

**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

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 do nhiều yếu tố độc hại gây ra. Trong đó, vấn đề ô nhiễm kim loại nặng (KLN) trong môi trường ngày càng được quan tâm ở nhiều quốc gia trên thế giới. KLN có khả năng tích tụ trong đất, trong động, thực vật và rất khó phân giải hay đào thải. Điều này 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 chì (Pb) vì mức độ ô nhiễm phổ biến và độc tính cao đối với cơ thể sống. Trong 4 loại KLN được xếp là những chất gây nguy hiểm nhất cho môi trường sinh thái (As, Hg, Pb và Cd), mức độ nguy hiểm của Pb được xếp thứ 2 (ATSDR, 2007). Thống kê của Hiệp hội chì quốc tế năm 2012, thế giới sử dụng khoảng 10 triệu tấn Pb thì có đến 1 triệu tấn con người thải vào môi trường (Cơ quan môi trường Châu âu, 2019). Điều này đã gây ô nhiễm chì trong môi trường đất và nước ngày càng nặng hơn. Chì 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 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 đều ứng dụng những công nghệ tiên tiến, tuy tốc độ xử lý chất ô nhiễm nhanh nhưng khá tốn kém về chi phí (EPA, 2000). Theo Matthew Yglesias (2019) đưa tin ở trang www.vox.com, 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 đã tìm ra được phương pháp dùng thực vật để loại bỏ ô nhiễm KLN trong môi trường (Phytoremediation). 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. 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 chì 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.

Phát tài *Dracaena sanderiana* có nguồn gốc ở châu phi, được trồng phổ biến ở Việt Nam với ý nghĩa mang lại may mắn cho gia chủ trong cuộc sống và công việc nên có giá trị kinh tế cao. Ngoài giá trị tinh thần và kinh tế, những năm gần đây Phát tài được phát hiện có giá trị trong xử lý môi trường. Khả năng hấp thụ được nhiều kim loại nặng Cu, Cr, Ni, 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 về mặc di truyền 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.

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.

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.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

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

1.1.1. Các đặc tính của Pb

Chì (Pb) có hóa trị phổ biến là II, IV, có độc tính cao, ảnh hưởng nghiêm trọng cho môi trường sinh thái và mức độ gây độc được xếp thứ 2 (ATSDR, 2007). Sự ứng dụng rộng rãi của Pb đã gây ra ô nhiễm cho môi trường, đặc biệt là môi trường đất.

Trong đất, Pb có thể tồn tại ở dạng tự do, tạo phức với thành phần vô cơ, acid hữu cơ, hoặc hấp phụ trên bề mặt các hạt vật liệu sinh học, chất hữu cơ và các hạt sét) (Vega và ctv, 2010). Sự di động của Pb trong đất thường bị hạn chế bởi sét, chất hữu cơ, Fe, oxide mangan. Pb thường tích tụ chủ yếu ở tầng đất mặt với nồng độ giảm dần theo độ sâu. Hàm lượng Pb trong tầng đất mặt khoảng 25 mg/kg (Kabata, 2001). Trong môi trường nước, Pb liên kết với các anion hữu cơ, chloride và hydroxide tạo các hợp chất không tan hoặc kết hợp với sulphite, sulphate tạo các hợp chất ít tan. Độ hòa tan của Pb phụ thuộc vào giá trị pH của nước, pH càng thấp thì khả năng hòa tan của Pb càng cao, khi pH trung tính Pb kết tủa (Kabata, 2001).

Pb không có chức năng sinh học và gây độc cho sinh vật sống ở nồng độ rất thấp. Pb gây ô nhiễm cho môi trường thông qua nhiều nguồn khác nhau như từ tự nhiên, hoạt động giao thông, hoạt động khai thác mỏ và luyện quặng, bùn thải, hoạt động công nghiệp và nông nghiệp. 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 (Traunfeld và Clement, 2001).

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 Pb như Mỹ, Úc, Đức, Thụy Điển, Anh, Pháp, Thái Lan và Trung Quốc. Các dòng sông ở nhiều nơi trên thế giới đang ở trong tình trạng báo động về ô nhiễm Pb do nước thải của đô thị, khu dân cư, công nghiệp và nông nghiệp.

1.1.3.2. 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 gây ô nhiễm đất nông nghiệp, nước mặt, trầm tích, nước ngầm có khắp nơi với nồng độ khá cao như Đông Anh-Hà Nội; Đồng Nai; Hưng Yên; Thái Nguyên; Bắc Ninh; Nam Định; Quảng Ninh, và Hà Tây.

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 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 ô nhiễm (đất, nước mặt, nước ngầm, nước thải, bùn thải và cả môi trường không khí) [(EPA (2000); Rodriguez và ctv (2005); Moreno và ctv (2008); Zitka và ctv (2013)].

1.2.2. Phân loại

Phương pháp dùng thực vật xử lý ô nhiễm có thể được phân thành 5 loại: phytoextraction, phytostabilization, rhizofiltration, phytodegradation và phytovolatilization. Đối với chất ô nhiễm vô cơ (**kim loại nặng**), các phương pháp

thích hợp sử dụng để loại bỏ là **phytoextraction, rhizofiltration, phytovolatilization và phytostabilization.**

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

Pb được hấp phụ trên bề mặt rễ, gắn kết vào nhóm cacboxylic của các acid uronic trên vách tế bào hoặc gắn kết trực tiếp với polysaccharid ở bề mặt vách tế bào biểu bì rễ và được hấp thụ vào hệ thống rễ (Pourrut và ctv, 2011). Pb được đưa vào rễ bằng kênh canxi hoặc các protein xuyên màng (White, 2012).

1.3.1.2. Thực vật siêu hấp thụ

Các loài thực vật có khả năng tích lũy KLN ở mức độ >1000 mg/kg chất khô được gọi chung là “thực vật siêu hấp thụ” (Henry và ctv, 2000). Hiện nay, có khoảng 750 loài thực vật, thuộc 101 họ có khả năng hấp thụ và tích lũy KLN, trong đó có 450 loài thực vật thuộc 34 họ khác nhau là siêu hấp thụ KLN, 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).

Số loài thực vật có khả năng hấp thụ Pb >1000 mg/kg từ năm 2012 đến 2018 là 20 loài, 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 chủ yếu Pb trong bộ phận rễ (Kumar và ctv, 2018).

1.3.1.3. Khả năng tích lũy Pb ở thực vật

Brassica juncea có khả năng làm giảm 81,7% Pb trong đất bề mặt; *Alternanthera philoxeroides* loại bỏ khoảng 30 - 80% Pb; *Raphanus sativus* L. tích lũy 332 mg/kg chì trong rễ và tổng Pb tích lũy trong cây là 843 mg/kg (Nadia và ctv, 2012). *Sorghum halepense* tích lũy Pb trong rễ khá cao 1406,8 µg/g TLK (Salazar, 2014). Hàm lượng Pb tích lũy trong cây 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 chì xử lý 200mg/l). 3 loài *Microstegium ciliatum*, *Polygala umbonata*, *Spermacoce mauritiana* có nồng độ Pb khá cao trong chồi (12.200 – 28.370 mg/kg) và rễ (14.580 – 128.830 mg/kg). Một số loài thực vật là loài siêu tích lũy Pb là *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Thalapsi alspres*, *Thalapsi rotundifolium*, *Allysum wulfenium*, *Lemna minor*, *Vallisneria Americana*, *Hydrilla verticillate* (Sharma, 2016).

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 hấp thụ Pb trong rễ gấp 470 – 4908 lần (Diệp Thị Mỹ Hạnh và Garnier Zarli, 2007). Dương xỉ (*Pteris vittata*) có khả năng

chịu Pb đến nồng độ 3000 mg/kg đất (Trần Văn Tựa và ctv, 2011). Cây sậy (*Phragmites australis*) có hàm lượng Pb trong rễ là 196,21 mg/kg (Đàm Xuân Vận, 2013). Cây cỏ voi (*Pennisetum purpureum*) làm giảm 20,50 - 56,67% Pb so với hàm lượng ban đầu là 250-1500 mg/kg (Nguyễn Thị Hồng Hạnh và Bùi Thị Thư, 2017).

1.3.2. Khả năng phân bố Pb của 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 (Dogan và ctv, 2018). Yếu tố làm hạn chế sự di chuyển của Pb là Pb dễ liên kết với lignin và pectin hoặc liên kết với nhóm carboxylic trong vách tế bào ở rễ 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, trong gian bào và liên kết với vách tế bào. Bên trong tế bào, Pb được phân bố trong 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

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. Sự dày 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 thâm nhập của Pb qua màng tế bào (Krzeslowska, 2011).

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).

b. Cơ chế cô lập Pb trong không bào

Không bào là nơi tồn trữ thích hợp khi KLN tích lũy cao trong tế bào. Cây siêu tích lũy Pb *Pisum sativum* giữ 90% Pb trong không bào của tế bào (Wioleta và ctv, 2015). Cơ chế cô lập Pb trong không bào có liên quan đến các protein gắn kết với kim loại: phytochelatins (PCs) và metallothioneins (MTs). Việc cô lập KLN trong không bào ở lá thường xảy ra ở các loài siêu tích lũy với nồng độ cao gấp 100 - 1000 lần so với các loài không có khả năng này (Prasad và ctv, 2003).

1.3.3.3 Cơ chế chống oxy hóa

Cơ chế chống oxy hóa có sự tham gia của nhiều enzym có liên quan trực tiếp đến việc làm giảm các gốc tự do.

Superoxide dismutase (SOD) là enzyme chống oxy hóa và phòng thủ đầu tiên khi có dấu hiệu stress oxy hóa. SOD đóng vai trò quan trọng trong việc giải độc ROS bằng cách điều hòa 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 .

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 $O_2^{\cdot -}$ của SOD. GPX có vai trò phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 .

Enzyme có vai trò chính trong việc xúc tác sự gắn kết giữa GSH và kim loại là **glutathione S-transferase (GST)**. GST cũng có vai trò xúc tác sự vận chuyển phức hợp GSH -kim loại đến không bào. Liên hợp kim loại và glutathion được vận chuyển nhanh chóng từ dịch tế bào vào không bào để tiếp tục xử lý.

1.3.3.5. Ảnh hưởng của Pb đến 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). ROS chủ yếu gồm $^1O_2$, H_2O_2 , $O^{\cdot -}_2$ và $OH^{\cdot}$ và sự tiếp xúc Pb làm tăng sản sinh H_2O_2 và $O^{\cdot -}_2$ và ROS được tạo ra ở các vị trí khác nhau trong tế bào như lục thể, ti thể, màng plasma, mạng lưới nội chất và peroxisome (Wang và ctv, 2012). Khi ROS được sinh ra, chúng oxy hóa tất cả các loại phân tử sinh học như chlorophyll, axit nucleic, protein và lipid (Yadav, 2010), dẫn đến gây rối loạn chức năng và gây chết tế bào.

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

Cây Phát tài *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). Cây Phát tài thuộc loại cây thân bụi, cao khoảng 1m, đường kính 2-3cm. Cây Phát tài có rễ chùm, ngắn, màu trắng. Lá cây thuôn hình 10 - 20 cm, màu xanh bóng, mềm, đầu lá thuôn nhọn uốn ra phía ngoài, gốc lá kéo dài thành bẹ mỏng ôm thân.

Cây Phát tài có khả năng xử lý các chất ô nhiễm như: Bisphenol A trong nước rỉ rác (Nguyễn Thị Hà, 2010); KLN Cu, Cr, Ni trong bùn thải từ các gara xe, có khả năng hấp thụ Hg, Cu và Cr rất cao, hiệu suất hấp thụ là 67 - 72% và có tiềm năng trong đào thải benzen ra khỏi môi trường (Ten Yi Hao, 2011).

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

Có 25.415 gen biểu hiện khác nhau khi *Festuca arundinacea* tiếp xúc với Pb, sự biểu hiện của những gen này có vai trò trực tiếp hoặc gián tiếp trong tích lũy Pb (Li và ctv, 2017). Trong 48 giờ tiếp xúc với chì ở cỏ *Perennial ryegrass*, các gen *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 (Hu và Fu, 2012). *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). Gen *GST* có liên quan đến các loại stress môi trường, bao gồm các 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. Biểu hiện gen *GST* vẫn ở mức cao hơn ít nhất 48 giờ (Shahrtash, 2013). Tác động của Pb ở nồng độ 1000 ppm làm tăng biểu hiện gen *Cu/Zn SOD*, *FeSOD*, *POD*, *GPX* ở giai đoạn rất sớm trên thực vật *Festuca arundinacea* (Liu và ctv, 2016). Các gen *SOD*, *CAT* và *APX* ở *Lepidium sativum* biểu hiện mạnh ở nồng độ 400 và 600 ppm, biểu hiện thấp hơn ở nồng độ 100 và 200 ppm (Ibrahim và Bafeel, 2009). Sự biểu hiện gen và hoạt động của các enzym chống oxy hóa (*CAT*, *SOD*, *GPX* và *APX*) đã tăng lên đáng kể ở cả mô lá và mô rễ ở ba giống lúa mì (Morvarid, Gonbad và Tirgan) ở giai đoạn lá cờ trong điều kiện stress Pb (0, 15, 30 và 45 mg/kg đất) (Navabpour và ctv, 2020).

1.5.2. Kỹ thuật phân tử nghiên cứu biểu hiện gen

Hiện nay, kỹ thuật được sử dụng phổ biến nhất trong việc nghiên cứu biểu hiện gen là Real-time PCR. 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 (Livak và Schmittgen, 2008). So với các kỹ thuật định lượng mRNA khác, RT-PCR có thể được sử dụng để định lượng từ các mẫu có lượng mRNA nhỏ hơn nhiều.

CHƯƠNG 2

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. TIỀN TRÌNH NGHIÊN CỨU

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

2.2.1. Vật liệu nghiên cứu

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

2.2.3. Hóa chất nghiên cứu

2.3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

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

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

3 loài thực vật là Phát tài lộc (*Dracaena sanderiana*), Trúc bách hợp (*Dracaena reflexa*) và Phát tài búp sen (*Dracaena deremensis*) được trồng thí nghiệm trong 200 ml dung dịch chì $Pb(NO_3)_2$ nồng độ Pb 100 ppm, pH 4,5. Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức, 3 lần lặp lại: Nghiệm thức ĐC 1: Nước không nhiễm Pb + *Dracaena sanderiana*; Nghiệm thức ĐC 2: Nước không nhiễm Pb + *Dracaena deremensis*; Nghiệm thức ĐC 3: Nước không nhiễm Pb + *Dracaena reflexa*; Nghiệm thức 1: Nước nhiễm Pb 100 ppm + *Dracaena sanderiana*; Nghiệm thức 2: Nước nhiễm Pb 100 ppm + *Dracaena deremensis*; Nghiệm thức 3: Nước nhiễm Pb 100 ppm +

Dracaena reflexa. Chỉ tiêu tăng trưởng gồm chiều cao và sinh khối khô của cây được khảo sát ở các thời gian 0, 10, 20 và 30 ngày thí nghiệm. Hàm lượng Pb tổng trong rễ, thân và lá và trong nước được khảo sát ở ngày thứ 30 của thí nghiệm. Khả năng loại bỏ sinh học chì (PMU) của các loài thực vật được tính sau 30 ngày thí nghiệm.

2.3.1.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp thụ và tích lũy Pb của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)

Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức với các giá trị pH 3,5; 4; 4,5; 5, lặp lại 3 lần, được thực hiện trên loài Phát tài (*Dracaena sanderiana*) trong 15 lít dung dịch chì $Pb(NO_3)_2$ nồng độ Pb 100 ppm. Các chỉ tiêu gồm chiều cao cây, chiều dài rễ, diện tích lá được khảo sát ở các thời gian 0 ngày, 10 ngày, 20 ngày và 30 ngày thí nghiệm. Hàm lượng Pb tổng trong các rễ, thân và lá của cây được khảo sát ở ngày thứ 30.

2.3.2. NỘI DUNG 2: KHẢ NĂNG HẤP THỤ VÀ TÍCH LŨY Pb CỦA CÂY PHÁT TÀI (*Dracaena sanderiana*)

2.3.2.1. Chuẩn bị cây thí nghiệm

Loài Phát tài (*Dracaena sanderiana*) 1 năm tuổi có kích thước và trọng lượng tương đương và không phát hiện chì được nuôi dưỡng trong nước cất 1 lần cho đến khi ra rễ và phát triển ổn định thì tiến hành thí nghiệm. Các cây Phát tài được sử dụng nghiên cứu là những cây có số lượng lá, chiều dài cây, chiều dài rễ và tình trạng khỏe mạnh tương đồng nhau.

2.3.2.2. Chuẩn bị vật liệu thí nghiệm

2.3.2.3. Chuẩn bị dung dịch Pb thí nghiệm

Dung dịch Pb stock được chuẩn bị từ Pb nitrat [$Pb(NO_3)_2$] và được pha loãng đến nồng độ Pb cần thí nghiệm với thể tích 15 lít, pH 4,5.

2.3.2.4. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm gồm 8 nghiệm thức tương ứng với 8 nồng độ Pb 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000 và 4000 ppm (nồng độ tính trên Pb) và một nghiệm thức đối chứng sử dụng nước cất 1 lần không bổ sung và không phát hiện Pb. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu một yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên và 3 lần lặp lại. Thời gian thí nghiệm là 60 ngày. Mỗi nghiệm thức trồng 9 cây Phát tài.

2.3.2.5. Khảo sát các chỉ tiêu nghiên cứu

Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây gồm 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 trước thí nghiệm và định kỳ 10 ngày/lần trong 60 ngày.

Hàm lượng Pb tổng trong các bộ phận rễ, thân và lá của cây Phát tài được phân tích ở trước thí nghiệm và 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày của thí nghiệm.

Vị trí phân bố Pb trong các bộ phận rễ, thân và lá được khảo sát ở ngày thứ 60 của thí nghiệm. Cấu trúc giải phẫu của các mô rễ, thân và lá được khảo sát ở ngày thứ 60 của thí nghiệm.

2.3.3. NỘI DUNG 3: SỰ BIỂU HIỆN GEN CHỐNG OXY HÓA CỦA CÂY PHÁT TÀI (*Dracaena sanderiana*) TRONG ĐIỀU KIỆN NHIỄM ĐỘC CHÌ

2.3.3.1. Vật liệu và bố trí thí nghiệm

Các mẫu cây Phát tài (*D. sanderiana*) được chuẩn bị như trình bày ở mục 2.3.2.1 và trồng trong dung dịch $Pb(NO_3)_2$ nồng độ 200, 400, 600, 800 và 1000 ppm ở pH 4,5. Mẫu lá, thân và rễ cây Phát tài được thu nhận tại các thời điểm 0, 1, 2 và 24 giờ sau khi xử lý với 3 lần lặp lại. Mẫu cây không xử lý Pb được sử dụng làm đối chứng.

2.3.3.2. Ly trích RNA tổng số và tổng hợp cDNA

Các mẫu rễ, thân và lá của cây được sử dụng để ly trích RNA tổng số và mẫu RNA sau khi được ly trích được dùng để tổng hợp cDNA bằng kit.

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

Mẫu cDNA được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại các đoạn gen mục tiêu với primer xuôi (F) và ngược (R). Sản phẩm PCR được kiểm tra cùng với thang chuẩn DNA 100bp. 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/Zn SOD*, *GPX* và *ACT* trên vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α

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.

b. Tạo tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp

Tế bào *E. coli* DH5 α được tạo theo quy trình của Huynh và ctv (2012).

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 bằng sốc nhiệt.

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

Chọn lọc 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*) bằng phương pháp PCR khuẩn lạc.

2.3.3.5. Ly trích DNA plasmid và giải trình tự gen

Ly trích DNA plasmid và kiểm tra bằng phương pháp PCR plasmid với cặp mồi đặc hiệu. 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 *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX*. Dữ liệu sau giải trình tự được xử lý bằng phần mềm tin sinh học BioEdit. Phân tích, kiểm tra và so sánh trình tự các nucleotide bằng Blast (NCBI), Clustal Omega.

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

Đường chuẩn được thành lập dựa vào mối quan hệ tuyến tính của giá trị Ct từ phản ứng Real - time PCR và số bản copies được tính toán theo hệ số pha loãng 10 lần ở các mẫu chuẩn. 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.

2.3.3.9. 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 Pb với log số bản copies ở mẫu đối chứng không xử lý Pb.

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

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.4. Phương pháp khảo sát các chỉ tiêu sinh trưởng của cây

Chiều cao cây, chiều dài rễ được đo bằng thước chia vạch đến cm. Trọng lượng tươi và trọng lượng khô được xác định bằng cân kỹ thuật 2 số lẻ. Hàm lượng nước trong cây được xác định theo phương pháp khối lượng ướt (Brunet, 2008). Hàm lượng diệp lục tố trong lá được đo bằng máy CCM – 200 (Opti – Sciences, Mỹ). Diện tích lá được xác định theo phương pháp cân nhanh (Vũ Văn Vụ và ctv, 2004).

2.4.5. Phương pháp khảo sát hình thái giải phẫu học của các mô ở các bộ phận rễ, thân và lá của cây Phát tài

Các mẫu rễ, thân và lá được cố định trong formaldehyde axit acetic và được nhuộm kép với xanh methylen và đỏ carmin. Các mẫu được quan sát bằng kính hiển vi Olympus CX 22. Kích thước mô giải phẫu được đo bằng phần mềm Optika Vision.

2.4.6. Phương pháp xác định sự phân bố chì trong các mô rễ, thân và lá

Sự phân bố chì trong mô thực vật được quan sát bằng phương pháp hóa mô (Tupan và ctv, 2016) và được quan sát dưới kính hiển vi Olympus CX 22.

2.4.7. Phương pháp xác định hàm lượng chì tổng trong rễ, thân và lá

Ở mỗi mốc thời gian thí nghiệm 0, 10, 20, 30, 40, 50, và 60 ngày, các mẫu rễ, thân, lá ngâm rửa 3 lần trong nước khử ion, cắt nhỏ và sấy ở 70°C và tiến hành xử lý mẫu theo phương pháp vô cơ hóa ướt (Perkin-Elmer, 1996). Hàm lượng chì tổng được đo bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (Shimadzu AAS 7000, Nhật).

2.4.8. Phương pháp xác định hàm lượng chì tổng trong nước

Hàm lượng chì tổng trong nước được đo bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (Shimadzu AAS 7000, Nhật).

2.4.9. Phương pháp xác định hiệu quả loại bỏ chì

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

$$H = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \cdot 100\% \quad \text{Trong đó: } H: \text{Hiệu quả loại bỏ chì (\%); } C_1: \text{Nồng độ chì ban đầu; } C_2: \text{Nồng độ chì sau xử lý.}$$

2.4.10. Phương pháp xác định khả năng chống chịu, khả năng vận chuyển, khả năng tích lũy sinh học và loại bỏ sinh học chì của cây Phát tài

- **Phương pháp xác định khả năng chống chịu chì:** Khả năng chống chịu chì của cây được đánh giá qua chỉ số chống chịu TI (tolerance index) (Wang và ctv, 2014) dựa trên các chỉ tiêu sinh trưởng: $TI (\%) = 1/3\{(\text{Chiều cao cây nhiễm chì}/\text{chiều$

cao cây đối chứng) + (Chiều dài rễ cây nhiễm chì/ chiều dài rễ cây đối chứng) + (Trọng lượng khô của cây nhiễm chì/trọng lượng khô của cây đối chứng)} *100.

- **Xác định khả năng vận chuyển chì:** được đánh giá qua chỉ số TF (translocation factor) (Marchiol và ctv, 2004) theo công thức:

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

- **Xác định khả năng loại bỏ sinh học chì:** Được đánh giá qua chỉ số PMU (percentage of metal ion uptake) được tính là phần trăm ion chì được hấp thụ và được tính theo công thức sau:

$$PMU (\%) = \frac{\text{Hàm lượng chì trong giống Phát tài}}{\text{hàm lượng chì trong dung dịch}} * 100$$

2.5. Phân tích số liệu: Tất cả số liệu trong đề tài là trung bình cộng của 3 lần lặp lại và $\pm$ độ lệch chuẩn SD. Dùng 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 $0,01$.

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 CHÌ (Pb) CỦA BA LOÀI THỰC VẬT THUỘC CHI *DRACAENA*

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

Phát tài lộc *D. sanderiana* có tốc độ tăng trưởng chiều cao và sinh khối khô cao hơn so với 2 loài thực vật nghiên cứu còn lại là Phát tài búp sen (*D. deremensis*) và Trúc bách hợp (*D. reflexa*), và thấp nhất là loài *D. reflexa*.

3.1.1.2. Hàm lượng chì tích lũy trong ba loài thực vật chi *Dracaena*

Tổng hàm lượng Pb tích lũy trong *D. sanderiana*, *D. deremensis* và *D. reflexa* đã được xác định là 2340,38, 1843,48 và 1741,00 mg/kg. Trong đó, tổng hàm lượng Pb tích lũy trong *D. sanderiana* cao hơn ở 2 loài còn lại ($p < 0,05$). Tổng hàm lượng Pb tích lũy ở *D. deremensis* chiếm 78,77% và ở *D. reflexa* chiếm 74,39%.

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

Loài *D. sanderiana* có khả năng loại bỏ Pb cao hơn loài *D. deremensis* và *D. reflexa*. Sau 30 ngày thí nghiệm, *D. sanderiana* loại bỏ 93,16 % Pb; *D. deremensis* loại bỏ 84,34 % Pb và *D. reflexa* loại bỏ 66,77 % Pb. PMU đạt cao nhất ở loài *D. sanderiana* (92,20%) và thấp nhất ở loài *D. reflexa* (65,34%).

3.1.2. ẢNH HƯỞNG CỦA pH ĐẾN KHẢ NĂNG HẤP THỤ VÀ TÍCH LŨY Pb CỦA CÂY PHÁT TÀI (*DRACAENA SANDERIANA*)

3.1.2.1 Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*) trong điều kiện nhiễm Pb 100 ppm

Trong môi trường nhiễm Pb nồng độ 100 ppm có pH 4,5 và 5,0, cây *D. sanderiana* sinh trưởng tốt hơn ở pH 3,5 và 4,0.

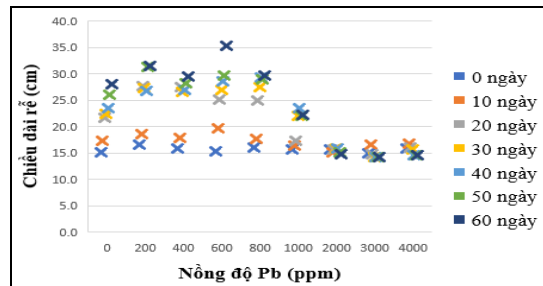
3.1.2.2. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng Pb tích lũy trong cây *Dracaena sanderiana*

Cây Phát tài có khả năng hấp thụ và tích lũy Pb từ môi trường nước ở khoảng pH từ 3,5 đến 5,0. Ở pH 4,5 hàm lượng Pb tích lũy trong rễ, thân và lá ở các thời gian cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Sau 30 ngày thí nghiệm, hàm lượng chì 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. Cho nên đề tài sẽ chọn pH 4,5 cho các thí nghiệm của đề tài.

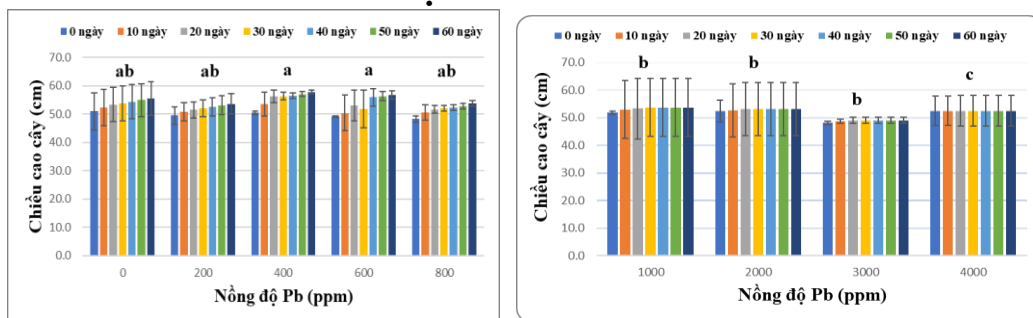
3.2. KHẢ NĂNG HẤP THỤ, TÍCH LŨY VÀ PHÂN BỐ CHÌ (Pb) CỦA CÂY PHÁT TÀI (*DRACAENA SANDERIANA*) TRONG MÔI TRƯỜNG NHIỄM ĐỘC Pb

3.2.1. Sự sinh trưởng của cây Phát tài trong môi trường nhiễm độc Pb

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 (hình 3.7; 3.8; 3.9; 3.10; 3.11; 3.12). Ngược lại, nồng độ Pb ≥ 1000 ppm có tác động nghiêm trọng, làm giảm tất cả các chỉ tiêu khảo sát.



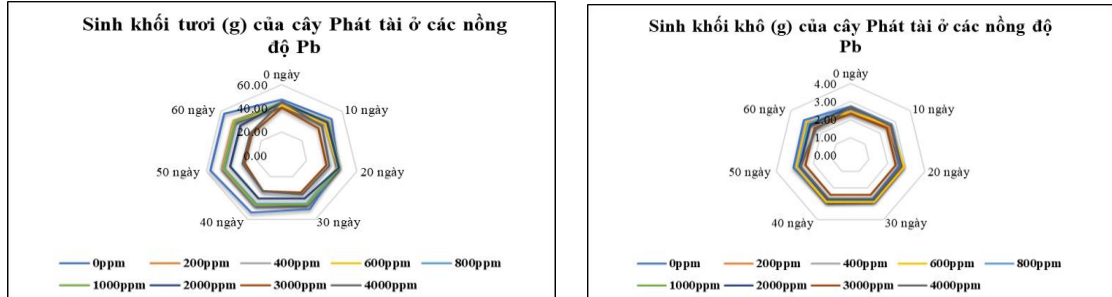
Hình 3.8. Sự tăng trưởng chiều dài rễ cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau



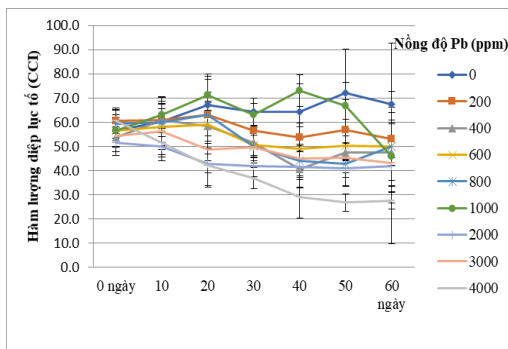
(a)

(b)

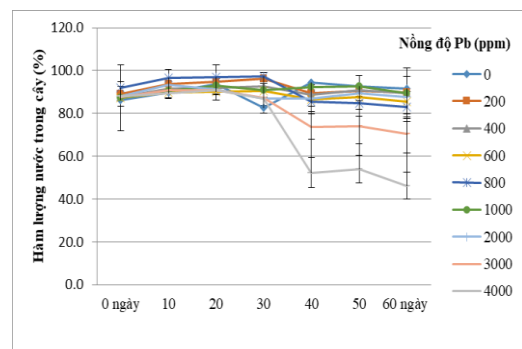
Hình 3.7. Sự tăng trưởng chiều cao cây Phát tài theo thời gian ở các nồng độ Pb khác nhau. (a): Nồng độ dưới 1000 ppm; (b): Nồng độ trên 1000 ppm
(Giá trị ở cột đồ thị có ký tự giống nhau, không có sự khác biệt ($p < 0,05$))



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



Hình 3.11. Sự biến động hàm lượng diệp lục tố trong lá cây Phát tài các nồng độ chì khác nhau

Hình 3.12. Sự biến động hàm lượng nước trong cây Phát tài các nồng độ chì khác nhau

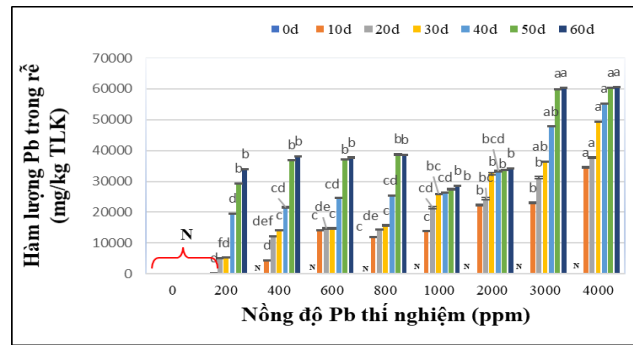
3.2.1.6. Khả năng chống chịu Pb của cây Phát tài

Khả năng chống chịu Pb của cây ở nồng độ Pb 200, 400, 600, 800, 1000 ppm tương ứng là 80,38%; 93,53%; 114,47%; 82,32%; 32,12%. Ở nồng độ trên 800 ppm, nồng độ Pb càng cao, khả năng chống chịu Pb càng giảm. Cây Phát tài có khả năng chịu đựng Pb cao hơn các loài *Salix integra* (Weishanhu, Yizhibi và Dahongtou).

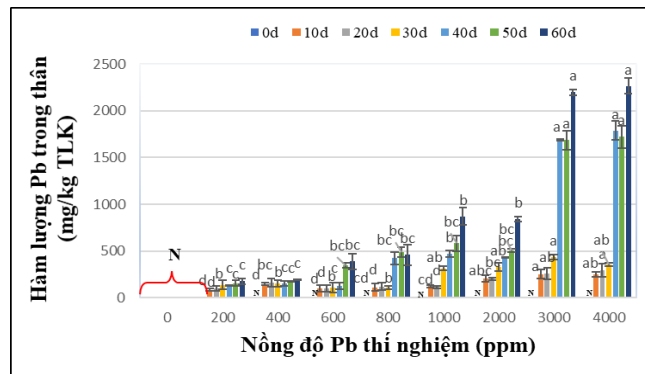
3.2.2. Khả năng tích lũy Pb trong cây Phát tài (*Dracaena sanderiana*)

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

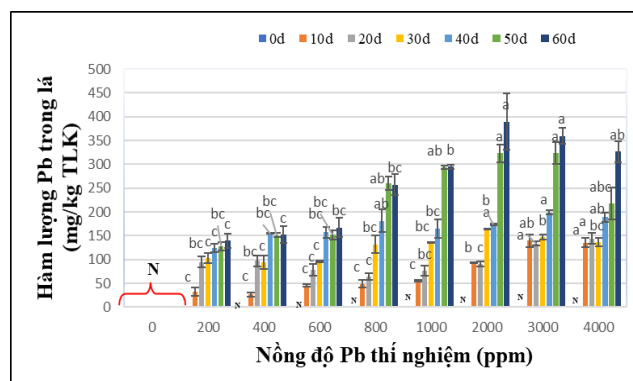
Cây Phát tài có ngưỡng tích lũy nhất định, khi đạt ngưỡng tích lũy này thì cây sẽ không tiếp tục hấp thụ kim loại Pb từ bên ngoài. Cây có khả năng tích lũy trong rễ là 38518,01 mg/kg TLK Pb ở nồng độ Pb < 1000 ppm và 60570 mg/kg TLK ở nồng độ Pb $\geq$ 1000 ppm.



Hình 3.13. Hàm lượng chì tích lũy trong rễ của cây Phát tài (mg/kg TLK)
(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 chì tích lũy trong thân của cây Phát tài (mg/kg TLK)
(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 chì tích lũy trong lá của cây Phát tài (mg/kg TLK)
(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)

Cây Phát tài có khả năng tích lũy Pb trong rễ cao hơn cây dương xỉ (*Pteris vittate*) (Trần Văn Tựa, 2011), trong thân và lá cao hơn *Chrysopogon zizanioides*, *Ricinus communis*, *Conyza canadensis*, *Oryza sativa*, *Pfaffia glomerata*, *Elsholtzia splendens* (Kumar và ctv, 2018). Hàm lượng Pb trong cây Phát tài ở tất cả các nồng độ Pb được xếp theo thứ tự rễ > thân > lá, cho thấy càng lên cao khả năng vận chuyển chì càng chậm dần. Kết quả tương tự cây trâm ôi (*Lantana camara* L.) (Diệp Thị Mỹ Hạnh và ctv, 2007), *Armeria maritima*, *Agrostis tenuis* và *Cardaminopsis halleri* (Dahmani và ctv, 2000).

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

Khả năng vận chuyển Pb của cây Phát tài từ rễ lên thân lá thấp ($TF < 1$), phần lớn chì được cây tích lũy chủ yếu trong rễ (97,50%), chỉ một phần nhỏ được chuyển lên thân và lá. Việc tích lũy chì chủ yếu trong rễ đã được báo cáo ở *Vicia faba* (Piechalak và ctv, 2002), *Pisum sativum* (Malecka và ctv, 2009).

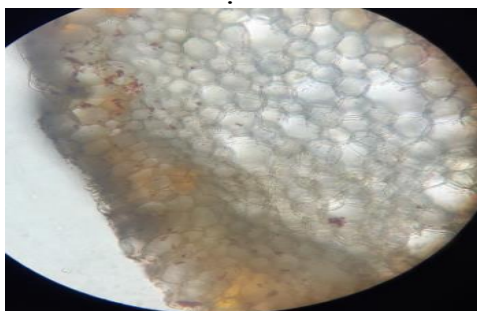
3.2.2.3. Hiệu quả loại bỏ Pb

Cây Phát tài có hiệu suất loại bỏ Pb cao nhất (92,3%) ở nồng độ chì 200 ppm và thấp nhất ở 4000 ppm (7,2%). Hiệu quả loại bỏ chì ở nồng độ 200 ppm của cây Phát tài cao hơn nhiều loài thực vật khác như: cỏ chân vịt (*lemna minor*) (Singh và ctv, 2012); (*Eichhornia crassipes* (Mart.) (Patel và ctv, 2018).

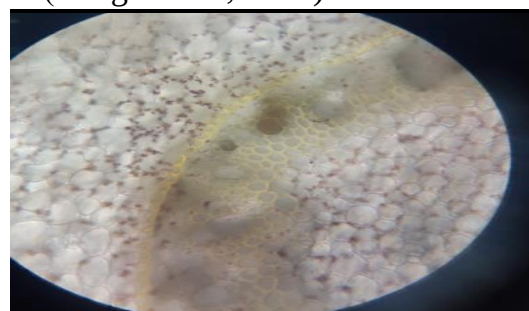
3.2.3. Sự phân bố Pb trong phạm vi tế bào của cây Phát tài

3.2.3.1. Sự phân bố Pb trong rễ

Ở các mô rễ của cây Phát tài, Pb xuất hiện dạng hạt, phân bố chủ yếu trong gian bào và liên kết với vách tế bào (hình 3.22), đây 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). 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 3.22. 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)

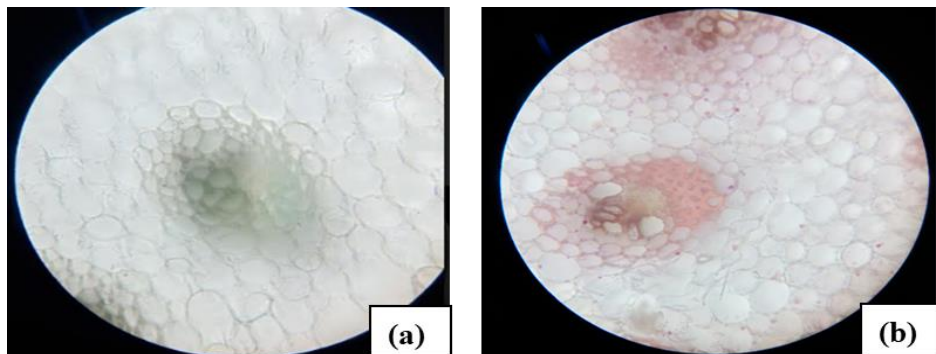


Hình 3.23. Sự phân bố của Pb ở nội bì của rễ cây phát tài (hình xem ở vật kính 40X)

3.2.3.2. Sự phân bố chì trong thân

Dạng chì phân bố chủ yếu trong thân Phát tài là dạng khuếch tán và một phần nhỏ ở dạng hạt. Trong thân, Pb phân bố chủ yếu xung quanh các bó mạch (dạng

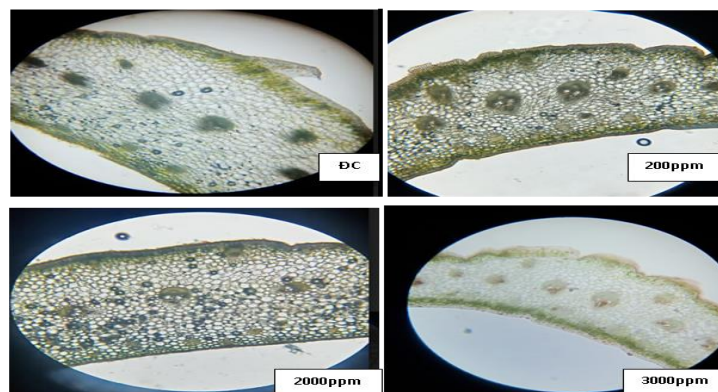
khuếch tán) và có xu hướng khuếch tán ra các mô mềm lân cận (dạng hạt) (hình 3.26).



Hình 3.26. 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 chì trong lá

Pb không được phát hiện ở các mô trong lá của cây Phát tài tiếp xúc chì ở nồng độ 200 ppm đến 2000 ppm. Pb chỉ được phát hiện ở nồng độ 3000 ppm và 4000 ppm (hình 3.28) và quan sát thấy tập trung ở bó mạch. Có thể do nồng độ chì 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)

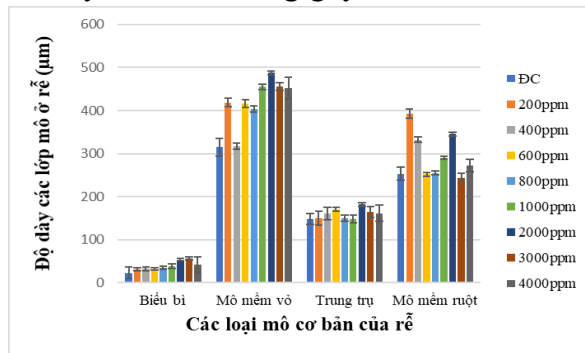
3.2.4. Phản ứng của mô thực vật Phát tài trong điều kiện nhiễm độc Pb

3.2.4.1. Phản ứng của các mô ở rễ

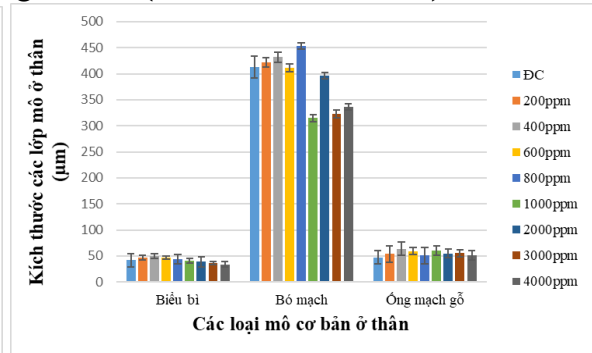
Mô biểu bì, mô mềm vỏ, mô mềm ruột và rung trụ đều có kích thước tăng ở các cây nhiễm độc Pb và tăng hơn so với cây đối chứng (Hình 3.29). Các mô ở rễ dày hơn có thể là phương thức giải độc của cây nhằm làm tăng kích thước rào cản vật lý, giảm sự dịch chuyển chì đến các bộ phận bên trên của cây. Kết quả tương tự cũng đã được báo cáo ở một số loài thực vật *Thalassia hemprichii* (Tupal và ctv, 2016).

3.2.4.2. Phản ứng của các mô ở thân

Ở nồng độ Pb 200 - 800 ppm, phần lớn các mô ở thân 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% (hình 3.31). Kết quả này có thể là phản ứng của cây dưới tác động gây độc của Pb ở nồng độ cao (Gomes và ctv, 2011).

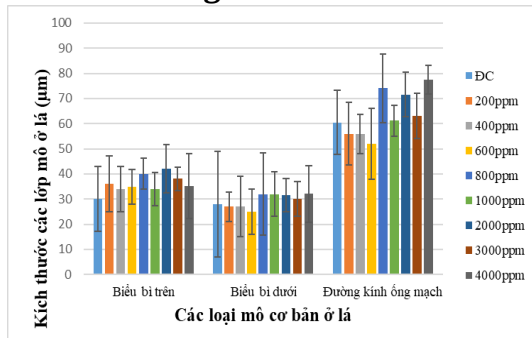


Hình 3.29. Kích thước các lớp mô của lá ở các nồng độ Pb (μm)

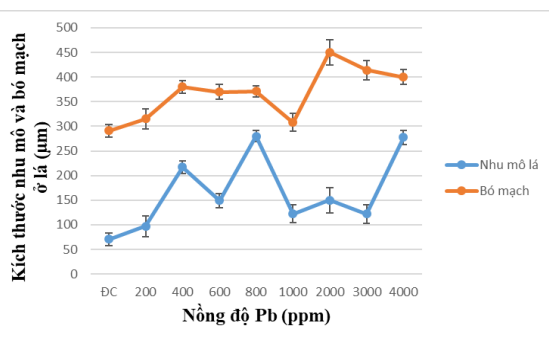


Hình 3.31. Kích thước các lớp mô của thân ở các nồng độ Pb (μm)

3.2.4.3. Phản ứng của các mô ở lá



Hình 3.33. Kích thước các lớp mô của lá Phát tài ở các nồng độ Pb



Hình 3.34. Kích thước nhu mô và bó mạch của lá Phát tài ở các nồng độ Pb

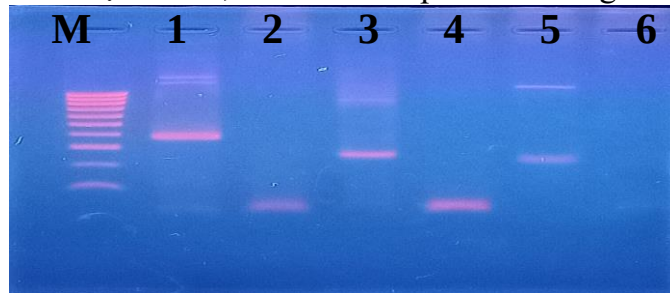
Độ dày của biểu bì trên, kích thước nhu mô lá và bó mạch đều tăng và cao hơn so với đối chứng. Tuy nhiên sự tăng kích thước ở các mô này khác nhau tùy theo nồng độ Pb và loại mô. Cấu trúc của các loại mô khác như biểu bì dưới, ống mạch cũng có sự thay đổi theo nồng độ Pb. Độ dày của biểu bì dưới và kích 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 3.33 và 3.34).

3.3. SỰ BIỂU HIỆN GEN CHỐNG OXY HÓA Ở CÂY PHÁT TÀI

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

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

Sản phẩm khuếch đại từ các cặp primer *GST*, *Cyt-Cu/Zn SOD* và *GPX* cho băng có kích thước lần lượt là 362, 221 và 202 bp so với thang chuẩn (Hình 3.35).



Hình 3.35. 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

3.3.4. Ly trích DNA tái tổ hợp

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, có mức độ tương đồng đến 98,62% với trình tự gen *GST* trên cây huyết giác (*Dracaena cambodiana*).

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

```
CACAAGAAGAACCCGGTCCTCCTCCACGACGGCAAGCCCGTCTGCG
AGTCGTCGATCATCGTCCAATACATCGACGAGGTGTGGGCCGACAAAGCT
CCGATCTTGCCCAAGGACCCCTATGGCCGGGCCCAAGCGAGATTCTGGGC
CGATTTTCATCGACAAGAAGATATACGAGTGCGGAAGTAGGCTGTGGAAG
CTGAAGGGAGAAGCCACGAGGAAGCCAAGAAGGAATTCATCGAAATCT
TGAAGCTGTTGGAGGGCGAGCTCGGCGACAAGAAATTCTTTGGTGGTGAT
GAATTTGGGTTTGTGCGACATTACTCTTGTGCCCTTCACCGCATGGTTCTAC
ACCTACGAGACCTGCGC
```

3.3.5.2. Trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD*

Trình tự gen *Cyt-Cu/Zn SOD* trên cây Phát tài chưa có công bố chính thức trên ngân hàng gen, mức độ tương đồng với đoạn gen *Cyt-Cu/Zn SOD* ở một số cây trong chi cọ, măng tây lên đến 88%.

```
GACACAACAAATGGATGCATGTCCACTGGACCTCATTTCATCCTGC
TGAAAAGGAACACGGGGCACCTGAGGATGAGAACCGCCATGCCGGTGAT
CTTGGAATGTGACTGCTGCTGAGGATGGAAGTCTCCTATTAACGTTAC
TGACAACCAGATTCCACTCACTGGGCCAAATTCAATTGTTGGAAGGGCTG
TTGTTGTCCATGCCGATCCGGATGA
```

3.3.5.2. Trình tự gen *GPX*

Trình tự đoạn gen *GPX* trên cây Phát tài có kích thước 202 bp, chưa có công bố chính thức trên ngân hàng gen, có mức độ tương đồng với trình tự gen *GPX* cây măng tây *Asparagus officinalis* 87,75%.

TTTCCGTGCAATCAGTTTGGATCACAAGAGCCTGGGAGCAACGAGG
AGATTTTAGAATTTGCTTGCACCTCGCTTCAAGGCTGAATATCCCATCTTTG
ACAAGGTTGATGTGAATGGGCAAAATGCTGCACCCATCTATAAGTTCTTG
AAGTCGCAGAAAGGTGGCATATTTGGAGATGGCATCAAGTGGAACCTTCTC
CAAGT

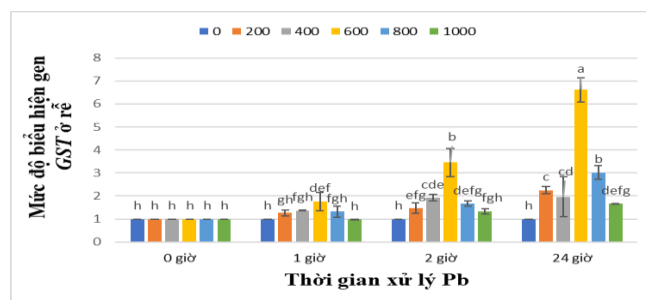
3.3.6. Đánh giá mức độ biểu hiện gen chống oxy hoá của cây Phát tài

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

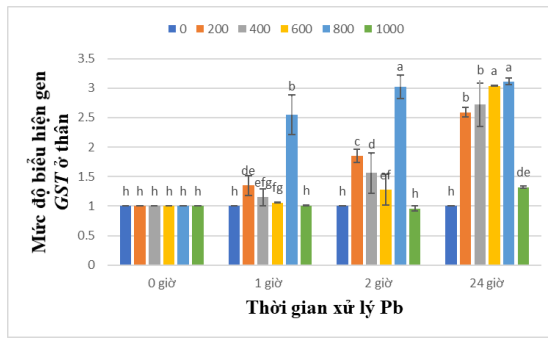
Tỷ lệ biểu hiện gen *GST* ở rễ, thân và lá đều cao hơn và khác biệt so với nghiệm đối chứng ($p < 0,01$) (hình 3.45, hình 3.46 và hình 3.47). Mức độ biểu hiện gen tăng gấp 1,67 - 6,61 lần ở rễ, 1,32 - 3,11 lần ở thân và 1,42 - 2,62 lần ở lá sau 24 giờ tiếp xúc. Nồng độ Pb cao làm ức chế hoạt động của gen *GST* (Verma và Dubey, 2003). Kết quả này phù hợp với kết quả về khả năng chống chịu của cây Phát tài, ở nồng độ 1000 ppm khả năng chống chịu chì của cây rất thấp, điều này có thể có liên quan đến sự biểu hiện của gen *GST*. Việc tăng cường biểu hiện gen *GST* có thể là cách thức để cây giải độc để vận chuyển Pb đến không bào hoặc gian bào (Shahrtash, 2013).

Sự gia tăng biểu hiện gen *GST* xảy ra chủ yếu ở thân và lá (thân > lá) mặc dù rễ tích lũy phần lớn Pb. Điều này 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 (Mittler và ctv, 2004).

Gen *GST* biểu hiện thấp đối với Pb ở thời gian tiếp xúc ngắn (1-2 giờ), nhưng mạnh ở thời gian 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 (bảng 3.6).

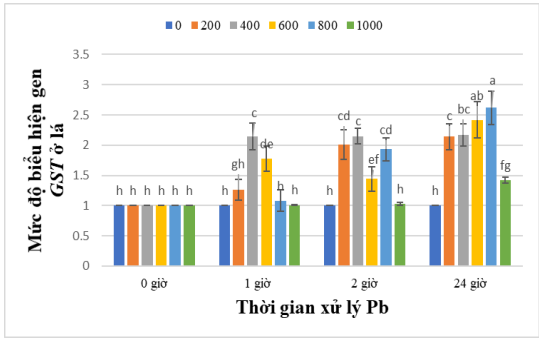


Hình 3.45. Mức độ biểu hiện gen *GST* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ Phát tài. (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.46. Mức độ biểu hiện gen GST theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân 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 3.46. Mức độ biểu hiện gen GST theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá Phát tài

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

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

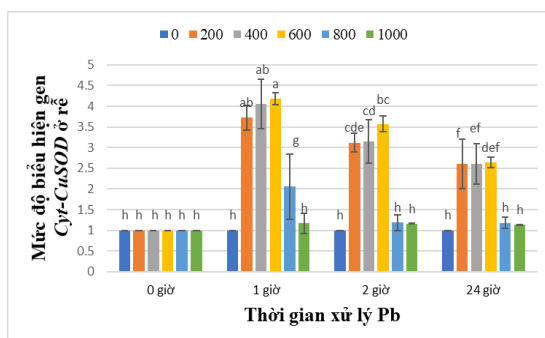
Bộ phận	200 ppm			400 ppm			600 ppm			800 ppm			1000 ppm		
	1	2	24	1	2	24	1	2	24	1	2	24	1	2	24
Rễ	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→	→	↑
Thân	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→	→	↑
Lá	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→	↑	↑	→	→	↑

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.

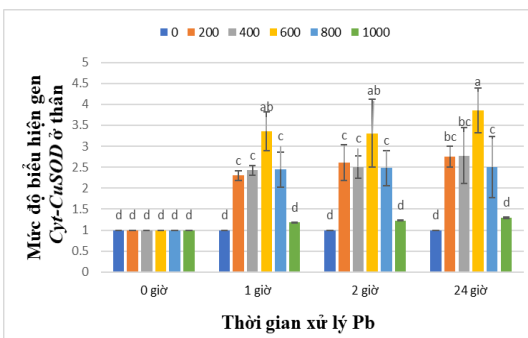
3.3.6.2. Đánh giá mức độ biểu hiện gen Cyt-Cu/Zn SOD

Sự tăng nồng độ Pb 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 ở nồng độ Pb 600 ppm, nồng độ Pb > 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). 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

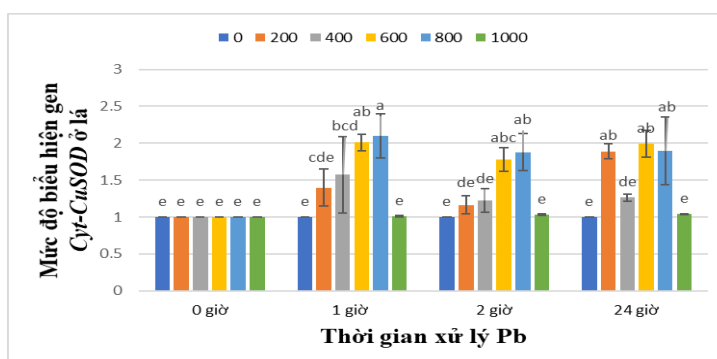
nồng độ Pb cao cũng làm ức chế hoạt động của gen *Cyt-Cu/Zn SOD* (hình 3.48; 3.49; 3.50).



Hình 3.48. Mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/ZnSOD* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ 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 3.49. Mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/ZnSOD* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân 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 3.50. Mức độ biểu hiện gen *Cyt-Cu/Zn SOD* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá Phát tài. (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Ở rễ, mức độ biểu hiện gen mạnh ở 1 giờ xử lý và giảm dần cho đến 24 giờ; Ở thân, mức độ biểu hiện gen tăng dần cho đến 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 (Bảng 3.7). 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. *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 Pb nên đã có sự đáp ứng gen từ sớm để tăng cường sự biểu hiện và tăng hoạt tính enzyme 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. Kết quả tương tự trên cây *L. perenne* và *A. Thaliana* (Liu và ctv, 2009).

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	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	→	→	→

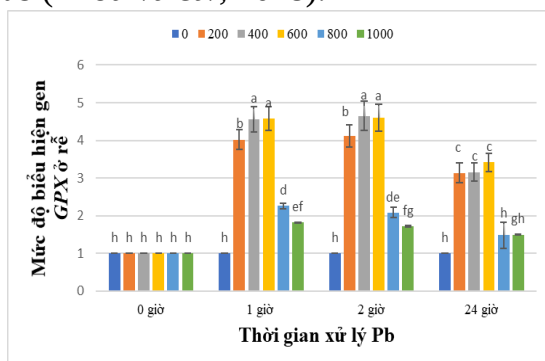
Trong cùng một nồng độ và bộ phận, mũi tên thể hiện sự thay đổi mức độ biểu hiện gen tại thời điểm sau so với thời điểm trước liền kề. “↑, ↓, →”: Tăng, giảm, không đổi; “1, 2, 24”: 1 giờ, 2 giờ và 24 giờ.

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

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 (hình 3.51; 3.52 và 3.53).

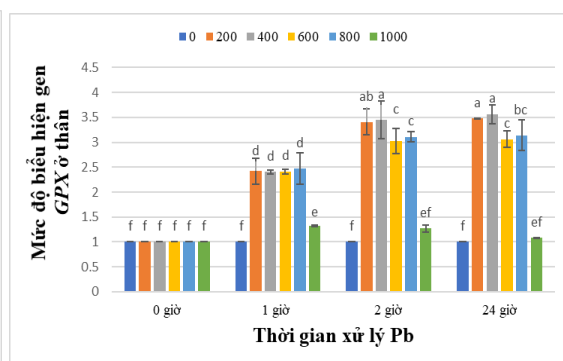
Tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* tăng dần khi nồng độ chì tăng dần từ 200 đến 600 ppm. Nhưng khi tăng nồng độ chì từ 600 đến 1000 ppm thì tỷ lệ biểu hiện gen giảm dần. Kết quả này chỉ xảy ra ở rễ. Với thân và lá, tỷ lệ biểu hiện gen *GPX* vẫn tăng ở nồng độ chì xử lý 800 ppm và chỉ giảm khi tăng nồng độ lên 1000 ppm.

Kết quả đề tài tương tự với *Festuca arundinacea* (Lou và ctv, 2017), *Citrullus lanatus* (Zhou và ctv, 2018).



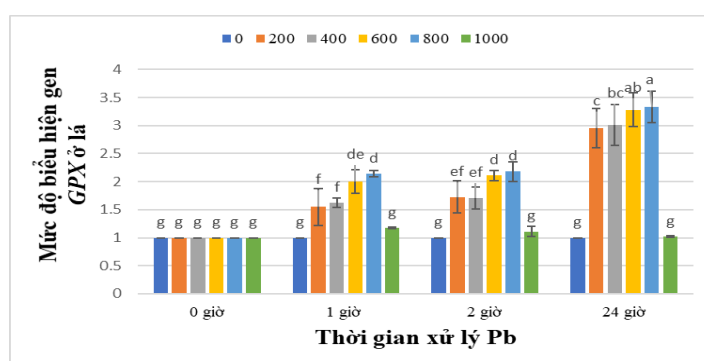
Hình 3.51. Mức độ biểu hiện gen *GPX* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu rễ Phát tài.

(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 gen *GPX* theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu thân 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 3.53. Mức độ biểu hiện gen GPX theo thời gian và nồng độ xử lý Pb ở các mẫu lá Phát tài. (Các chữ cái trên các cột đồ thị khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

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 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. 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).

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.

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 3.51, hình 3.52 và hình 3.53). 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).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

- 1- Nồng độ 1000 ppm Pb được xác định là ngưỡng gây độc cho cây Phát tài. Sự tăng trưởng của cây bị ảnh hưởng không đáng kể khi nồng độ Pb trong môi trường thấp hơn ngưỡng gây độc và bị ảnh hưởng nghiêm trọng khi nồng độ Pb vượt ngưỡng.
- 2- Cây Phát tài có khả năng hấp thụ và tích lũy 39235 mg/kg TLK Pb trong môi trường có nồng độ Pb = 800 ppm. 97,5% Pb được cây Phát tài tích lũy trong rễ. 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.
- 3- 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.
- 4- 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.

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.

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 Sương, 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.