	PREDICTED: <i>Nelumbo nucifera</i> probable phospholipid hydroperoxid... sacred lot...		191	191	100%	1e-44	83.90%	914	XM_019199657.1
✓	PREDICTED: <i>Nelumbo nucifera</i> probable phospholipid hydroperoxid... sacred lot...		191	191	100%	1e-44	83.90%	950	XM_010274761.2
✓	PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> probable phospholipid hydroperoxide ... sorghum		158	158	100%	1e-34	80.88%	1245	XM_002454470.2
✓	PREDICTED: <i>Durio zibethinus</i> probable phospholipid hydroperoxide ... Durio zib...		152	152	100%	7e-33	80.49%	928	XM_022864510.1
	PREDICTED: <i>Eucalyptus grandis</i> probable phospholipid hydroperoxi... Eucalypt...		141	141	100%	1e-29	79.51%	1013	XM_010054968.2
	PREDICTED: <i>Arachis hypogaea</i> probable glutathione peroxidase 2 (... peanut		119	119	64%	7e-23	83.08%	1135	XM_025783421.2
	PREDICTED: <i>Arachis hypogaea</i> probable glutathione peroxidase 2 (... peanut		119	119	64%	7e-23	83.08%	936	XM_025783420.2
	PREDICTED: <i>Arachis hypogaea</i> probable glutathione peroxidase 2 (... peanut		119	119	64%	7e-23	83.08%	913	XM_025835111.2
	PREDICTED: <i>Arachis duranensis</i> probable glutathione peroxidase 2 (... Arachis d...		119	119	64%	7e-23	83.08%	1124	XM_021139284.1
	PREDICTED: <i>Arachis duranensis</i> probable glutathione peroxidase 2 (... Arachis d...		119	119	64%	7e-23	83.08%	961	XM_016101724.2

Hình 3.48. Kết quả tìm kiếm trình tự gen *GPX* của cây Phát tài trên ngân hàng gen

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Manih...	cassava	140	140	99%	1e-39	92.54%	238	XP_021605013.1
✓	probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Ricin...	castor bean	139	139	99%	2e-39	91.04%	236	XP_002509790.2
✓	glutathione peroxidase [Tripterygium wilfordii]	Tripterygi...	136	136	99%	4e-39	92.54%	164	KAF5734488.1
✓	PREDICTED: probable phospholipid hydroperoxide glutathione pero...	Tarenaya...	138	138	99%	6e-39	92.54%	242	XP_010529569.1
✓	probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Pistaci...	Pistacia v...	138	138	99%	6e-39	89.55%	237	XP_031278527.1
✓	glutathione peroxidase, putative [Ricinus communis]	castor bean	135	135	99%	1e-38	91.04%	168	EEF51177.1
✓	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: probable phospholipid hyd...	Euphrate...	137	137	99%	1e-38	88.06%	235	XP_011029376.1
✓	hypothetical protein G4B88_014309 [Cannabis sativa]	hemp	138	138	99%	1e-38	89.55%	265	KAF4403853.1
✓	RecName: Full=Probable phospholipid hydroperoxide glutathione p...	spinach	135	135	99%	2e-38	89.55%	171	O23814.1
✓	hypothetical protein SOVF_184030 [Spinacia oleracea]	spinach	133	133	99%	2e-38	89.55%	118	KNA06117.1
✓	redoxin domain-containing protein [Acinetobacter indicus]	Acinetob...	134	134	99%	2e-38	89.55%	146	WP_168415076.1
✓	PREDICTED: probable phospholipid hydroperoxide glutathione pero...	Brassica ...	136	136	99%	2e-38	88.06%	229	XP_013615289.1

Hình 3.49. Kết quả BLAST nucleotide trong ngân hàng gen NCBI

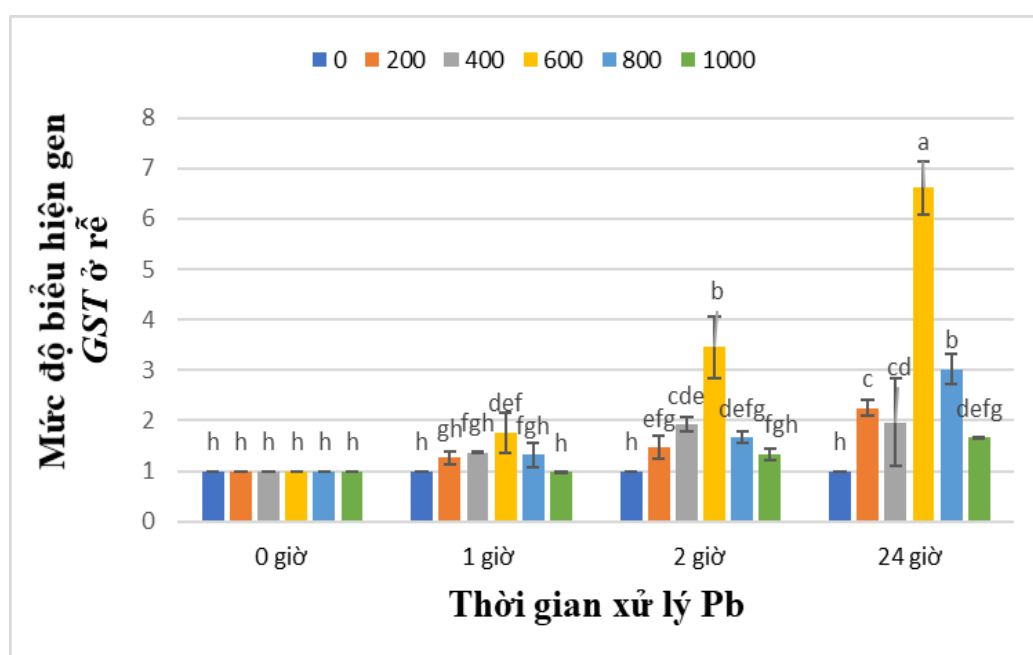
Như vậy, có thể khẳng định, trình tự gen *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* trên cây Phát tài *Dracaena sanderiana* đã được khuếch đại và giải trình tự là chính xác. Kết quả này đồng thời bổ sung vào ngân hàng gen NCBI trình tự các gen

chống oxy hóa của cây Phát tài đặc biệt là nhóm các gen *GST*, *SOD* và *GPX* có thể trở thành nguồn tài liệu tham khảo cho các nghiên cứu liên quan.

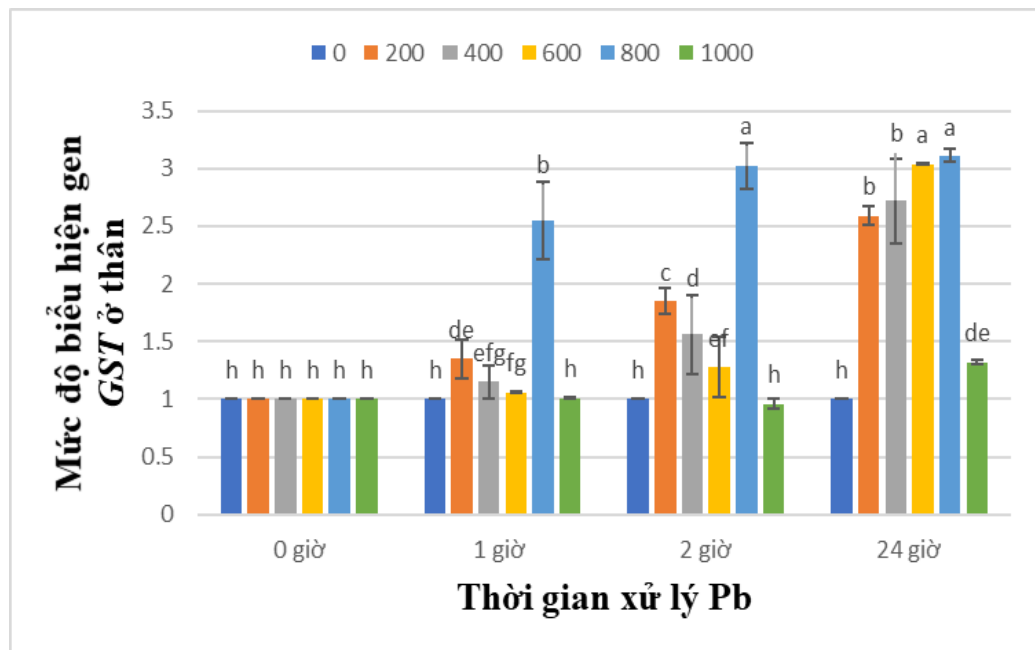
3.3.6. Đánh giá mức độ biểu hiện gen chống oxy hóa của cây Phát tài

3.3.6.1. Đánh giá mức độ biểu hiện gen *GST*

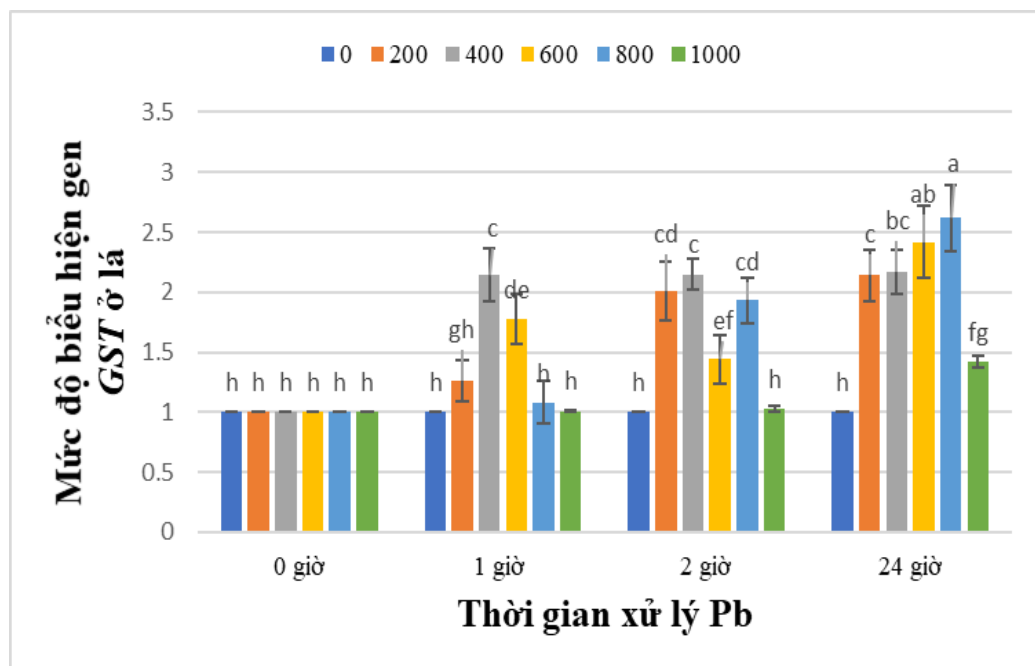
Mức độ biểu hiện gen *GST* được xác định trên 3 bộ phận rễ, thân và lá của cây Phát tài ở các thời gian khác nhau dưới sự tác động của các nồng độ Pb khác nhau được thể hiện qua các hình 3.50, hình 3.51 và hình 3.52. Pb ở tất cả các nồng độ khảo sát đều có tác động làm tăng biểu hiện gen *GST*, tỷ lệ biểu hiện gen ở cả rễ, thân và lá đều cao hơn và có sự khác biệt rất có ý nghĩa so với nghiệm thức không xử lý Pb (đối chứng) ($p < 0,01$).



Hình 3.50. Mức độ biểu hiện của gen *GST* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.51. Mức độ biểu hiện của gen *GST* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.52. Mức độ biểu hiện của gen *GST* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Mức độ biểu hiện gen *GST* tăng gấp 1,67 - 6,61 lần ở rễ, 1,32 - 3,11 lần ở thân và 1,42 - 2,62 lần ở lá sau 24 giờ tiếp xúc. Sự tiếp xúc trực tiếp với Pb đã thúc đẩy sự tích lũy Pb và tăng cường hoạt động của gen chống oxy hóa (trong trường hợp này là *GST*) (Brunet và ctv, 2008). Glutathione S-transferase (*GST*) là một enzyme đa chức năng, đóng nhiều vai trò trong đáp ứng và chống chịu với điều kiện nhiễm độc Pb, đặc biệt một số loại *GST* tham gia quá trình gắn kết kim loại nặng và vận chuyển đến tích lũy ở không bào của tế bào (Shahrtash, 2013).

Trong điều kiện nhiễm độc KLN nói chung và Pb nói riêng, việc tăng cường biểu hiện gen *GST* có thể là cách thức để cây giải độc vì khi đó enzyme *GST* tạo ra nhiều để vận chuyển Pb đến những khu vực không gây ảnh hưởng cho quá trình trao đổi chất ở tế bào (không bào hoặc gian bào) (Shahrtash, 2013).

Mức độ biểu hiện gen *GST* theo nồng độ Pb được xếp theo thứ tự như sau: 600 ppm > 800 ppm > 200 ppm > 400 ppm > 1000 ppm > 0 ppm (rễ); 800 ppm > 200 ppm > 400 ppm = 600 ppm > 1000 ppm > 0 ppm (thân); 400 ppm > 600 ppm = 800 ppm > 200 ppm > 1000 ppm > 0 ppm (lá). Kết quả này cho thấy rằng, nồng độ Pb khác nhau, tỷ lệ biểu hiện gen *GST* cũng khác nhau. Gen *GST* trên cây Phát tài vẫn biểu hiện tốt đến nồng độ Pb 800 ppm và biểu hiện thấp nhất ở nồng độ 1000 ppm (gấp 1,67 lần so với đối chứng không xử lý Pb). Nồng độ Pb cao làm ức chế hoạt động của gen *GST* (Brunet và ctv, 2008). Kết quả này phù hợp với kết quả về khả năng chống chịu của cây Phát tài, ở 800 ppm Pb cây vẫn có khả năng chống chịu Pb trên 80%, nhưng ở nồng độ 1000 ppm khả năng chống chịu Pb của cây rất thấp hoặc không có khả năng chống chịu. Điều này có thể có liên quan đến sự biểu hiện của gen *GST*.

Đáng chú ý nhất trong kết quả này là tỷ lệ biểu hiện gen *GST* ở 24 giờ của nghiệm thức có nồng độ Pb 600 ppm ở rễ, cao hơn rất nhiều so với các nồng độ ở các nghiệm thức còn lại, và mạnh hơn gấp 6,61 lần so với đối chứng (0 ppm và 0 giờ) (hình 3.50). Điều này cho thấy có sự đáp ứng mạnh mẽ của gen *GST* khi rễ cây tiếp xúc với 600 ppm Pb, và đây có thể là nguyên nhân làm cho cây chống chịu stress Pb nhiều hơn so với ở các nồng độ khác.

Rễ là bộ phận tiếp xúc trực tiếp với Pb và tích lũy phần lớn Pb, nhưng sự gia tăng biểu hiện gen *GST* xảy ra chủ yếu ở thân và lá (thân > lá) (ngoại trừ nồng độ 600 ppm) (hình 3.50, hình 3.51 và hình 3.52). Điều này cho thấy rằng gen *GST* trong thân và lá cảm ứng với Pb mạnh hơn trong rễ. Hoạt động *GST* ở thân và lá tăng hơn khi tiếp xúc với Pb có thể cho biết đã có nhiều GSH hơn tham gia vào quá trình hình thành liên kết với độc tố Pb và vận chuyển Pb từ rễ lên thân lá nhằm giảm áp lực gây độc của Pb ở rễ. *GST* là gen mã hóa enzyme Glutathione S-transferase xúc tác phản ứng gắn kết của GSH và Pb vận chuyển đến không bào (Mittler và ctv, 2002). Gen *GST* biểu hiện ở lá cao hơn ở rễ cũng được phát hiện ở *Arabidopsis* trong điều kiện stress Al (Ezaki và ctv, 2004). Kết quả nghiên cứu của Kisa (2017) cũng cho thấy, gen *GST* tăng đáng kể trong lá cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*) ở tất cả nồng độ Pb xử lý và có liên quan đến sự hiện diện của enzyme Glutathione S-transferase (Kisa, 2017). Kết quả gen *GST* biểu hiện mạnh ở thân hơn lá có thể là lý do dẫn đến hàm lượng Pb tích lũy trong thân nhiều hơn trong lá.

Bảng 3.6. Sự thay đổi biểu hiện gen *GST* theo thời gian của các mẫu ở các nồng độ Pb

Bộ phận	200 ppm			400 ppm			600 ppm			800 ppm			1000 ppm		
	1	2	24	1	2	24	1	2	24	1	2	24	1	2	24
Rễ	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→	→	↑
Thân	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→	→	↑
Lá	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→	↑	↑	→	→	↑

Trong cùng một nồng độ và bộ phận, mũi tên thể hiện sự thay đổi mức độ biểu hiện gen tại thời điểm sau so với thời điểm trước liền kề. “↑, ↓, →”: Tăng, giảm, không đổi; “1, 2, 24”: 1 giờ, 2 giờ và 24 giờ.

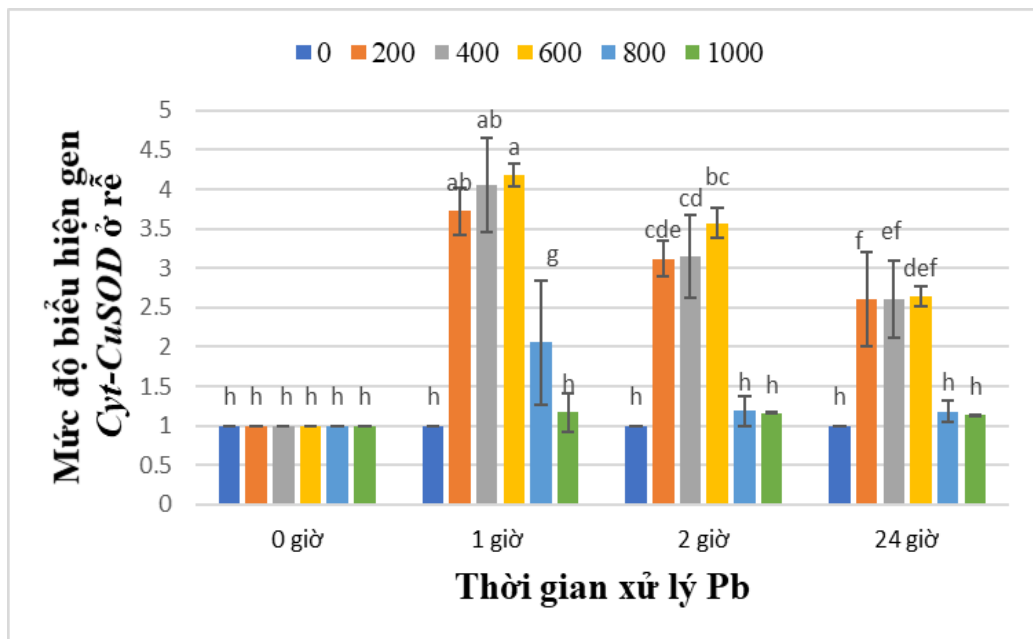
Sự thay đổi biểu hiện gen *GST* ở thời gian 1 giờ, 2 giờ và 24 giờ giống nhau ở nồng độ Pb < 1000 ppm trên cả 3 bộ phận rễ, thân và lá (bảng 3.6). Gen

GST biểu hiện ngay sau khi cây tiếp xúc với chì ở nồng độ 200, 400, 600 và 800 ppm (1 giờ), nhưng có mức độ thấp và tăng nhanh dần đến 24 giờ và có xu hướng tiếp tục tăng. Ở 1 giờ, tỷ lệ biểu hiện gen tăng gấp 1,27 - 1,77 lần ở rễ, 1,06 - 2,55 lần ở thân và 1,08 - 2,14 lần ở lá. Ở 24 giờ, tỷ lệ biểu hiện gen tăng gấp 1,97 - 6,61 lần ở rễ, 2,59 - 3,11 lần ở thân và 2,14 - 2,62 lần ở lá. Ở nồng độ 1000 ppm Pb, mức độ biểu hiện gen *GST* ở 24 giờ khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) với thời điểm 1 giờ, 2 giờ và 0 giờ và tỷ lệ biểu hiện gen ở 1 giờ và 2 giờ không khác biệt với 0 giờ ($p < 0,05$). Điều này cho thấy, so với các nồng độ Pb xử lý khác, ở nồng độ 1000 ppm, gen *GST* biểu hiện chậm hơn.

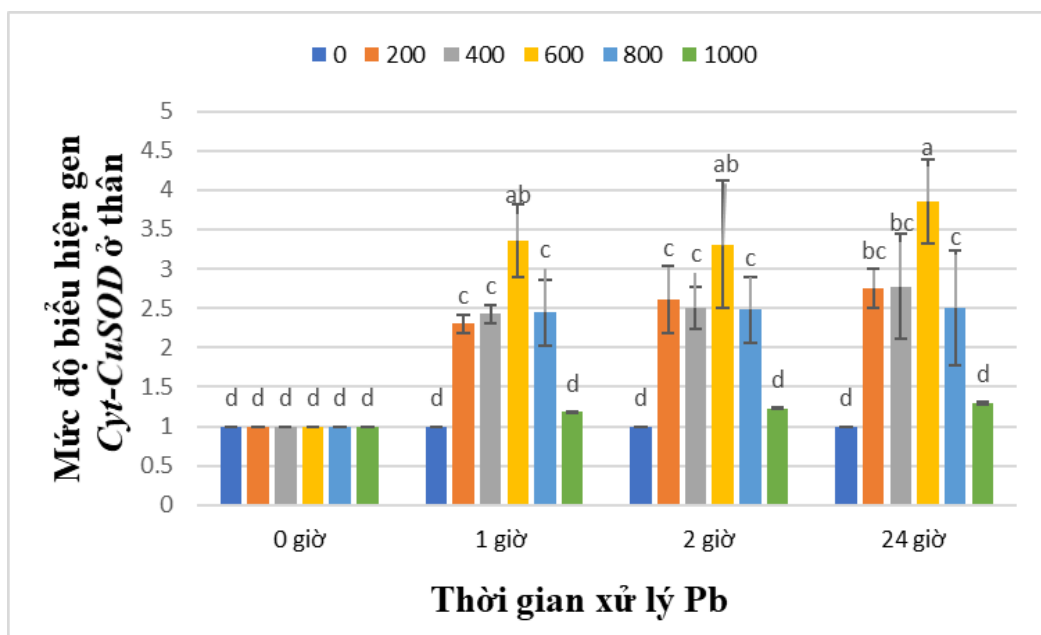
Như vậy có thể thấy, gen *GST* đáp ứng thấp đối với Pb ở thời gian tiếp xúc ngắn (1 - 2 giờ), nhưng đáp ứng mạnh ở thời gian tiếp xúc lâu hơn (2 - 24 giờ) và có dấu hiệu tiếp tục tăng biểu hiện gen. Ở nồng độ Pb < 1000 ppm, gen *GST* đáp ứng với độc tố Pb nhanh hơn ở nồng độ 1000 ppm. Sự đáp ứng nhanh với Pb của gen *GST* sẽ giúp cho cây ít bị tổn thương và giúp cho các hoạt động trao đổi chất diễn ra bình thường. Kết quả của đề tài tương tự với kết quả trên loài *A. thaliana*, gen *GST* biểu hiện thấp ở 1 - 2 giờ và tăng mạnh từ 3 giờ đến 24 giờ sau khi xử lý với Pb và mức độ biểu hiện gen có dấu hiệu tiếp tục tăng ở thời gian tiếp xúc dài hơn 24 giờ (Liu và ctv, 2016). Theo nhận định của Shahrtash (2013), biểu hiện gen *GST* vẫn ở mức cao ở 48 giờ, cho nên rất có khả năng biểu hiện gen *GST* của cây Phát tài có thể cũng đạt mức độ cao nhất trong khoảng 24 - 48 giờ sau xử lý Pb.

3.3.6.2. Đánh giá mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD*

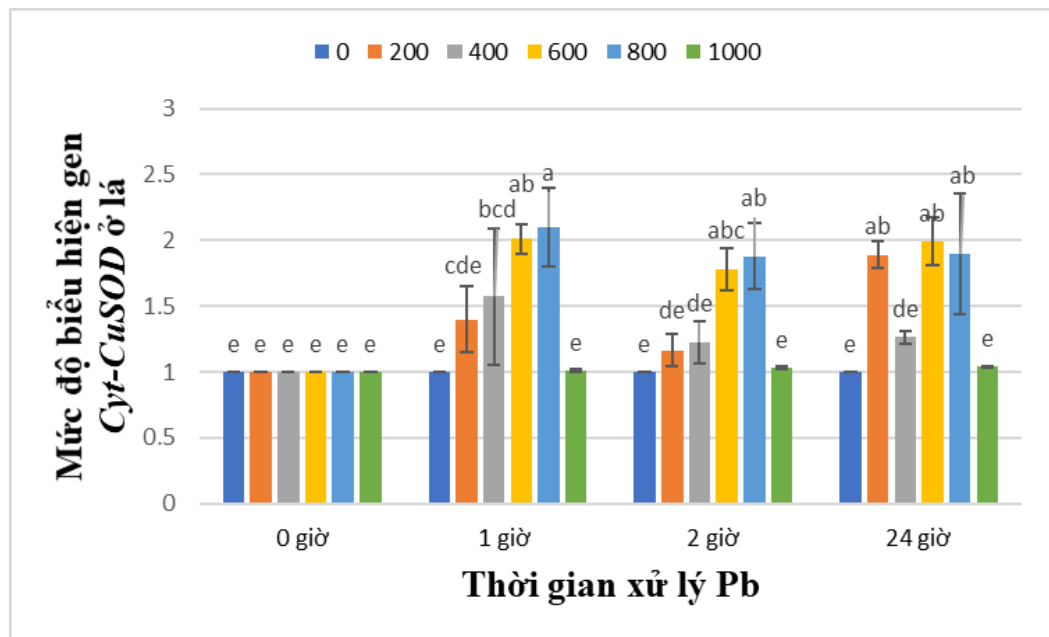
Kết quả phân tích tỷ lệ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* trên cây Phát tài ở các thời gian và nồng độ Pb khác nhau được thể hiện lần lượt qua hình 3.53; hình 3.54 và hình 3.55.



Hình 3.53. Mức độ biểu hiện của gen *Cyt-Cu/Zn SOD* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.54. Mức độ biểu hiện của gen *Cyt-Cu/Zn SOD* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.55. Mức độ biểu hiện của gen *Cyt-Cu/Zn SOD* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Kết quả cho thấy, nồng độ Pb khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến mức độ biểu hiện gen ở các bộ phận của cây Phát tài. Nồng độ Pb < 1000 ppm có tác động làm tăng mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* ở các bộ phận của cây. Tỷ lệ biểu hiện gen ở các mẫu rễ, thân và lá ở các nồng độ Pb 200, 400, 600 và 800 ppm có sự khác biệt có ý nghĩa đối với nghiệm thức đối chứng (0 ppm và 0 giờ) ($P < 0,01$). Ngược lại, nồng độ Pb 1000 ppm có tác động ức chế biểu hiện gen, tỷ lệ biểu hiện gen thay đổi không đáng kể và không có sự khác biệt so với đối chứng ($p < 0,01$).

Sự tăng nồng độ Pb xử lý từ 0 đến 600 ppm làm cho mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* ở rễ và thân cũng tăng lên. Mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* ở rễ tăng từ 2,61 lên 2,85 lần và ở thân tăng từ 2,17 lên 2,88 lần so với đối chứng. Mức độ biểu hiện gen tăng cao nhất khi xử lý Pb ở nồng độ 600 ppm. Tuy nhiên, nồng độ Pb xử lý tăng trên 600 ppm làm cho mức độ biểu hiện gen giảm xuống (ở rễ giảm từ 2,85 xuống 1,12 và ở thân giảm từ 2,88 xuống 1,18 so với nghiệm thức nồng độ Pb 600 ppm). Khác với bộ phận rễ và thân, mức độ

biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* ở lá tăng dần từ nồng độ 0 ppm đến 800 ppm và tăng cao nhất ở nồng độ chì xử lý là 800 ppm (1,72 lần) và giảm ở nồng độ 1000 ppm (1,02 lần). Kết quả này cho thấy nồng độ Pb cao làm ức chế hoạt động của gen. Một số nghiên cứu trên các kim loại khác cũng cho rằng gen *SOD* có biểu hiện cao ở nồng độ thấp và biểu hiện thấp ở nồng độ cao: Gen *SOD* tăng ở nồng độ Cd 25-100 ppm và giảm ở nồng độ Cd 100-200 ppm ở thực vật *Brassica juncea* L.; Gen *SOD* tăng ở nồng độ Fe xử lý 10 - 80 μ M và giảm ở nồng độ 80-160 μ M ở thực vật *Bacopa monnieri* L. (Shekhawat và ctv, 2010).

Sự tác động của Pb làm tăng biểu hiện gen *SOD* cũng đã được phát hiện trên nhiều loài thực vật như *Perennial ryegrass* (Li và ctv, 2012), *Festuca arundinacea* Schreb, 3 giống lúa mì mùa xuân (*Triticum aestivum* L.) (Navabpour và ctv, 2020). Thực vật có sự gia tăng biểu hiện gen *SOD* khi nhiễm độc Pb là nhằm chống lại stress oxy hóa và bảo vệ hệ thống phòng thủ trước tác động của các chất oxy hóa (Malecka và ctv, 2009).

Mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* ở các bộ phận cây có sự biến động khác nhau theo thời gian xử lý (bảng 3.7). Ở rễ, mức độ biểu hiện gen ở tất cả nồng độ Pb biểu hiện mạnh ở 1 giờ xử lý và giảm dần cho đến 24 giờ; Ở thân, mức độ biểu hiện gen tăng dần cho đến khi đạt mức độ cao nhất ở 24 giờ; Và ở lá, mức độ biểu hiện gen tăng đến 1 giờ xử lý, sau đó giảm đến 2 giờ và tăng lên lại đến 24 giờ. Mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* cao nhất được xác định ở bộ phận rễ của cây ở thời gian 1 giờ. Kết quả này có thể được giải thích như sau: *SOD* là gen mã hoá cho một enzyme quan trọng trong hệ thống chống oxy hoá là superoxide dismutase, xúc tác khử $O_2^{\cdot -}$ thành H_2O_2 và O_2 , cho nên *SOD* là gen cảm ứng đầu tiên đối với chì và bộ phận rễ là bộ phận trực tiếp và đầu tiên tiếp xúc với tác nhân Pb nên đã có sự đáp ứng gen từ sớm để tăng cường sự biểu hiện và tăng hoạt tính enzyme superoxide dismutase trong cây, kiểm soát nhanh chóng và kịp thời tình trạng stress làm giảm thiệt hại, sau đó đã giảm dần khi đi vào giai đoạn thích nghi. Malecka cũng cho rằng *SOD* là lớp bảo vệ đầu tiên chống lại ROS do tác nhân Pb (Malecka và ctv, 2009). Kết quả nghiên cứu của

Li (2012) trên cây *L. perenne* và Liu (2016) trên cây *A. Thaliana* cho thấy rằng sự có mặt của Pb làm tăng biểu hiện gen *SOD* đáng kể trong vòng 3 giờ sau khi xử lý và sau đó giảm dần đến mức ổn định (Li và ctv, 2012; Liu và ctv, 2016). Rossatto và ctv (2017) khảo sát hoạt động của nhóm gen *SOD* trên cây lúa cũng nhận thấy rằng, hoạt động của gen *SOD* có xu hướng tăng khi xử lý trong thời gian ngắn, nhưng khi tiếp tục tăng thời gian xử lý thì các gen giảm mức độ biểu hiện.

Bảng 3.7. Sự thay đổi biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* theo thời gian của các mẫu ở các nồng độ Pb

Bộ phận	200 ppm			400 ppm			600 ppm			800 ppm			1000 ppm		
	1	2	24	1	2	24	1	2	24	1	2	24	1	2	24
Rễ	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓
Thân	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Lá	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	→	→	→

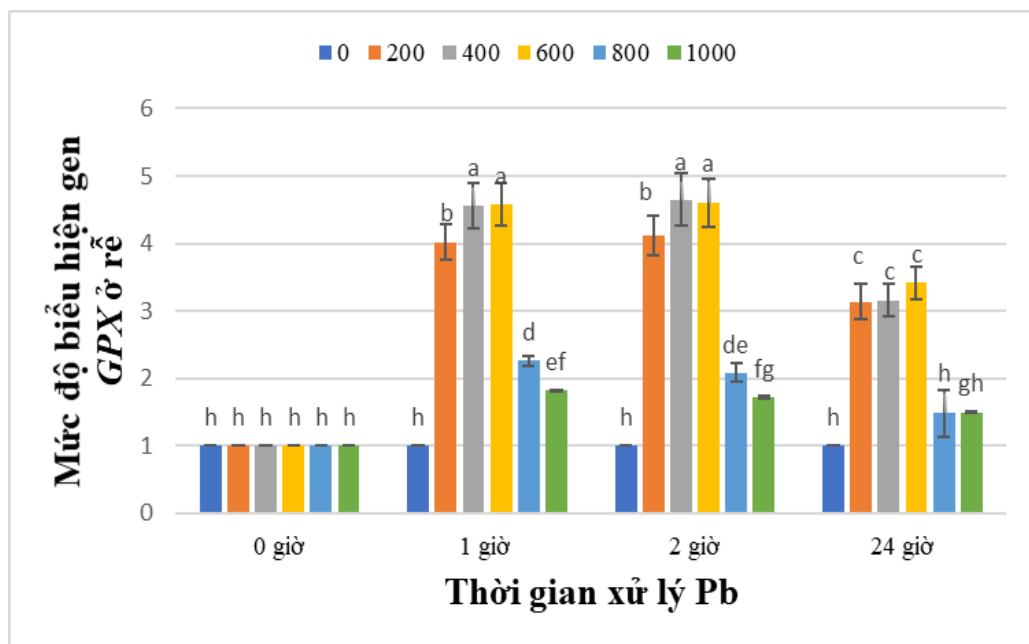
Trong cùng một nồng độ và bộ phận, mũi tên thể hiện sự thay đổi mức độ biểu hiện gen tại thời điểm sau so với thời điểm trước liền kề. “↑, ↓, →”: Tăng, giảm, không đổi; “1, 2, 24”: 1 giờ, 2 giờ và 24 giờ.

3.3.6.3. Đánh giá mức độ biểu hiện gen *GPX*

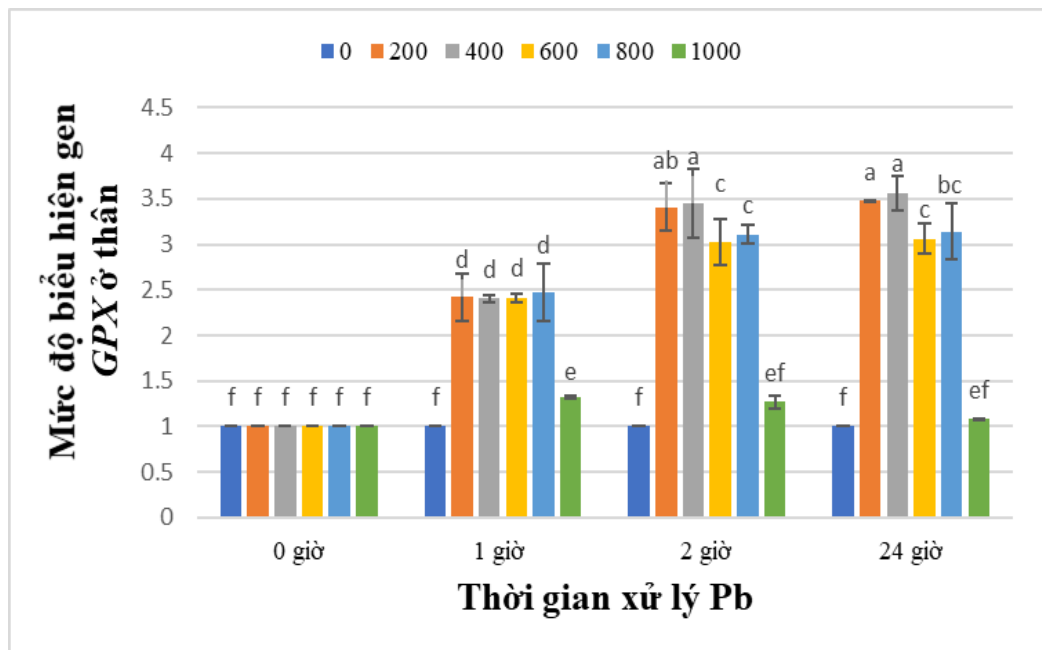
GPX là gen mã hóa enzyme Glutathione peroxidase (*GPX*), một loại enzyme chống oxy hóa quan trọng có vai trò trong việc duy trì sự cân bằng hydrogen peroxide (H_2O_2) trong tế bào và điều chỉnh phản ứng của thực vật đối với các stress phi sinh học (hạn, mặn, nhiệt độ khắc nghiệt và kim loại nặng) bằng cách xúc tác phản ứng chuyển đổi H_2O_2 thành H_2O (Zhou và ctv, 2018).

Kết quả phân tích biểu hiện gen *GPX* ở cây Phát tài được thể hiện qua hình 3.56, hình 3.57 và hình 3.58. Tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* ở tất cả các mẫu cây Phát tài xử lý Pb có sự khác biệt rất có ý nghĩa so với các mẫu cây không xử lý Pb và các mẫu cây trước xử lý ($p < 0,01$). Tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* ở tất cả các mẫu rễ,

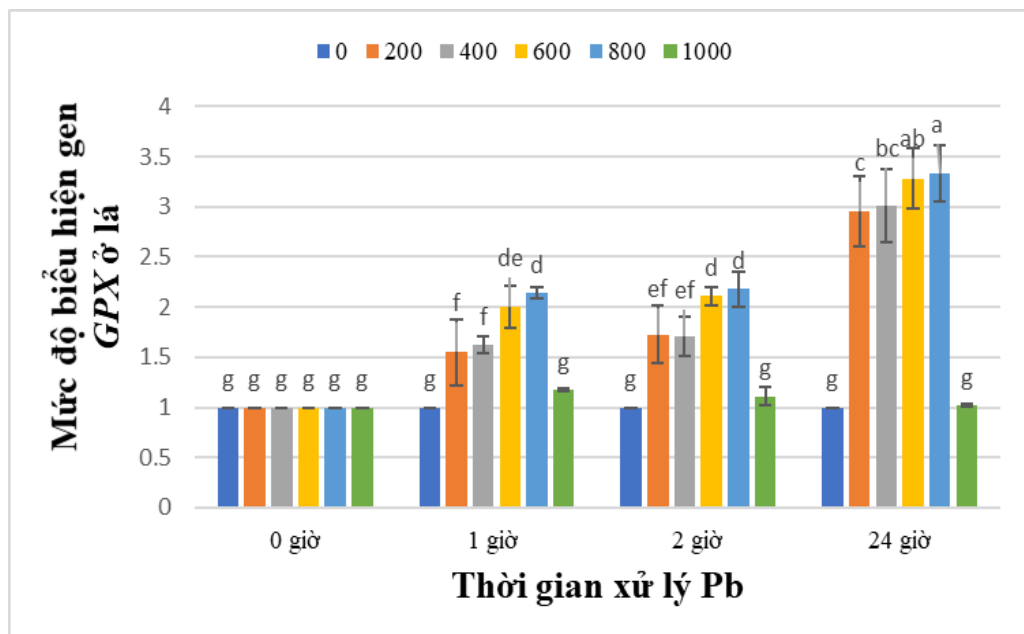
thân và lá ở các nồng độ 200, 400, 600, 800 và 1000 ppm đều tăng cao hơn so với đối chứng. Giống như gen *GST* và *Cyt-Cu/Zn SOD*, sự tác động của Pb cũng đã làm tăng biểu hiện gen *GPX* ở cây Phát tài. Kết quả đề tài tương tự với kết quả của Lou (2017) khi cho rằng sự tác động của Pb làm tăng biểu hiện gen *GPX* trên *Festuca arundinacea* (Lou và ctv, 2017). Tương tự, sự tác động của Pb làm tăng biểu hiện của 6 gen *GPX* trên nhiều bộ phận của cây dưa hấu *Citrullus lanatus* (Zhou và ctv, 2018). Ngoài ra, sự biểu hiện của một số gen *GPX* đã được xác định tăng dưới các áp lực của môi trường khác nhau như nhiễm bệnh, nồng độ muối cao và độc tính Al (Ozyigit và ctv, 2016). Một số loài thực vật cũng đã được chứng minh là có phản ứng lại với stress môi trường bằng cách tăng sự biểu hiện của gen *GPX* như *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* L., điều này có thể bảo vệ tế bào khỏi tác hại của quá trình oxy hóa (Zhou và ctv, 2018).



Hình 3.56. Mức độ biểu hiện của gen *GPX* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.57. Mức độ biểu hiện của gen GPX theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.58. Mức độ biểu hiện của gen GPX theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá cây Phát tài (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Sự tác động của nồng độ Pb khác nhau sẽ làm cho tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* cũng khác nhau. Tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* tăng dần khi nồng độ Pb tăng dần từ 200 đến 600 ppm. Nhưng khi tăng nồng độ Pb từ 600 đến 1000 ppm thì tỷ lệ biểu hiện gen giảm dần. Kết quả này chỉ xảy ra ở bộ phận dưới đất là rễ. Với bộ phận trên mặt đất là thân và lá thì khác, tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* vẫn tăng ở nồng độ Pb xử lý 800 ppm và chỉ giảm khi tăng nồng độ lên 1000 ppm. Như vậy có thể thấy, tỷ lệ biểu hiện gen ở rễ cao nhất ở nồng độ xử lý 600 ppm, ở thân và lá là 800 ppm. Sự tăng biểu hiện gen *GPX* trong rễ cây Phất tài khi nồng độ chì xử lý tăng đến 600 ppm cho thấy rằng nó đã góp phần bảo vệ chống lại tác hại của quá trình oxy hóa gây ra bởi sự tác động của Pb, giúp cây có thể hấp thụ một lượng lớn Pb vào trong cây mà không ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây. Ở thân và lá, có thể do hàm lượng chì thấp hơn trong rễ nên đã kích thích sự biểu hiện gen đáp ứng đến nồng độ chì 800 ppm hoặc do *GPX* còn có thể có vai trò phòng thủ bằng cách phát ra tín hiệu H_2O_2 trong tế bào thực vật để tế bào kịp thời ứng phó (Singh và ctv, 2019). Với kết quả của đề tài, có thể thấy, nồng độ chì quá cao (trên 800 ppm) làm tăng nồng độ ROS, làm ức chế hoạt động của gen *GPX* và làm gen im lặng. Đây có thể là kết quả ảnh hưởng của độc tố chì dẫn đến phá hủy DNA, gây độc gen. Shahid và ctv (2011) cũng đã cho biết, ở nồng độ cao, chì ảnh hưởng rất đáng kể đến hoạt động gen, làm nhiễm sắc thể bị phân cắt thành nhiều đoạn và hình thành vi nhân.

Yếu tố thời gian cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* (bảng 3.8). Khi thay đổi thời gian ở 3 giá trị là 1 giờ, 2 giờ và 24 giờ, tỷ lệ biểu hiện gen ở các bộ phận của cây cũng khác nhau. Ở rễ, tỷ lệ biểu hiện gen ở các nồng độ 200, 400, 600 và 800 ppm tăng mạnh ở thời gian 1 giờ, dừng lại ở 2 giờ (tỷ lệ biểu hiện gen ở 1 giờ không khác biệt so với 2 giờ ở từng nồng độ Pb) và giảm ở 24 giờ. Ở thân, tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* có xu hướng tăng dần khi tăng dần thời gian xử lý, tuy nhiên từ thời gian 2 giờ đến 24 giờ, tỷ lệ biểu hiện gen ở thân có xu hướng tăng chậm lại. Ở lá, tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* tăng nhẹ đến 2 giờ xử lý và tăng mạnh ở 24 giờ xử lý. Riêng với nồng độ Pb 1000 ppm, ở rễ và thân, tỷ lệ

biểu hiện gen *GPX* giảm dần theo thời gian xử lý và có xu hướng ngừng biểu hiện ở 24 giờ và ở lá, tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* thay đổi không rõ rệt và không khác biệt so với đối chứng ($p < 0,05$).

Bảng 3.8. Sự thay đổi biểu hiện gen *GPX* theo thời gian của các mẫu ở các nồng độ Pb

Bộ phận	200 ppm			400 ppm			600 ppm			800 ppm			1000 ppm		
	1	2	24	1	2	24	1	2	24	1	2	24	1	2	24
Rễ	↑	→	↓	↑	→	↓	↑	→	↓	↑	→	↓	↑	↓	↓
Thân	↑	↑	↑	↑	↑	→	↑	↑	→	↑	↑	↑	↑	↓	→
Lá	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→	↑	→	→	→

Trong cùng một nồng độ và bộ phận, mũi tên thể hiện sự thay đổi mức độ biểu hiện gen tại thời điểm sau so với thời điểm trước liền kề. “↑, ↓, →”: Tăng, giảm, không đổi; “1, 2, 24”: 1 giờ, 2 giờ và 24 giờ.

Kết quả tương tự cũng đã được báo cáo trên nhiều điều kiện nhiễm độc khác nhau. Khi khảo sát sự tác động của các yếu tố phi sinh học đến sự biểu hiện của các gen *GPX* ở *Arabidopsis thaliana*, Miguel và cộng sự đã cho biết, đối với tác động của mặn, các gen *AtGPX1*, *AtGPX2*, *AtGPX4* và *AtGPX5* tăng biểu hiện trong vòng 3 giờ xử lý và dần ổn định ở thời gian tiếp theo, gen *AtGPX6* có xu hướng tăng trong suốt thời gian xử lý và tăng gấp 5 lần sau 12 giờ tiếp xúc. Đối với tác động của lạnh (4°C), mức độ biểu hiện gen *AtGPX6* tăng lên gần 4,5 lần sau 3 giờ xử lý. Phản ứng rất nhanh với độc tố Fe ở thời gian 3 giờ đầu xử lý cũng xảy ra với các gen *AtGPX2*, *AtGPX5* và *AtGPX6*, trong khi mức biểu hiện của *AtGPX1* và *AtGPX3* thấp hơn (Miguel và ctv, 2003). Theo những kết quả này có thể thấy, sự có mặt của các gen *GPX* ở thực vật *Arabidopsis thaliana* làm cho nó chống chịu được với nhiều yếu tố bất lợi mà không phụ thuộc vào thời gian gen biểu hiện. Như vậy, sự có mặt của gen *GPX* và sự đáp ứng với tác động

của Pb thông qua biểu hiện gen có thể là yếu tố làm cho cây Phát tài chống chịu Pb.

Mức độ biểu hiện gen *GPX* ở các bộ phận của cây Phát tài tương tự như gen *Cyt-Cu/Zn SOD*, được xếp theo thứ tự rễ > thân > lá (hình 3.56; 3.57 và 3.58). Biểu hiện gen *GPX* cao ở rễ phù hợp với giả thuyết cho rằng, gen *GPX* mã hóa enzyme glutathione peroxidase (*GPX*) liên quan đến việc loại bỏ H_2O_2 dư thừa hình thành do quá trình khử $O_2^{\cdot -}$ của *SOD* (Singh và ctv, 2010).

Thảo luận:

Việc gây độc của Pb làm tăng sự hình thành nhiều gốc oxy hóa tự do $^1O_2$, H_2O_2 , $O^{\cdot -}_2$ và $OH^{\cdot}$ (ROS) dẫn đến stress oxy hóa (Malecka và ctv, 2009). Nồng độ Pb 200 ppm có thể làm tăng hàm lượng H_2O_2 lên 95% (Hasanuzzaman và ctv, 2020). Khi ROS được sinh ra nhiều trong tế bào, chúng làm tổn hại nghiêm trọng đến các thành phần tế bào như diệp lục tố, axit nucleic, protein và lipid dẫn đến gây rối loạn chức năng trao đổi chất và gây chết tế bào (Raja và ctv, 2017). Thực vật đối phó chủ yếu với stress oxy hóa thông qua cơ chế phòng thủ nội sinh gồm các enzym chống oxy hóa khác nhau như superoxide dismutase (*SOD*); glutathione peroxidase (*GPX*); glutathione S-transferase (*GST*);....(Kaur và ctv, 2019). Khi hàm lượng ROS tăng cao, hoạt động của các enzym chống oxy hóa này tăng lên để hạn chế thiệt hại do ROS gây ra. Điều này có liên quan đến tăng biểu hiện của các gen chống oxy hóa để đáp ứng với tác động của Pb (Sharma và Dubey, 2005).

Ở cây Phát tài, sự biểu hiện của 3 gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* đã tăng lên sau khi xử lý với Pb ở các nồng độ 200, 400, 600, và 800 ppm. Điều này có thể có liên quan trong việc đáp ứng với Pb. Sự hoạt hóa, biểu hiện tăng cường của các gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* ở các bộ phận của cây đã giúp cho cây có khả năng thích ứng và chống chịu được trong điều kiện nhiễm độc Pb < 1000 ppm. Trong khi nhiều thực vật đã bị ảnh hưởng nghiêm trọng khi tiếp xúc với nồng độ Pb 200 - 800 ppm (*Medicago sativa*, *Acalypha indica*, *Brassica nupus* và *Sesbania grandiflora*) (Kumar và ctv,

2018), cây Phất tài vẫn có khả năng chống chịu Pb > 80% và sự sinh trưởng gần như bình thường ở khoảng nồng độ này. Chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và khô, hàm lượng diệp lục tố và hàm lượng nước bị ảnh hưởng không đáng kể khi cây Phất tài tiếp xúc với 200 - 800 ppm Pb. Như vậy, sự hiện diện của Pb ở nồng độ thấp (< 1000 ppm) có thể đã kích hoạt sự biểu hiện của 3 gen quan trọng *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* liên quan đến cơ chế bảo vệ thực vật. Pb đã kích thích sự phiên mã của các gen chống oxy hoá trên cây Phất tài, điều này có thể đồng nghĩa với sự tăng tổng hợp các enzyme tương ứng để tham gia vào quá trình chống oxy hoá giúp cây chống chịu và thích nghi với điều kiện nhiễm độc Pb trong tế bào. Sự biểu hiện mạnh ở các gen *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* đã được chứng minh có vai trò bảo vệ ở một số loài thực vật như *Lepidium sativum*, *Raphanus sativus* chống lại stress oxy hóa do Pb gây ra (Ai TN. và ctv, 2018).

Ngược lại, nồng độ Pb = 1000 ppm làm giảm biểu hiện gen *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* ở cây Phất tài. Mức độ biểu hiện gen thấp có thể đã làm cho khả năng chống chịu Pb của cây Phất tài cũng thấp. Biểu hiện nhiễm độc Pb đối với cây bắt đầu xuất hiện ở nồng độ Pb 1000 ppm và càng rõ rệt khi nồng độ Pb càng tăng. Sự tác động quá mức của ROS do Pb gây ra có thể làm thay đổi các base dẫn đến phá hủy sợi đôi DNA. Sự gây hại DNA có thể làm ức chế sự biểu hiện gen dẫn đến ức chế quá trình sao mã và vì vậy ức chế quá trình sinh tổng hợp protein làm giảm sinh trưởng của cây (Kumar và ctv, 2018). Tác động gây độc gen của Pb ở nồng độ cao cũng đã được báo cáo trên nhiều thực vật như *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum* và *T. triangulare* (Hasanuzzaman và ctv, 2020).

Xu hướng biểu hiện của các gen chống oxy hóa có thể có liên quan đến thứ tự hàm lượng Pb tích lũy trong cây Phất tài. Gen *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* biểu hiện nhiều nhất ở rễ, kế đến thân và thấp nhất ở lá. Điều này cho biết, gen *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* bị kích thích mạnh ở bộ phận tích lũy nhiều Pb (rễ). Ngược lại gen *GST* không phụ thuộc vào bộ phận có hàm lượng Pb tích lũy mà phụ thuộc vào nơi có sự vận chuyển Pb, biểu hiện mạnh hơn ở thân và lá. Sự biểu

hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD*, *GPX* và *GST* khác nhau ở bộ phận cây có thể có liên quan đến vai trò của chúng. Trong các bộ phận không có lục lạp của cây, đặc biệt là ở rễ, ty thể là nguồn sản xuất ROS chính, nơi tạo ra $O_2^{\bullet-}$, sau đó gen *SOD* mã hóa enzyme superoxide dismutase (SOD) chuyển hóa gốc anion dioxide ($O_2^{\bullet-}$) thành H_2O_2 và O_2 (Singh và ctv, 2019). Gen *GPX* mã hóa enzyme Glutathione peroxidase là một trong những enzyme quan trọng loại bỏ H_2O_2 dư thừa trong quá trình trao đổi chất cũng như trong quá trình stress do môi trường, đặc biệt là lượng H_2O_2 hình thành do quá trình khử $O_2^{\bullet-}$ của *SOD* (Berwal và ctv, 2018). Gen *GST* mã hóa enzyme Glutathione S-transferase là enzyme nằm trong tế bào chất, có vai trò vận chuyển Pb vào không bào. Trong số các chất chống oxy hóa chính, GST có vai trò hỗ trợ GSH để giảm độc tính của Pb bằng cách liên hợp chúng và vận chuyển vào không bào (Navabpour và ctv, 2020).

Gen *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* biểu hiện mạnh ở thời gian rất sớm (1 giờ) ở bộ phận rễ cây, nhưng biểu hiện muộn hơn ở thân và lá (24 giờ). Ngược lại gen *GST* biểu hiện mạnh ở thời gian muộn hơn so với *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* ở cả 3 bộ phận rễ, thân và lá. Điều này có thể lý giải rằng: rễ là bộ phận tiếp nhận và hấp thụ Pb đầu tiên, cũng là bộ phận đầu tiên chịu tác động của stress do Pb. Tiếp xúc Pb làm tăng sản sinh H_2O_2 và $O^{\bullet-}_2$ đầu tiên trong rễ (Singh và ctv, 2019). Để chống lại tác động bất lợi của H_2O_2 và $O^{\bullet-}_2$ thì các enzyme *SOD*, *GPX* phải được tổng hợp, để làm được điều này đòi hỏi gen *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* phải được kích hoạt từ sớm. Không giống như hầu hết các KLN khác, Pb có hiện tượng hạn chế sự di chuyển (Dogan và ctv, 2018). Phần lớn Pb trong cây Phát tài tập trung ở rễ (97,5%) và chỉ một lượng nhỏ (2,5%) được chuyển đến các bộ phận trên mặt đất. Sự di chuyển của Pb có liên quan đến rất nhiều gen vận chuyển (Zhou và ctv, 2016). *GST* là một trong những gen có liên quan đến việc vận chuyển chì. Việc vận chuyển Pb thường xảy ra sau quá trình giải độc bằng các enzyme chống oxy hóa khác như *SOD* và *GPX*.

Hiện nay, Pb được coi là một trong những chất gây ô nhiễm phổ biến nhất trong môi trường. Hoạt động khai thác khoáng sản và quá trình chế biến đã tạo ra

một khối lượng lớn Pb trong môi trường đất và nước. Ở các vùng đất khai thác các quặng Pb, nồng độ Pb tích tụ trung bình dao động trong khoảng 385,8 ppm đến 3231 ppm. Nồng độ Pb trong đất ở khu vực mỏ pyrit ở Aznalcollar (Tây Ban Nha) dao động khoảng 4352 ppm đến 9635 ppm; Đất ở khu vực mỏ Pb và Zn ở Rubiais (Tây Ban Nha) có nồng độ Pb khoảng 46 – 6100 ppm (Martin và ctv, 2014). Nồng độ Pb trong nước thải ngành công nghiệp chế tạo pin dao động trong khoảng 2393 - 4600 ppm (Poonam và ctv, 2018). Pb là một trong những KLN ít di động nên nó có xu hướng tích tụ lâu dài trong đất, nước và ảnh hưởng cho sinh vật. Ngoài ra, các loại đất mỏ thường cho thấy có các điều kiện không thuận lợi cho sự phát triển của thực vật vì lượng dinh dưỡng rất thấp, hàm lượng chất hữu cơ hạn chế. Martin và ctv (2014) cho biết hơn 30% các loại đất mỏ có hàm lượng dinh dưỡng và chất hữu cơ rất thấp. Với hiện trạng này, cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) có thể được xem là một ứng viên tiềm năng sử dụng cho xử lý ô nhiễm Pb ở các vùng đất mỏ và nước thải ngành công nghiệp chế biến Pb nhằm khôi phục chất lượng và chức năng của đất và nước, tiến đến để phục hồi các chu trình sinh địa hóa quan trọng.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Từ những kết quả đạt được, đề tài có một số kết luận như sau:

- Đối với cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) được trồng trong dung dịch $Pb(NO_3)_2$ ở pH 4,5, nồng độ 1000 ppm Pb được xác định là ngưỡng gây độc. Sự tăng trưởng của cây Phát tài bị ảnh hưởng không đáng kể khi nồng độ Pb trong môi trường thấp hơn ngưỡng gây độc và ngược lại nó bị ảnh hưởng nghiêm trọng khi nồng độ Pb vượt ngưỡng.

- Cây Phát tài có khả năng hấp thụ và tích lũy trong cây một lượng Pb lên đến 39235 mg/kg TLK trong môi trường có nồng độ Pb = 800 ppm. 97,5% Pb hấp thụ được cây Phát tài tích lũy trong rễ và sự tích lũy Pb trong cây tập trung ở rễ, sau đó Pb được chuyển lên thân và lá. Cây Phát tài có khả năng tích lũy Pb ở mức độ cao hơn 1000 mg/kg sinh khối khô nên có thể được xem là cây siêu tích lũy Pb.

- Các phản ứng để đối phó với độc tính Pb của cây Phát tài là: Ở rễ cây, Pb được loại bỏ Pb ra khỏi tế bào chất bằng cách cô lập Pb trong gian bào; Liên kết Pb với các thành phần trên vách tế bào hoặc kết tủa trong gian bào; Ngăn chặn sự di chuyển Pb vào mô mạch của đai Caspary; Làm dày vách tế bào và trung trụ. Ở thân và lá, cây Phát tài đối với sự có mặt của Pb là tăng đường kính của ống mạch gỗ nhằm có thể vừa vận chuyển Pb và vừa vận chuyển dinh dưỡng và nước.

- Cây Phát tài có chứa 3 gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX*. Trình tự 3 đoạn gen chống oxy hóa *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) với kích thước tương ứng lần lượt là 362, 221 và 202 bp lần đầu tiên đã được xác định. Mức độ biểu hiện gen *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* ở cây Phát tài bị ức chế ở ngưỡng Pb gây độc. Sự tăng biểu hiện của 3 gen chống oxy hóa này ở các nồng độ 200, 400, 600 và 800 ppm giúp cây chống chịu >80% với các tác động bất lợi của Pb. Gen *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* biểu hiện sớm và mạnh ở bộ phận rễ nơi có hàm lượng Pb tích lũy cao nhất nhằm đáp ứng

kịp thời với độc tố Pb. Gen *GST* biểu hiện mạnh ở thân lá đáp ứng khi có sự vận chuyển Pb.

2. KIẾN NGHỊ

- Để đánh giá toàn diện hơn về khả năng chống chịu Pb của cây Phát tài, cần nghiên cứu thêm sự tác động của Pb trên các chỉ tiêu sinh lý của cây như cường độ quang hợp, khả năng hấp thụ dinh dưỡng, trao đổi chất,...

- Để có được kết luận đầy đủ hơn về sự tương quan giữa biểu hiện của các gen chống oxy hóa và chống chịu Pb của cây Phát tài, cần nghiên cứu thêm mức độ biểu hiện của một số gen chống oxy hóa khác trong đáp ứng với stress Pb và nghiên cứu thêm các gen liên quan cơ chế kiểm soát sự vận chuyển, tích tụ và chuyển hóa chì của cây Phát tài trong điều kiện nhiễm Pb.

- Để ứng dụng cây Phát tài trong việc xử lý ô nhiễm nhiều kim loại nặng khác nhau, cần nghiên cứu thêm khả năng hấp thụ và tích lũy các kim loại nặng khác của cây Phát tài.

- Ngoài ra, để ứng dụng cây Phát tài cho việc xử lý Pb trong thực tiễn, cần nghiên cứu thêm khả năng sinh trưởng, hấp thụ và tích lũy Pb của cây Phát tài trên môi trường đất mỏ hoặc nước thải công nghiệp chế biến Pb.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ai TN., Naing AH., Lim SH. and Kim CK., 2018. Overexpression of RsMYB1 enhances heavy metal stress tolerance in transgenic petunia by elevating the transcript levels of stress tolerant and antioxidant genes. *J. of Front. Plant Sci.*, Vol. 9: 1-15.
2. Alaraidh I.A., Alsahli A.A., Abdel E.S., 2018. Alteration of antioxidant gene expression in response to heavy metal stress in *Trigonella foenum-graecum*. *J. of Botany*, Vol. 115: 90-93.
3. Al-Saadi A.M., Al-Asaadi W.M., Al-Waheeb N.H., 2013. The effect of some heavy metals accumulation on physiological and anatomical characteristic of *Potamogeton* L. plant. *J. of Eco. and Env. Sciences*, Vol. 4(1): 100-108.
4. Arias J.A., Peralta-Videa J.R., Ellzey J.T., Ren M., Viveros M.N., Gardea-Torresdey J.L., 2010. Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. *J. of Environ Exp Bot.*, Vol. 68(2).
5. ATSDR, 2007. *Priority List of Hazardous Substances*. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. Pp. 11-34.
6. Azmat R., Haider S., and Askari S., 2006. Effect of Pb on germination, growth, morphology and histomorphology of *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. *Pakistan J. of Biological Sciences*, Vol.9 (5): 979-984.
7. Bai XY, Dong YJ, Wang QH, Xu LL, Kong J, Liu S. Effects of lead and nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element content of perennial ryegrass. *J. of Biol Plantarum*, Vol. 59(1): 163-170.
8. Berwal, M.K.; Ram, C., 2018. *Superoxide dismutase: A stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants*. De Oliveira, London, UK. pp. 87-99.
9. Bhatti S.S., Kumar V., Sambyal V., Singh J., Nagpal A.K., 2018. Comparative analysis of tissue compartmentalized heavy metal uptake by common forage crop: a field experiment. *J. of CATENA*, Vol. 160: 185–193.

10. Bian S.M. and Jiang Y.W, 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *J. of Sci. Hort.*, Vol 120: 264-270.
11. Brunet J., Repellin A., Varrault G., Terryn N., Zuily-Fodil Y., 2008. Lead accumulation in the roots of grass pea *Lathyrus sativus* L. *Comptes Rendus. J. of Biologies*, Vol. 331: 859-864.
12. Buscaroli A., 2017. An overview of indexes to evaluate terrestrial plants for phytoremediation purposes (Review). *J. of Ecol. Indic.*, Vol. 82: 367-380.
13. Chen Q., Zhang X., Liu Y., Shen W., Shen Z., Cui J., 2016. Hemin-mediated alleviation of zinc, lead and chromium toxicity is associated with elevated photosynthesis, antioxidative capacity; suppressed metal uptake and oxidative stress in rice seedlings. *J. of Plant Growth Regul.*, Vol. 81: 253-264.
14. Cheraghi M., Lorestani B., Yousefi N., 2011. Introduction of Hyperaccumulator Plants with Phytoremediation Potential of a Lead- Zinc Mine in Iran. *International J. of Geological and Envi. Engi.*, Vol.5: 289-294.
15. Clemens S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *J. of Biochimie*, Vol. 88: 1707-1719.
16. Dahmani M., Oort F., Gelie B., Balabane M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *J. of Environ. Poll.*, Vol. 109 (2): 231-238.
17. Das S., Sen M., Saha C., Chakraborty D., Das A., Banerjee M., Seal A., 2012. Isolation and expression analysis of partial sequences of heavy metal transporters from *Brassica juncea* by coupling high throughput cloning with a molecular fingerprinting technique. *J. of Planta*, Vol. 234: 139-156.
18. Damen J., 2018. Taxonomic novelties in African Dracaena. *Blumea J. of plant taxonomy and plant geography*, Vol. 63: 31-53.
19. Diệp Thị Mỹ Hạnh và E. Garnier Zarli, 2007. *Lantana Camara* l., thực vật có khả năng hấp thụ Pb trong đất để giải ô nhiễm. *Tạp chí phát triển KH&CN*, tập 10.

20. Dogan M., Karatas M., Aasim M., 2018. Cadmium and lead bioaccumulation potentials of an aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L.. *J. of Ecotoxicol. Environ. Saf.* Vol. 148: 431-440.
21. Đàm Xuân Vận, 2013. Nghiên cứu sự phân bố, khả năng sinh trưởng và phát triển của cây sậy (*Phragmites australis*) trên đất sau khai thác quặng tại tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, tập 107(07): 91-96.
22. Đặng Thị An, 2008. Báo cáo kết quả đề tài “Tìm hiểu khả năng phát triển một số loài cây hoa, cây cảnh trên các đất ô nhiễm Chì (Pb)”, Đề tài cấp Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, 2007-2008.
23. Đỗ Thị Thanh Tâm, 2011. Nghiên cứu xác định một số kim loại trong nước sinh hoạt ở Khu vực xã Thạch Sơn, Lâm Thao, Phú Thọ. Luận văn thạc sĩ, Trường ĐH Khoa học tự nhiên, Hà Nội.
24. Environmental Protection Agency, 2000. *Introduction to phytoremediation*. National risk management research laboratory office of research and development U.S. environmental protection agency cincinnati, Ohio. pp. 123-157.
25. Ezaki, Suzuki, Motoda Kawamura, Nakashima, 2004. Mechanism of gene expression of Arabidopsis *AtGST1* and *AtGST11* in response to Aluminum stress. *J. of Plant physiology*, Vol. 134 (4).
26. Feng X., Lai Z., Lin Y., Lai G., Lian C., 2015. Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata*. *J. of BMC Genomics*, Vol. 16: 823.
27. Florence A., Mouna F., Patricia M., Patrick D., and Abdelaziz S., 2013. *Lead Tolerance and Accumulation in Hirschfeldia incana, a Mediterranean Brassicaceae from Metalliferous Mine Spoils*. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Plos One 8(5).
28. Gupta D., Huang H., Yang X., Inouhe M., 2009. The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatins but the glutathione. *J. of Hazard Mater*, Vol. 177(1-3): 437-444.

29. Halliwell B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *J. of Plant Physiol.*, Vol. 141: 312-322.
30. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M., Faisal Z., Ali R., Mohammad và Fotopoulos V., 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress. *J. of Antioxidants*, Vol. 9: 681.
31. He Z., Shen J., Ni Z., Tang J., Song S., Chen J., Zhao L., 2015. Electrochemically created roughened lead plate for electrochemical reduction of aqueous CO₂. *J. of Catal. Commun.*, Vol.72: 38-42.
32. Henry J. R., 2000. *In An Overview of Phytoremediation of Lead and Mercury*. NNEMS Report. Washington C. pp. 3-9.
33. Hoàng Thị Sản và Nguyễn Phương Nga, 2004. *Hình thái – Giải phẫu học thực vật*. NXB Đại học Sư phạm, Hà Nội.
34. Hoshikawa K., Endo S., Mizuniwa S., Makabe S., Takahashi H. và Nakamura I., 2012. Transgenic tobacco plants expressing endo- β -mannanase gene from deep-sea *Bacillus* sp. JAMB-602 strain confer enhanced resistance against fungal pathogen (*Fusarium oxysporum*). *J. of Plant Biotechnol*, Vol 6: 243-250.
35. Huynh V.B., Repellin A., Fodil Y. and A.T. Pham-Thi, 2012. Aluminum stress response in rice: effects on membrane lipid composition and expression of lipid biosynthesis genes. *J. of Physiological Plantarum*. Vol. 146, p. 272-284.
36. Jalmi K., Bhagat K., Singh K., Sharma D., Sinha K., 2018. Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *J. of Plant Sci.*, Vol. 9: 12.
37. Jiang L., Wang W., Chen Z., Gao Q., Xu Q., Cao H., 2017. A role for *APX1* gene in lead tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. of Plant Sci.*, Vol. 256: 94-102.
38. Jiang W., Liu D., 2010. Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *J. of BMC Plant Biol.*, Vol. 10: 40.

39. Jiang W., Huaigu C., Dong M., Junliang Y., 2019. Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of superoxide dismutase (SOD) family in wheat (*Triticum aestivum*). *J. of PeerJ*, pp. 26.
40. Kabata-Pendias A., Pendias H., 2001. *Trace elements in soils and plants*. CRC Press, London. pp. 37-92.
41. Karunananda and Abeysinghe, 2019. Suitability of foliage plants for indoor decoration based on CO₂ emission and absorption rate and stomata density. *J. of Food and Agriculture*, Vol. 5(1): 49-55.
42. Kaur G., Singh H., Batish D., Kohli R., 2012. A time course assessment of changes in reactive oxygen species generation and antioxidant defense in hydroponically grown wheat in response to lead ions (Pb²⁺). *J. of Protoplasma*, Vol. 249: 1091-1100.
43. Kaur, N.; Kaur, J.; Grewal, S.K.; Singh, I., 2019. Effect of Heat Stress on Antioxidative defense system and its amelioration by heat acclimation and salicylic acid pre-treatments in three pigeonpea genotypes. *Indian J. Agric. Biochem.*, Vol 32: 106-110.
44. Khan M.M., Islam E., Irem S., Iqbal J., Liu D., 2018. Pb induced phytotoxicity in para grass (*Brachiaria mutica*) and castor bean (*Ricinus communis* L.): antioxidant and ultrastructural studies. *J. of Chemosphere*, Vol. 200: 257-265.
45. Kisa, 2017. Expressions of glutathione related genes and activities of their corresponding enzyme in leaves of tomato exposed to heavy metal. *Russian J. of Plant Physiology*, Vol. 64: 876-882.
46. Kramer U., 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *J. of Plant Biol.*, Vol. 61: 517-534.
47. Krzeslowska M., 2011. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *J. of Acta Physiol Plant* Vol. 33: 35-51.

48. Kumar A., Majeti P., 2014. Proteomic responses to lead-induced oxidative stress in *Talinum triangulare* roots: identification of key biomarkers related to glutathione metabolisms. *J. of Environ. Sci. Pollut. Res.*, Vol. 21: 8750-8764.
49. Kumar A., Prasad V., 2018. Plant-lead interactions: Transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *J. of Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 166: 401-418.
50. Lê Văn Khoa, Trần Thiện Cường, Võ Văn Minh, Lê Thị Thùy Linh, Nguyễn Quốc Việt, 2003. Những vấn đề bức xúc về môi trường vùng nông thôn đồng bằng sông Hồng. *Tạp chí Khoa học đất*, số 18.
51. Li H., Luo Hongji , Hu Tao , Fu Jinmin, 2012. Antioxidant Enzyme Activity and Gene Expression in Response to Lead Stress in Perennial Ryegrass. *J. of the Amer. Soci. for Horticul. Sci.*, Vol. 137 (2): 80-85.
52. Li H., Hu T., Fu J., 2017. Transcriptome profiling of two tall fescue (*Festuca arundinacea*) cultivars in response to Pb stress. *J. of BMC Genom.*, Vol. 18: 145.
53. Liu T., Liu S., Guan H., Ma L., Chen Z., Gu H., Qu L.J., 2016. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *J. of Environ Exp Bot.*, Vol. 67: 377-386.
54. Lopez-Orenes A., Dias M.C., Moutinho-Pereira J., Correia C., Santos C., 2018. Different mechanisms of the metalliferous *Zygophyllum fabago* shoots and roots to cope with Pb toxicity. *J. of Environ. Sci. Pollut.*, Vol. 25: 1319-1330.
55. Low K.S., Lee C.K., Liew S.C. 2000. Sorption of cadmium and lead from aqueous solutions by spent grain. *J. of Process Biochemistry*, Vol. 36: 59-64.
56. Hasanuzzama M., Hakeem K., Nahar K., Alharby H., 2019. Reactive oxygen species metabolism and antioxidant defense in plants under metal/metalloid stress. Springer: Cham, Switzerland, 2019, pp. 221-257.
57. Malecka A., Piechalak A., Tomaszewska B., 2009. Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: the whole roots level. *J. of Acta. Physiol. Planta.*, Vol. 31: 1053-1063.

58. Marchiol L., Sacco P., Assolari S., Zerbi G., 2004. Reclamation of polluted soil: phytoremediation potential of crop-related *Brassica* species. *J. of Water Air Soil Pollut.*, Vol. 158: 345-356.
59. Meers E., Slycken S., Du Laing G., Tack G., 2010. The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for 'phytoattenuation' of heavy metals on moderately contaminated soils. *J. of Chemosphere*, Vol 78 (1): 35-41.
60. Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *J. of Plant Cell Environ.*, Vol. 33: 453-467.
61. Mittler R. 2002. Oxidation stress, antioxidation and stress tolerance. *J. of plant Science*, Vol. 7: 405-410.
62. Mohammad A. H., Pukclai P., Jaime A. Teixeira da Silva, Masayuki Fujita¹, 2012. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J. of Botany*, Vol 2012: 37.
63. Nadia Ait Hamadouche, Houria Aoumeur, Souad Djediai, Miloud Slimani, Abdelkader Aoues, 2012. Phytoremediation potential of *Raphanus sativus* L. for lead contaminated soil. *J. of Acta Biologica Szegediensis*, Vol. 56(1): 43-49.
64. Navabpour Saeid, Ahad Yamchi, Saeed Bagherikia, Haniyeh Kafi¹, 2020. Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. of Physiol Mol Biol Plants*, Vol. 26(4):793-802.
65. Nguyễn Duy Duy. 2011. Nghiên cứu khả năng xử lý một số kim loại nặng bằng cây Phát lộc (*D. sanderiana*) trong bùn thải từ các gara xe tại thành phố Đà Nẵng. Trường Đại học Đà Nẵng.
66. Nguyễn Khánh Tân, 2016. *Đánh giá hàm lượng kim loại nặng trong đất nông nghiệp tại phường Châu Khê, Thị xã Từ Sơn, Tỉnh Bắc Ninh*. Nhà xuất bản đại học nông nghiệp. pp. 81.
67. Nguyễn Ngọc Kiểng, 2007. Phương pháp thống kê đa biến-Lý thuyết và thực hành trên phần mềm Statgraphics. Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. pp. 210.

68. Nguyễn Thị Hà, 2010. *Nghiên cứu khả năng xử lý một số kim loại nặng bằng cây thần tài trong nước rỉ rác bãi rác Khánh Sơn-Đà Nẵng*. Trường Đại học Sư Phạm Đà Nẵng.
69. Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Bùi Thị Thu, 2017. Đánh giá khả năng xử lý chì trong đất của cây cỏ voi (*Pennisetum purpureum*). *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*. Số 18: 76-81.
70. Nguyễn Thị Lan Hương, 2014. Nghiên cứu hàm lượng Cu, Pb, Zn trong đất nông nghiệp do ảnh hưởng của nước tưới sông Nhuệ. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thủy lợi và môi trường*, số 45.
71. Ozyigit I., Filiz E., Vatansever R., Kurtoglu Y., Koc I., Ozturk X., Anjum A., 2016. Identification and Comparative Analysis of H₂O₂-Scavenging Enzymes (Ascorbate Peroxidase and Glutathione Peroxidase in Selected Plants Employing Bioinformatics Approaches. *J. of Front Plant Sci.*, Vol. 7: 301.
72. Patel J., 2018. Removal of Lead from Water by Hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Int. J. of Agriculture Sciences*, Vol. 10 (7): 5705-5709.
73. Peng W., Li X., Xiao S., Fan W., 2018. Review of remediation technologies for sediments contaminated by heavy metals. *J. of Soils Sed.* Vol. 18: 1701-1719.
74. Perkin-Elmer, 1996. *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy*. United States of America. pp. 67-92.
75. Phạm Hoàng Hộ, 2003. *Cây cỏ Việt Nam*. Nhà Xuất Bản trẻ. pp. 737-738.
76. Piwowarczyk B., Tokarz K., Makowski W., Jędrzejczyk R., Gajewski Z., Hanus-Fajerska E., 2018. The acclimatization strategies of kidney vetch (*Anthyllis vulneraria* L.) to Pb toxicity. *J. of Environ. Sci. Pollut.*, Vol. 25: 19739-19752.
77. Poonam, Sushil Kumar Bharti and Narendra Kumar, 2018. Kinetic study of lead (Pb²⁺) removal from battery manufacturing wastewater using bagasse biochar as biosorbent. *J. of Applied Water Science*, Vol. 8: 119.
78. Potters G., Horemans N., Jansen K., 2010. The cellular redox state in plant stress biology charging concept. *J. of Plant Physiol. Biochem.*, Vol. 48: 292-300.

79. Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P., Pinell E., 2011. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *J. of Envir.*, Vol. 213.
80. Pourrut B., Shahid M., Douay F., Dumat C., Pinelli E., 2014. Molecular Mechanisms Involved in Lead Uptake, Toxicity and Detoxification in Higher Plants. DOI: 10.1007/978-3-642-38469-1_7, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
81. Prasad V., Freitas D., 2003. Metal hyperaccumulation in plants biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *J. of Biotechnol*, Vol. 93: 285-321.
82. Raja, V.; Majeed, U.; Andrabi, K.I.; John, R., 2017. Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *J. of Environ. Exp. Bot.*, Vol. 137: 142-157.
83. Rao K. P., Vani G., Misra M., Gupta M., 2011. Arsenic stress activates MAP kinase in rice roots and leaves. *J. of Biochem. Biophys.*, Vol. 506: 73-82.
84. Raskin I., Ensley B. D., 2000. *Recent developments for in situ treatment of metal contaminated soils. In: Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment.* John Wiley and Sons Inc., New York. pp. 53-70.
85. Romanowska E, Igamberdiev AU, Parys E, Gardeström P, 2006. Stimulation of respiration by Pb²⁺ in detached leaves and mitochondria of C3 and C4 plants. *J. of Physiol Plant*, Vol. 116(2): 148-154.
86. Rossato L.V., Nicoloso F.T., Farias J.G., Cargnelluti D., Tabaldi L.A., Antes F.G., 2012. Effects of lead on the growth, lead accumulation and physiological responses of *Pluchea sagittalis*. *J. of Ecotoxicology*, Vol. 21: 111-123.
87. Rossatto T., Amaral M. N., Benitez L. C., Vighi I. L., Braga E. J. B., De Magalhaes J. A. M., Da S. P. L., 2017. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants under saline stress. *J. of Physiology and Molecular Biology of Plants*, Vol. 23(4): 865-875.
88. Rotkittikhun P., Pokethitiyook P., Paijitprapaporn A., Baker A.J.M., 2006. Uptake and accumulation of lead by plants from the Bo Ngam lead mine area in Thailand. *J. of Environmental Pollution*, Vol. 144 (2): 681-688.
89. Sereshi H., Eskandarpour N., Samadi S. and G. Aliakbarzadeh. 2014. Investigation on *Dracaena Sanderiana* Phytoremediation ability for Hg and Cd

using Multivariate Task specific ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. *J. of Int J Environ.*, Vol. 8(4): 1075-1084.

90. Shahid M., Pinelli E., Pourrut B., Silvestre J., Dumat C., 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *J. of Ecotoxicol Environ. Saf.*, Vol. 74(1): 78-84.

91. Shahrtash M., 2013. Plant glutathione S-transferases function during environmental stresses. *J. of Biology - Plant Biology*, Vol. 58: 19-25.

92. Sharma P., Dubey R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Barz.J. of Plant Physiol.*, Vol. 17: 35-52.

93. Sharma H., 2016. Phytoremediation of Lead Using *Brassica Juncea* and *V. Zizanioides*. *Inter. J. of Life Sci. Research*, Vol. 4 (1): 91-96.

94. Shekhawa G.S., Verma K., Jana S., Singh K., Teoti P., Prasad A., 2010. In vitro biochemical evaluation of cadmium tolerance mechanism in callus and seedlings of *Brassica juncea*. *J. of Protoplasma*, Vol. 239: 3138.

95. Sidhu G.P.S., Singh H.P., Batish D.R., Kohli R.K., 2016. Effect of lead on oxidative status, antioxidative response and metal accumulation in *Coronopus didymus*. *J. of Plant Physiol. Biochem.*, Vol. 105: 290-296.

96. Silva S., Pint G., Santos C., 2016. Low doses of Pb affected *Lactuca sativa* photosynthetic performance. *J. of Photosynthetica*, Vol. 55: 50-57.

97. Singh Divya, Tiwari Archana, Gupta Richa, 2012. Phytoremediation of lead from wastewater using aquatic plants. *J. of Agri. Technology*, Vol. 8(1): 1-11.

98. Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M., 2016. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *J. of Front. Plant Sci.*, Vol. 6: 1143-1179.

99. Ten Yi Hao, 2011. *Removal of Heavy metals copper and chromium (VI) using hydroponically cultivated plants Dracaena surculosa and Dracaena Sanderiana*. Faculty of civil engineering, Universiti Teknologi Malaysia.

100. Bộ tài nguyên môi trường, 2011. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 6663-1:2011.

101. Bộ tài nguyên môi trường, 2010. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8551:2010.

102. Trần Văn Tựa, Nguyễn Trung Kiên, Đỗ Tuấn Anh, Đặng Đình Kim, 2011. Nghiên cứu khả năng chống chịu và hấp thụ chì Pb, Zn của dương xỉ *Pteris vittata* L., *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, tập 49 (4): 101-109.
103. Traunfeld J. H., Clement D. L., 2001. *Lead in Garden Soils*. University of Maryland.
104. Treesubuntorn C., Thiravetyan P., 2012. Removal of benzene from indoor air by *Dracaena sanderiana*: Effect of wax and stomata. *J. of Atm. Env.*, Vol. 57: 317-321.
105. Trịnh Thị Thanh, 2007. *Độc học môi trường và sức khỏe con người*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Hà Nội. 161 trang.
106. Tupan Charloth I., Azrianingsih Rodiyata, 2016. Accumulation and deposition of lead heavy metal in the tissues of roots, rhizomes and leaves of seagrass *Thalassia hemprichii*. *J. of AACL Bioflux.*, Vol. 9(3): 580-589.
107. Usha R., Jhansi Rani S., Supraja P., 2011. Phytoextraction of lead from industrial effluent by sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. of Chemica*, Vol. 4 (1): 8-12.
108. Vanek A., Boruvka L., Drabek O., Mihaljevic M., and Komarek M. 2005. Mobility of lead, zinc and cadmium in alluvial soils heavily polluted by smelting industry. *J. of Plant Soil Environ.*, Vol. 51: 316-321.
109. Vega F., Andrade M., Covelo E., 2010. Influence of soil properties on the sorption and retention of cadmium, copper and lead, separately and together, by 20 soil horizons. *J. of Hazard Mater*, Vol. 174(1-3): 522-533.
110. Venkatachalam P., Jayalakshmi N., Geetha N., Sahi S.V., Sharma N.C., Rene E.R., 2017. Accumulation efficiency, genotoxicity and antioxidant defense mechanisms in medicinal plant *Acalypha indica* L. under lead stress. *J. of Chemosphere*, Vol. 171: 544-553.
111. Vũ Văn Vụ và ctv, 2004. *Thực hành sinh lý thực vật*. NXB Đại học Quốc Gia Hà Nội. pp. 56-78.

112. Yan Z.Z., Ke L., Tam N.F.Y., 2010. Lead stress in seedlings of *Avicennia marina*, a common mangrove species in South China, with and without cotyledons. *J. of Aquat Bot*, Vol. 92(2): 112-118.
113. Wang Shufeng, Xiang Shi, Haijing Sun, Yitai Chen, Hongwei Pan, Xiaoe Yang, Tariq Rafiq, 2014. Variations in metal tolerance and accumulation in three hydroponically cultivated varieties of *salix integra* treated with lead. Article in PLoS ONE. DOI: 10.1371/journal.pone.0108568
114. Wang Ruibin, Jingfei Ma, Hongyan Zhao, Yanan Wu, Guangxiao Yang, Guangyuan He, 2019. Genome-wide identification and expression profiling of glutathione transferase gene family under multiple stresses and hormone treatments in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. of BMC Genomics*, Vol. 20: 986.
115. Wilce M.C.J., Parker M.W., 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *J. of Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1205: 1-18.
116. Whelan A., Russell B., Whelan A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using Real-time PCR. *J. of Immu. Methods*, Vol. 278: 261-269.
117. Zhou C., Huang M., Cai L., 2016. Changes in subcellular distribution and antioxidant compounds involved in Pb accumulation and detoxification in *Neyraudia reynaudiana*. *J. of Environ. Sci. Pollut. Res.*, Vol. 23: 21794-21804.
118. Zhou Yong , Lifang Hu, Shuifeng Ye, Lunwei Jiang, Shiqiang Liu, 2018. Genome-wide identification of glutathione peroxidase (GPX) gene family and their response to abiotic stress in cucumber. *J. of Biotech.*, Vol. 8(3): 159.
119. Zientara K., Wawrzynska A., Lopez-Moya J.R., Liszewska F., 2009. Activity of the AtMRP3 promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* plants is increased by Cd, Ni, As, Co and Pb but not by Zn and Fe. *J. of Biotechnology*, Vol. 139: 258-263.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ

1. Liên B. Ho, Biet V. Huynh, Tuyen C. Bui, 2021. Accumulation and distribution of lead (Pb) in different tissues of Lucky bamboo plants (*Dracaena sanderiana*). The Journal of Agriculture and Development 20(3).

2. Hồ Bích Liên, Đường Huỳnh Thu Thương, Huỳnh Văn Biết, Bùi Cách Tuyến, 2019. Biểu hiện gen chống oxy hóa trên cây phát tài (*Dracaena sanderiana*) trong điều kiện nhiễm độc chì. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn, số 14/2019.

3. Hồ Bích Liên, Huỳnh Văn Biết, Bùi Cách Tuyến, 2019. Đánh giá tiềm năng tích lũy chì của cây phát tài (*Dracaena sanderiana*). Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn, số 16/2019.

4. Hồ Bích Liên, Đào Minh Trung, Huỳnh Văn Biết, Bùi Cách Tuyến, 2019. Ảnh hưởng của pH và nồng độ chì đến khả năng hấp thu chì của cây phát tài (*Dracaena sanderiana*). Tạp chí tài nguyên và môi trường, số 15-2019.

5. Hồ Bích Liên, Đào Minh Trung, Huỳnh Văn Biết, Bùi Cách Tuyến, 2018. Ảnh hưởng của nồng độ chì đến sinh trưởng, tích lũy và loại bỏ chì của cây phát tài (*Dracaena sanderiana*)” Tạp chí tài nguyên và môi trường, số 20-2018.

PHỤ LỤC

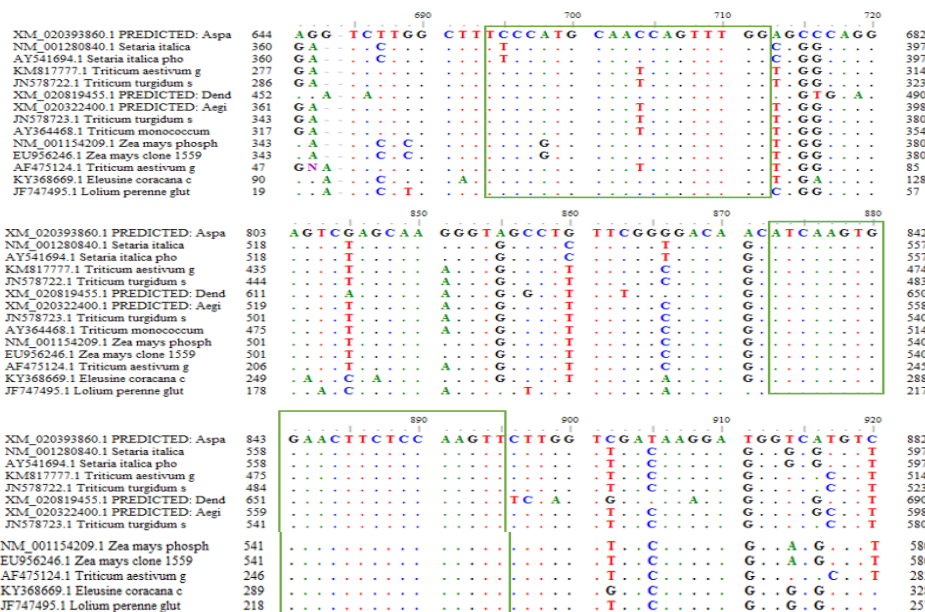
PHỤ LỤC 1. KẾT QUẢ KIỂM TRA TRÌNH TỰ GEN VÀ PRIMER

PHỤ LỤC 2. THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN *E. coli* VÀ KẾT QUẢ LY TRÍCH RNA

PHỤ LỤC 3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ANOVA

PHỤ LỤC 4. MỘT SỐ HÌNH ẢNH THÍ NGHIỆM

Phụ lục 1.2. Kết quả kiểm tra trình tự gen và primer GPX



Hình 1.3. Kết quả kiểm tra trình tự bảo tồn gen GPX bằng Bioedit

5'-ttycrrtgcaycagtttgg-3'
 Length=20 A=3.5 G=4.5 T=7.0 C=5.0 CG=47.5%
 Linguistic complexity = 89%; Primer's PCR efficiency = 78%
 $dG = -24.9$ kcal/mol; $dH = -153.3$ kcal/mol; $dS = -435.1$ cal/K mol
 $T_m = 54.2^\circ\text{C}$ (Allawi's thermodynamics parameters (Biochemistry, 1997, 36:10581-10594)
 $T_m = 55.0^\circ\text{C}$ ($T_m = 77.1 + 11.7\text{Log}[K+] + (41(G + C)-528)/L$)
 Extinction coefficient = 183950 L/(mol·cm)
 Molecular weight = 6091 g/mol
 $OD_{260} = 1.000$; $\mu\text{g} = 33.112$; nmol = 5.436
 100 μM = dissolve in 54.4 μl of MQ-water or TE buffer

5'-aacttgaggagaagtccacttgat-3'
 Length=23 A=7.0 G=5.0 T=7.0 C=4.0 CG=39.1%
 Linguistic complexity = 85%; Primer's PCR efficiency = 77%
 $dG = -26.6$ kcal/mol; $dH = -175.7$ kcal/mol; $dS = -504.8$ cal/K mol
 $T_m = 53.6^\circ\text{C}$ (Allawi's thermodynamics parameters (Biochemistry, 1997, 36:10581-10594)
 $T_m = 55.0^\circ\text{C}$ ($T_m = 77.1 + 11.7\text{Log}[K+] + (41(G + C)-528)/L$)
 $T_m = 51.7^\circ\text{C}$ ($T_m = 64.9 + 41(G + C-16.4)/L$)
 Extinction coefficient = 226300 L/(mol·cm)
 Molecular weight = 7063 g/mol
 $OD_{260} = 1.000$; $\mu\text{g} = 31.211$; nmol = 4.419
 100 μM = dissolve in 44.2 μl of MQ-water or TE buffer

Hình 1.4. Kết quả kiểm tra cặp primer GPX bằng FastPCR

PHỤ LỤC 2. THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN *E. coli* VÀ KẾT QUẢ LY TRÍCH RNA

Phụ lục 2.1. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn Thành phần môi trường Luria - Bertani (LB)

LB lỏng: Tryptone Type I : 10 g/l

Yeast extract : 5 g/l

NaCl : 10 g/l

pH : 7-7,2

Nước cất vừa đủ : 1000 ml

LB rắn: Môi trường LB lỏng bổ sung agar 15g/l

Bảng 2.1. Thành phần bổ sung vào môi trường LB rắn

Tên thành phần	Nồng độ stock ban đầu	Nồng độ cần sử dụng
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
IPTG	100 mM	0,5 mM
X-gal	40 mg/ml	100 µg/m

Phụ lục 2.2. Kết quả ly trích RNA

Bảng 2.2. Nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu RNA tổng số được ly trích

Mẫu	Nồng độ (µg/ml)	Độ tinh sạch	Mẫu	Nồng độ (µg/ml)	Độ tinh sạch	Mẫu	Nồng độ (µg/ml)	Độ tinh sạch
R0	50,3	1,82	T0	100,3	1,82	L0	90,3	2,02
R1	24,7	1,88	T1	54,7	1,87	L1	94,7	1,78
R2	19,5	1,78	T2	49,5	1,88	L2	89,0	1,98
R24	17,2	1,92	T24	87,2	1,96	L24	97,7	1,82
R02	45,8	1,85	T02	95,8	1,88	L02	105,3	1,84
R12	45,9	1,80	T12	105,9	2,02	L12	105,	1,88

							1	
R22	42,3	1,84	T22	42,3	1,80	L22	52,6	1,89
R242	19,2	1,88	T242	67,2	1,78	L24 2	59,5	1,98
R04	21,4	1,88	T04	52,4	1,78	L04	41,9	1,98
R14	49,5	1,95	T14	59,5	1,98	L14	47,8	1,96
R24	49,9	1,85	T24	59,9	1,84	L24	44,6	1,89
R244	36,7	1,81	T244	76,7	1,89	L24 4	66,3	1,91
R06	32,3	1,80	T06	52,3	1,90	L06	72,3	1,85
R16	45,1	2,01	T16	45,9	1,91	L16	105, 9	2,11
R26	26,4	1,98	T26	29,9	1,78	L26	96,3	1,90
R246	26,1	1,92	T246	86,4	1,86	L24 6	66,6	1,95
R08	40,3	1,89	T08	56,3	1,83	L08	100, 4	1,99
R18	40,9	1,89	T18	49,2	1,85	L18	90,1	1,79
R28	40,8	1,89	T28	40,8	1,81	L28	90,9	1,81
R248	50,1	1,98	T248	104,1	1,91	L24 8	90,4	1,83
R010	36,2	1,88	T010	153,5	1,89	L01 0	66,3	1,86
R110	38,7	2,02	T110	58,8	1,92	L11 0	58,6	1,79
R210	38,1	1,85	T210	54,1	1,82	L21 0	88,0	1,86
R241 0	39,7	1,80	T241 0	49,6	1,90	L24 10	59,6	1,93

Thứ tự trong ký hiệu mẫu:

R: rễ; T: thân; L: lá

0, 1, 2, 24: 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 24 giờ

2, 4, 6, 8, 10: 200, 400, 600, 800, 1000 ppm

PHỤ LỤC 3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ANOVA

Bảng 3.1. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng chì trong rễ của *D. sanderiana* ở các pH khác nhau

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	3	4.50567E6	1.50189E6	1995866.88	0.0000
Trong nhóm	8	6.02	0.7525		
Tổng	11	4.50568E6			

Bảng 3.2. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng chì trong thân của *D. sanderiana* ở các pH khác nhau

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	3	9522.14	3174.05	108.12	0.0000
Trong nhóm	8	234.86	29.3575		
Tổng	11	9757			

Bảng 3.3. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng chì trong lá của *D. sanderiana* ở các pH khác nhau

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	3	5514.44	1838.15	204.58	0.0000
Trong nhóm	8	71.88	8.985		
Tổng	11	5586.32			

Bảng 3.4. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng chì trong cây của *D. sanderiana* ở các pH khác nhau

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	3	4.93165E6	1.64388E6	46443.98	0.0000
Trong nhóm	8	283.16	35.395		
Tổng	11	4.93194E6			

Bảng 3.5. Kết quả phân tích ANOVA về tốc độ tăng chiều cao cây Phát tài ở các nồng độ Pb khác nhau

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	8	13.5603	1.69504	2.58	0.0205
Trong nhóm	45	29.5122	0.655827		

Tổng	53	43.0725			
------	----	---------	--	--	--

**Bảng 3.6. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong rễ cây
Phát tãi sau 10 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	2.52E+09	3.60E+08	39.88	0.0000
Trong nhóm	16	1.44E+08	9.02E+06		
Tổng	23	2.66E+09			

**Bảng 3.7. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong rễ cây
Phát tãi sau 20 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	2.41E+09	3.44E+08	12.72	0.0000
Trong nhóm	16	4.33E+08	2.71E+07		
Tổng	23	2.84E+09			

**Bảng 3.8. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong rễ cây
Phát tãi sau 30 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	4.45E+09	6.35E+08	6.91	0.0007
Trong nhóm	16	1.47E+09	9.19E+07		
Tổng	23	5.92E+09			

**Bảng 3.9. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong rễ cây
Phát tãi sau 40 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	4.04E+09	5.56E+08	9.86	0.0005
Trong nhóm	16	1.12E+08	6.43E+07		
Tổng	23	5.16E+09			

**Bảng 3.10. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong rễ cây
Phát tãi sau 50 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	3.44E+09	4.91E+08	10.71	0.0001
Trong nhóm	16	7.33E+08	4.58E+07		
Tổng	23	4.17E+09			

**Bảng 3.11. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong rễ cây
Phát tãi sau 60 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	4.08E+09	5.83E+08	9.23	0.0001
Trong nhóm	16	1.01E+09	6.32E+07		
Tổng	23	5.09E+09			

**Bảng 3.12. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong thân cây
Phát tãi sau 10 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	96101.7	13728.8	3.7	0.0144
Trong nhóm	16	59402.7	3712.67		
Tổng	23	155504			

**Bảng 3.13. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong thân cây
Phát tãi sau 20 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	120221	17174.5	9.52	0.0001
Trong nhóm	16	28865.5	1804.1		
Tổng	23	149087			

**Bảng 3.14. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong thân cây
Phát tãi sau 30 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	2.62E+07	3.74E+06	16.74	0.0000
Trong nhóm	16	5.42E+07	3.38E+06		
Tổng	23	8.03E+07			

**Bảng 3.15. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong thân cây
Phát tãi sau 40 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	1.03E+07	1.47E+06	47.39	0.0000
Trong nhóm	16	495181	30948.8		
Tổng	23	1.08E+07			

**Bảng 3.16. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong thân cây
Phát tãi sau 50 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	8.31E+06	1.19E+06	14.13	0.0000
Trong nhóm	16	8.31E+06	84012.5		
Tổng	23	8.31E+06			

**Bảng 3.17. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong thân cây
Phát tãi sau 60 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	1.55E+07	2.22E+06	23.44	0.0000
Trong nhóm	16	1.51E+06	94607.4		
Tổng	23	1.70E+07			

**Bảng 3.18. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong lá cây
Phát tãi sau 10 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	42990.2	6141.46	11.24	0.0000
Trong nhóm	16	8742.23	546.389		
Tổng	23	51732.4			

**Bảng 3.19. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong lá cây
Phát tãi sau 20 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	16502.2	2357.46	3.36	0.0213
Trong nhóm	16	11241.3	702.58		
Tổng	23	27743.5			

**Bảng 3.20. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong lá cây
Phát tãi sau 30 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	13798.5	1971.22	11.94	0.0000
Trong nhóm	16	2642.18	165.136		
Tổng	23	16440.7			

**Bảng 3.21. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong lá cây
Phát tãi sau 40 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	37053.1	5293.3	6.34	0.0011
Trong nhóm	16	13350.8	834.423		
Tổng	23	50403.9			

**Bảng 3.22. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong lá cây
Phát tãi sau 50 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	166390	23770	3.42	0.0198
Trong nhóm	16	111333	6958.32		
Tổng	23	277723			

**Bảng 3.23. Kết quả phân tích ANOVA về hàm lượng Pb tích lũy trong lá cây
Phát tãi sau 60 ngày thí nghiệm**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	7	265703	37957.5	8.56	0.0002
Trong nhóm	16	70955.6	4434.73		
Tổng	23	336658			

**Bảng 3.24. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD*
ở rễ**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	93.3994	4.06084	46.00	0.0000
Trong nhóm	48	4.23747	0.0882806		
Tổng	71	97.6368			

**Bảng 3.25. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD*
ở thân**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	61.0645	2.65498	22.55	0.0000
Trong nhóm	48	5.65253	0.117761		
Tổng	71	66.717			

**Bảng 3.26. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD*
ở lá**

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	11.9847	0.521073	6.22	0.0000
Trong nhóm	48	4.0222	0.0837958		
Tổng	71	16.0069			

Bảng 3.27. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen GST ở rễ

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	104.78	4.55567	58.42	0.0000
Trong nhóm	48	3.743	0.0779792		
Tổng	71	108.523			

Bảng 3.28. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen GST ở thân

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	42.8367	1.86246	81.69	0.0000
Trong nhóm	48	1.09433	0.0227986		
Tổng	71	43.931			

Bảng 3.29. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen GST ở lá

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	21.8656	0.950677	35.78	0.0000
Trong nhóm	48	1.27553	0.0265736		
Tổng	71	23.1411			

Bảng 3.30. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen GPX ở rễ

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	141.471	6.15092	151.37	0.0000
Trong nhóm	48	1.95053	0.0406361		
Tổng	71	143.422			

Bảng 3.31. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen GPX ở thân

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	77.7813	3.3818	123.35	0.0000
Trong nhóm	48	1.31593	0.0274153		
Tổng	71	79.0972			

Bảng 3.32. Kết quả phân tích ANOVA về mức độ biểu hiện gen GPX ở lá

	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Tỉ số F	Giá trị P
Giữa các nhóm	23	43.96	1.9113	60.51	0.0000
Trong nhóm	48	1.51627	0.0315889		
Tổng	71	45.4763			

PHỤ LỤC 4. MỘT SỐ HÌNH ẢNH THÍ NGHIỆM



Hình 3: Bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng pH đến khả năng hấp thụ, tích lũy chì của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)

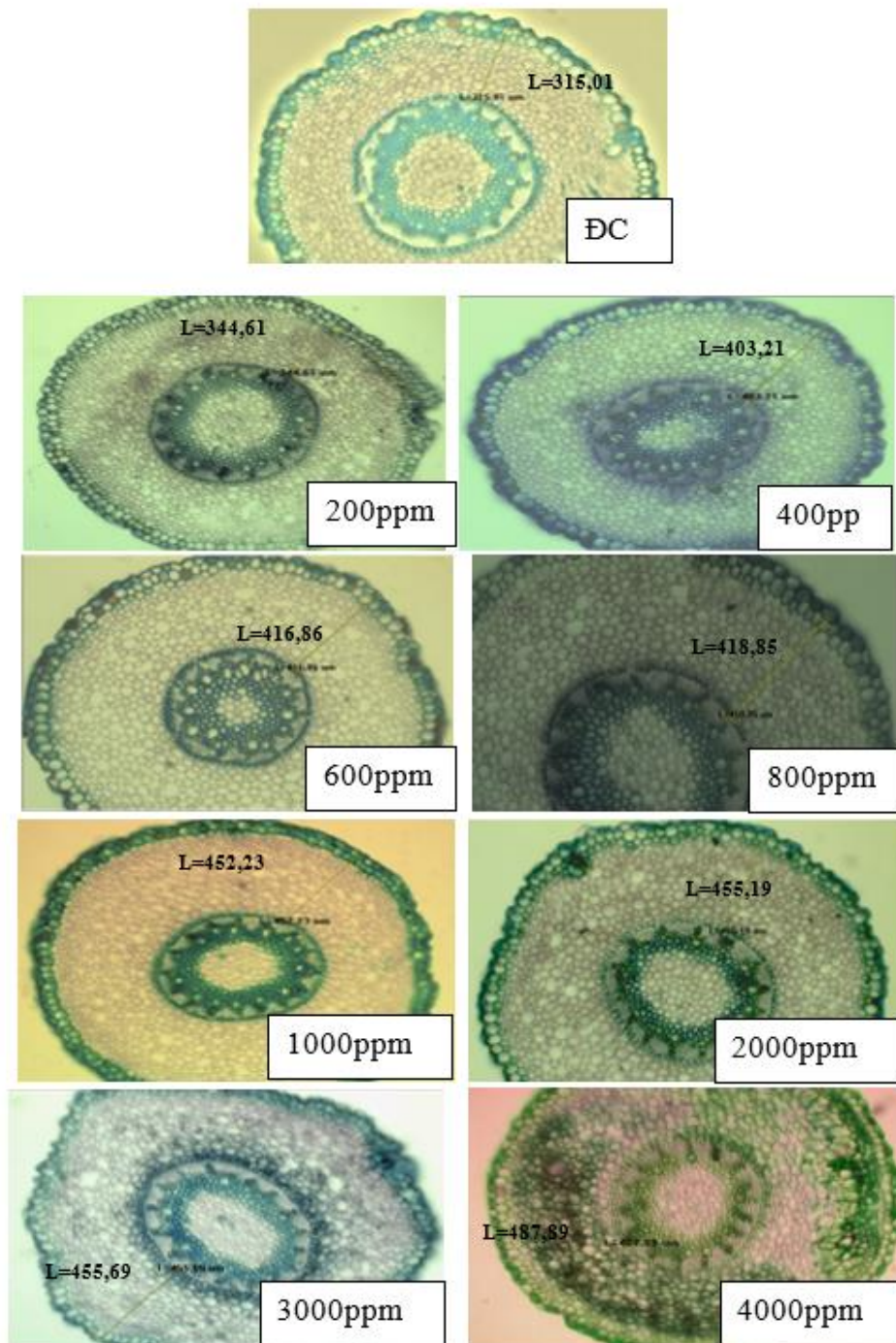


Hình 4: Bố trí thí nghiệm khảo sát khả năng hấp thụ và tích lũy chì của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)

Hình 3 thể hiện sơ đồ bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng pH đến khả năng hấp thụ, tích lũy chì của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) và hình 4 thể hiện sơ đồ bố trí thí nghiệm khảo sát khả năng hấp thụ và tích lũy chì của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*). Cả 2 thí nghiệm được thực hiện trong nhà lưới có mái che mưa nhằm tạo thuận lợi cho sự lưu thông không khí giữa bên trong và bên ngoài nhà lưới và vừa đảm bảo che mưa hiệu quả, được xây dựng tại Trường ĐH Thủ Dầu Một, Tỉnh Bình Dương.



Hình 5: Hình thái của 3 loài thực vật Trúc bách hợp (*Dracaena reflexa*), Phát tài búp sen (*Dracaena deremensis*) và Phát tài lộc (*Dracaena sanderiana*) (từ trái sang phải). 3 loài thực vật đã được dưỡng ra rễ trong nước cất và chuẩn bị đem vào thí nghiệm 1.



Hình 6. Sự thay đổi độ dày mô mềm rễ của cây phát tài khi tiếp xúc với chì ở các nồng độ khác nhau (μm) (Hình được xem ở vật kính 10X)