

## NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ PHÂN TỬ CỦA QUÁ TRÌNH ĐÁP ỨNG VỚI ARSENIC Ở LÚA (*Oryza sativa* L.)

Trịnh Ngọc Nam<sup>1\*</sup>, Lê Hồng Thía<sup>2</sup>, Nguyễn Vương Tuấn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Đại học Công nghiệp tp. Hồ Chí Minh,  
\*trinhngocnam@yahoo.com

<sup>2</sup>Viện Khoa học Công nghệ và Quản lý môi trường, Đại học Công nghiệp tp. Hồ Chí Minh

**TÓM TẮT:** Arsenic (As) là á kim loại độc, ảnh hưởng trực tiếp đến hầu hết cây trồng. Hơn nữa, As còn gây ung thư ở người do việc uống nước ngầm bị ô nhiễm As hay tiêu thụ các sản phẩm từ cây trồng trên đất ô nhiễm, nhất là từ lúa gạo. Tác động của As đến sinh trưởng cây lúa đã được chứng minh, tuy nhiên chưa rõ cơ chế đáp ứng với nhiễm độc As. Nghiên cứu này cho thấy những biến đổi sinh hóa và phân tử trong rễ cây mầm lúa đối với tác động của As. Dung dịch As(III) 100  $\mu$ M ức chế mạnh sự sinh trưởng và kích thích mạnh sự sản sinh gốc tự do  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  ở rễ cây mầm lúa. Phân tích ICP-MS xác định hàm lượng arsenic trong rễ lúa gia tăng theo nồng độ dung dịch arsenite xử lý. Phân tích RT-PCR bán định lượng đã cho thấy sự tăng biểu hiện của một số gen mã hóa enzyme kháng oxy hóa, protein kinase, protein truyền tín hiệu nội bào, nhân tố điều hoà phiên mã và enzyme sinh tổng hợp acid abscisic. Gen có vai trò trong sự phân chia tế bào bị giảm biểu hiện. Xác định hoạt tính enzyme trên gel cho thấy có sự gia tăng mạnh hoạt tính enzyme kháng oxy hóa gồm peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) và catalase (CAT). Ngoài ra, rễ lúa xử lý với arsenate cho thấy có sự gia tăng hàm lượng proline, có vai trò ổn định hệ đệm tế bào và loại bỏ gốc tự do. Kết quả nghiên cứu đã góp phần làm sáng tỏ cơ chế phân tử, sinh hóa của sự đáp ứng với arsenic ở thực vật.

*Từ khóa:* *Oryza sativa*, arsenic, gốc tự do, proline, RT-PCR bán định lượng.

### MỞ ĐẦU

Arsenic (As) là một á kim loại độc, thuộc nhóm những chất gây ung thư hàng đầu đối với con người. Sức khỏe của hơn bốn mươi triệu người trên thế giới chịu ảnh hưởng nghiêm trọng do sử dụng nguồn nước ngầm bị ô nhiễm độc chất này [29], trong đó nhiều nhất ở các nước châu Á như Ấn Độ, Bangladesh, Tây Bengal, Trung Quốc và Việt Nam [6, 13, 34]. Thêm vào đó, việc sử dụng nước ngầm cho canh tác nông nghiệp, nhất là vào mùa khô, đã làm ô nhiễm As đất trồng và cuối cùng gây tích lũy As trong các sản phẩm nông nghiệp, đặc biệt là lúa gạo, loại cây lương thực của hơn ba tỷ người trên thế giới [3, 39].

Arsenic tồn tại trong môi trường ở hai dạng phổ biến là arsenate [As(VI)] và arsenite [As(III)]. As(III) có độc tính đối với thực vật mạnh hơn As(VI). Sự chuyển hóa qua lại của hai dạng As phụ thuộc vào trạng thái oxy hóa khử của đất [14]. Dưới tác động của stress As, các quá trình phát sinh hình thái, sinh trưởng và phát triển, bao gồm sự nảy mầm, sự tăng trưởng

chồi và rễ, khả năng gia tăng sinh khối và đặc biệt là năng suất thường bị giới hạn [1]. Stress As được chứng minh gây hư hỏng mạnh các thành phần của tế bào do kích thích sự sản sinh các gốc tự do (ROS- reactive oxygen species) như  $O_2^-$ ,  $^{\bullet}OH$ ,  $HO_2^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$  và  $^1O_2$ , làm tăng cường quá trình peroxide hóa lipid, ức chế sự tổng hợp ATP bởi cản trở sự phosphoryl oxy hóa trong quá trình đường phân [10, 15, 17]. Arsenic được thực vật hấp thu thông qua sự hoạt động của các phosphate transporter. Trong tế bào thực vật, độc tính As được giảm thiểu bằng cơ chế tạo phức chelate, dưới tác động của glutathione oxy hóa và các phytochelatin, và cô lập phức hợp chelate này trong không bào [7, 32]. Tuy nhiên, những thông tin về cơ chế phân tử và sinh hóa của quá trình tác động của độc tố As cũng như sự đề kháng của thực vật với những tác động này vẫn còn rất hạn chế.

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của stress As đến sự sinh trưởng của rễ lúa cũng như những thay đổi của các quá trình sinh hóa trong rễ lúa, bao gồm sự sản sinh ROS, hoạt tính các

isozyme kháng oxy hóa, sự tích lũy acid amin, được kiểm tra. Đặc biệt, sự biểu hiện các nhóm gen liên quan đến quá trình đáp ứng với stress môi trường tại các thời điểm 0, 3, 6, 12 và 24 giờ của stress As được phân tích bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng. Kết quả của nghiên cứu này góp phần hiểu biết về cơ chế đáp ứng của thực vật với stress As, như một phần trong chiến lược giảm thiểu sự tích tụ As trong các sản phẩm nông nghiệp và sự ảnh hưởng của As đến sức khỏe con người.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Giống lúa thuần, *Oryza sativa* L. cv. IR-50404, cung cấp bởi Công ty giống cây trồng miền Nam (tp. Hồ Chí Minh), được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu này. Mẫu hạt lúa được chuẩn bị theo phương pháp đã mô tả bởi Yeh et al. (2007) [48]. Hạt lúa được rửa bằng dung dịch NaOCl 8% trong 15 phút trên máy lắc. Sau khi tráng nước cất 3 lần, mỗi lần 5 phút, khoảng 6 g hạt lúa được ủ trong tối ở nhiệt độ 37°C, trong đĩa petri đường kính 9 cm chứa 20ml nước cất. Sau 4 ngày, 30 hạt lúa nảy mầm, với kích thước rễ mầm khoảng 2 mm, được chuyển sang đĩa petri đường kính 15cm chứa 20 ml nước cất và một tấm giấy lọc. Các đĩa petri được giữ trong tối ở nhiệt độ 26±2°C. Sau 3 ngày, các cây mầm lúa với chiều dài rễ mầm khoảng 3 cm được sử dụng cho các nghiên cứu ảnh hưởng của As(III) đối với sự tăng trưởng rễ, sự tích tụ của ROS, acid amin proline trong tế bào rễ, phân tích sự biểu hiện gen và hoạt tính các isoenzyme nội sinh.

#### Khảo sát ảnh hưởng của As(III) đến sự sinh trưởng rễ cây mầm lúa

Cây mầm lúa 7 ngày tuổi được xử lý với dung dịch NaAsO<sub>2</sub> [As(III)] (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) ở các nồng độ 0 (đối chứng), 50, 100, 150 và 200 µM. Sau 3 ngày, sự ảnh hưởng của stress As đến sự sinh trưởng được xác định bằng cách đo chiều dài và khối lượng tươi của rễ cây mầm. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập.

#### Định lượng As tích tụ trong rễ lúa

Sự tích tụ As trong rễ mầm lúa sau 24 giờ xử lý với dung dịch As(III) ở các nồng độ khác nhau được xác định bằng khối phổ plasma cảm ứng (ICP-MS-Inductively coupled plasma-mass

spectrometry). Toàn bộ rễ mầm lúa sau xử lý với As được thu nhận. Sau khi tráng ba lần bằng nước cất, rễ lúa được sấy khô ở nhiệt độ 55°C đến khối lượng không đổi và nghiền thành bột mịn bằng cối chày sứ. Mẫu bột rễ (1 g) được phá mẫu trong 3 ml HNO<sub>3</sub> ở 120°C trong 6 giờ [37]. Hàm lượng As trong mẫu được phân tích bằng máy ICP-MS Agilent 7500 ce (Agilent, Hoa Kỳ) tại Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm tp. Hồ Chí Minh. Chất chuẩn As (E-Merck, Đức) được sử dụng để hiệu chuẩn và kiểm chứng kết quả phân tích.

#### Khảo sát ảnh hưởng của As(III) đến sự sản sinh ROS trong rễ mầm lúa

Các gốc tự do ROS, như H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và O<sub>2</sub><sup>-</sup>, sản sinh trong rễ lúa trong suốt quá trình xử lý stress As được xác định bằng cách nhuộm với 3,3-diaminobenzidine (DAB) và nitroblue tetrazolium (NBT), theo tuần tự, dựa vào phương pháp đã được mô tả bởi Thordal-Christensen et al. (1997) [40]. Rễ lúa 7 ngày tuổi sau khi xử lý với dung dịch As(III) ở các nồng độ khác nhau được ngâm 10 phút trong dung dịch DAB 1 mg/ml (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) pha trong đệm 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) 10 mM, pH3,8 để xác định H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Đối với O<sub>2</sub><sup>-</sup>, rễ lúa được ngâm 20 phút trong dung dịch NBT 0,5 mg/ml (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) được pha trong hỗn hợp dung dịch đệm potassium phosphate 10 mM và NaN<sub>3</sub> 10 mM. Sau thời gian ngâm, phản ứng nhuộm được kết thúc bằng cách ngâm rễ lúa trong cồn sôi trong 5 phút. Rễ lúa sau khi nhuộm được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi Olympus SZ61 (Olympus, Nhật Bản).

#### Tách chiết và tinh sạch RNA tổng số từ rễ mầm lúa

Sau khi xử lý với dung dịch As(III), khoảng 1 cm đỉnh rễ cây mầm lúa 7 ngày tuổi được thu nhận và bảo quản trong nitor lỏng để tách chiết RNA. Khoảng 0,1 g mẫu rễ được nghiền 3 lần trong nitor lỏng bằng cối chày sứ, mỗi lần 1 phút. RNA tổng số trong rễ lúa được tách chiết bằng bộ Kit tách chiết GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) theo quy trình của nhà sản xuất. Sau khi tách chiết, dung dịch RNA được xử lý với DNase I (Promega, Hoa Kỳ) để loại bỏ hoàn toàn DNA

tạp nhiễm. Dung dịch RNA tổng số tiếp tục được tinh sạch bằng bộ Kit tinh sạch GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Nồng độ và độ tinh khiết của RNA được xác định bằng máy quang phổ Biophotometer Plus (Eppendorf, Hoa Kỳ) với  $\mu$ Cuvette™ G1.0 (Eppendorf, Hoa Kỳ). Mẫu RNA có nồng độ 2  $\mu$ g/ $\mu$ l, với  $OD_{260/280}$  và  $OD_{260/230} > 2$  được sử dụng cho các thí nghiệm xác định sự biểu hiện gen bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng.

#### Phân tích cường độ biểu hiện gen bằng RT-PCR bán định lượng

Sự biểu hiện của một số gen trong rễ lúa đáp ứng với tác động của stress As được phân tích bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng trên máy Eppendorf Mastercycler nexus (Eppendorf,

Hoa Kỳ) với chu kỳ nhiệt theo trình tự: biến tính mạch ban đầu tại 94°C trong 2 phút; lặp lại 30 chu kỳ nhiệt (94°C trong 30 giây, 50-55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây); hoàn tất kéo dài mạch tại 72°C trong 10 phút. Những cặp mồi sử dụng trong các phản ứng PCR bán định lượng được liệt kê trong bảng 1. Trình tự nucleotide của các gen phân tích trong nghiên cứu này được lấy từ cơ sở dữ liệu của dự án quốc tế giải mã gen lúa (The rice annotation project database, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Gen mã hóa cho protein  $\alpha$ -tubulin (*Os03g0726100*) được sử dụng làm gen đối chứng để kiểm chứng sự cân bằng của hàm lượng cDNA trong phản ứng PCR. Kích thước sản phẩm của các phản ứng PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 2%. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập.

Bảng 1. Trình tự các mồi của phản ứng RT-PCR bán định lượng

Tên gen	Loại mồi	Trình tự mồi
<i>CRK</i>	Xuôi	5'-ATTCCAGGAACAGCTCCAAG-3'
( <i>Os07g0535800</i> )	Ngược	5'-GTGGTGATGGTGACGTCGTT-3'
<i>WAK</i>	Xuôi	5'-CAACTTCACCTACGACGTGTC-3'
( <i>Os09g0561600</i> )	Ngược	5'-CTTGCACTCGTCGATGTCTTG-3'
<i>MAPKKK</i>	Xuôi	5'-CAACATAGTGATCGGTGTCGA-3'
( <i>Os01g0699100</i> )	Ngược	5'-GCTTGGATATCGCCACCAATT-3'
<i>MAPK</i>	Xuôi	5'-GAACAAGTTCGAGGTGACGAAC-3'
( <i>Os03g0285800</i> )	Ngược	5'-ACTTCCTCGCGTCCTCGTTC-3'
<i>OsWRKY</i>	Xuôi	5'-AAGAGCAGCAAGTGGTCGAGT-3'
( <i>Os05g0343400</i> )	Ngược	5'-CGTGCACTTGTAAGTAGCTCCT-3'
<i>AP2/ERF</i>	Xuôi	5'-AGAGCAGCTACGGTGGAGAA-3'
( <i>Os01g0797600</i> )	Ngược	5'-GCGGTGCAAGCTTCATCATA-3'
<i>OsNCED</i>	Xuôi	5'-AACCAATGGCAAGATCAAGCA-3'
( <i>Os07g0154100</i> )	Ngược	5'-TTCCAGAGGTGGAAGCAGAA-3'
<i>Peroxidase</i>	Xuôi	5'-TCATCCGTATCTTCTCCAC-3'
( <i>Os04g0688300</i> )	Ngược	5'-AGCGCTATGTAGTAGCCGTT-3'
<i>Catalase</i>	Xuôi	5'-TTCTGGAGGACTACCACCT-3'
( <i>Os03g0131200</i> )	Ngược	5'-TCCGAGAAGAAGTTGTCGATG-3'
<i>Cyclin</i>	Xuôi	5'-ACGTGTTGAGGACAAGAC-3'
( <i>Os09g0111100</i> )	Ngược	5'-AGCTGTGCGAGCTGAAGCA-3'
<i><math>\alpha</math>-Tubulin</i>	Xuôi	5'-TCGCAGCATCAACCCAATC-3'
( <i>Os03g0726100</i> )	Ngược	5'-GCAACCAGTCCTCACCTCAT-3'

#### Tách chiết protein tổng số từ rễ mầm lúa

Rễ cây mầm lúa sau khi xử lý stress As được thu nhận để tách chiết protein tổng số theo phương pháp được mô tả bởi Yeh et al. (2007)

[48] với một vài điều chỉnh. Khoảng 1 cm đỉnh rễ của 30 cây mầm lúa được nghiền thành bột mịn trong nitor lỏng và hoà vào dung dịch đệm tách chứa 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 250 mM sucrose, 10 mM sodium fluoride, 10 mM

$\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM sodium-tartrate, 10% (v/v) glycerol, 50 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. Dịch nghiền được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 30 phút ở  $4^\circ\text{C}$ . Sau ly tâm, phần dịch nổi chứa protein được thu nhận. Nồng độ protein được xác định theo phương pháp Lowry [22] với bộ Kit BioRad Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hoa Kỳ) và đo OD tại bước sóng 750 nm.

#### Xác định hoạt tính các isoenzyme kháng oxy hóa

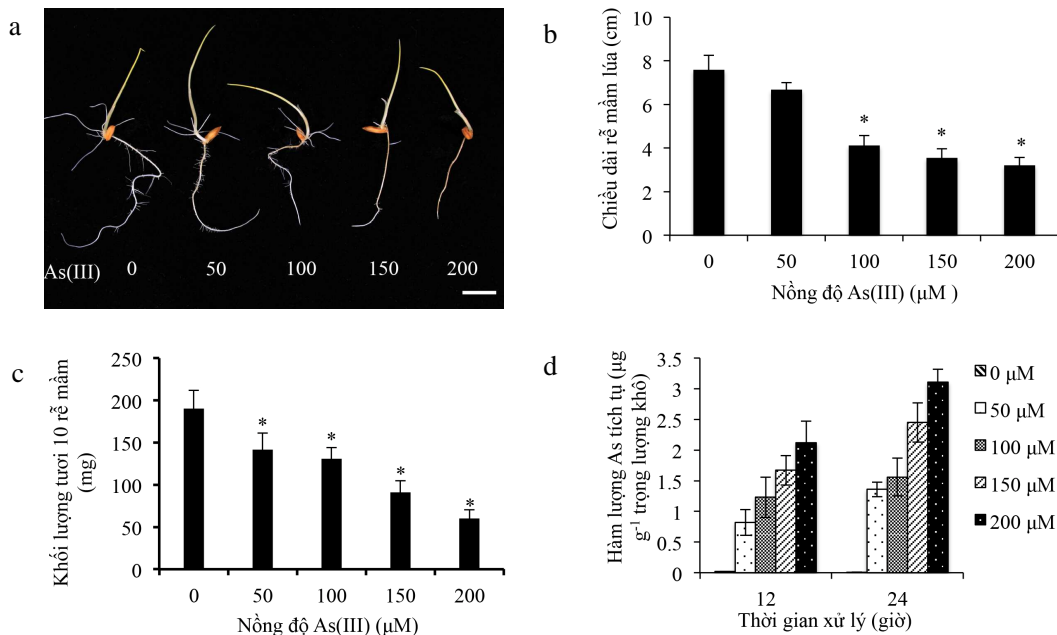
Dịch protein tổng số thu nhận từ rễ lúa chứa 10  $\mu\text{g}$  protein được phân tách bằng điện di trên gel polyarylamide không biến tính (NativePAGE) 2 lớp (lớp gel tập trung có nồng độ 4,5% và gel phân tách có nồng độ 10%) tại điện áp 100 V trong 2,5 giờ ở  $4^\circ\text{C}$ . Hoạt tính các isoenzyme của enzyme SOD, CAT và POD trên gel được phân tích và quan sát như mô tả của Wang & Yang (2005) [46]. Coomassie blue gel dùng để kiểm chứng sự cân bằng hàm lượng protein trong gel giữa các công thức.

#### Phân tích hàm lượng acid amin proline

Hàm lượng proline trong rễ lúa được xác định theo phương pháp của Bates et al. (1973) [4]. Rễ lúa (0,5 g) thu nhận từ cây mầm lúa sau khi xử lý với As(III) ở các nồng độ khác nhau được nghiền đều trong 1 ml acid sulfosalicylic 3% (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) và được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút tại  $4^\circ\text{C}$ . Dịch nổi thu nhận được bổ sung 0,2 ml ninhydrin (0,31 g ninhydrin, 7,5 ml acid acetic và 5 ml acid phosphoric 6M), 0,2 ml acid acetic 95% (v/v) và 0,1 ml acid sulfosalicylic 3%. Sau khi đun sôi cách thủy 1 giờ, hỗn hợp được bổ sung 1 ml toluene và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở  $4^\circ\text{C}$ . Pha toluene được đo độ hấp thụ tại bước sóng 520 nm trong một cuvette thạch anh. Nồng độ proline được xác định dựa vào đường chuẩn proline.

#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Ảnh hưởng của stress As đến sự sinh trưởng và sự tích tụ As của rễ lúa



Hình 1. Ảnh hưởng của stress As đến sự sinh trưởng của cây mầm lúa.

(a) Sự sinh trưởng của cây mầm lúa bị ức chế bởi As(III) tại các nồng độ 0, 50, 100, 150 và 200  $\mu\text{M}$ ; (b) và (c) Ảnh hưởng của xử lý As(III) đến chiều dài và khối lượng tươi rễ mầm lúa; (d). Hàm lượng As tích tụ trong rễ mầm lúa tại các nồng độ As(III) và thời gian xử lý khác nhau; \*khác biệt có ý nghĩa tại mức  $p < 0,05$ . Thanh ngang: 1 cm.

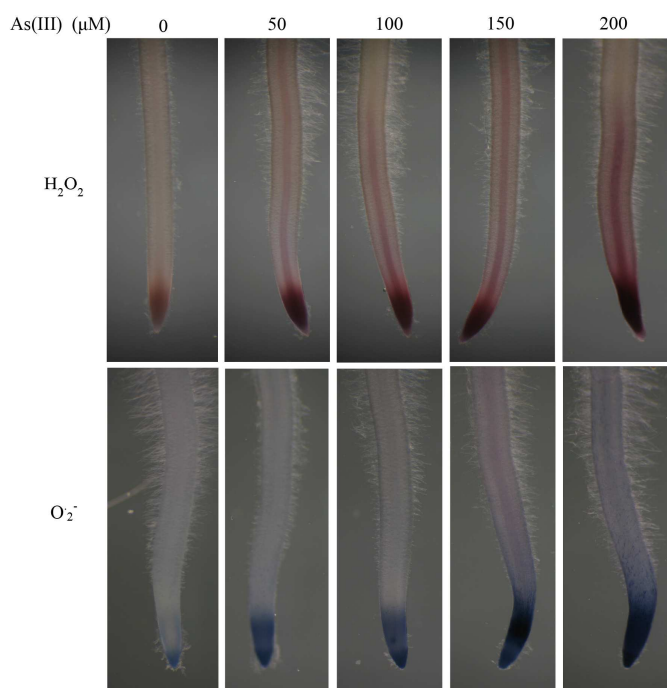
Ảnh hưởng của As đến sự sinh trưởng của rễ cây mầm lúa được đánh giá thông qua phân tích phụ thuộc nồng độ. Sau 3 ngày xử lý As(III) ở các nồng độ 0, 50, 100, 150 và 200  $\mu\text{M}$ , chiều dài và khối lượng tươi của rễ cây mầm lúa được xác định. So sánh với mẫu đối chứng (nước cất), sự sinh trưởng rễ cây mầm lúa xử lý với dung dịch As(III) 100  $\mu\text{M}$  giảm rõ rệt. Chiều dài và khối lượng tươi của rễ tại nồng độ này chỉ bằng khoảng 50% so với đối chứng. Tại nồng độ 150 và 200  $\mu\text{M}$  As(III), rễ lúa hầu như ngừng tăng trưởng (hình 1a, 1b và 1c).

Phân tích As trong rễ mầm lúa cho thấy có sự tương quan giữa hàm lượng As tích tụ và nồng độ As của dung dịch xử lý cũng như thời gian xử lý. Ở cùng thời gian ủ (12 hay 24 giờ), hàm lượng As tích tụ trong rễ lúa tăng dần theo sự tăng của nồng độ dung dịch As(III) xử lý. So sánh giữa 2 thời gian ủ 12 và 24 giờ, tại cùng nồng độ xử lý, thời gian kéo dài sẽ làm tăng hàm lượng As tích tụ trong rễ lúa (hình 1d).

Như vậy, sự sinh trưởng của cây mầm lúa bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi As. Đồng thời, có sự tích lũy mạnh As vào trong rễ cây mầm theo thời gian và theo nồng độ As bên ngoài.

#### As cảm ứng sự sản sinh ROS trong rễ lúa

Gốc tự do  $\text{H}_2\text{O}_2$  và  $\text{O}_2^-$  sản sinh trong rễ lúa dưới tác động của As được xác định bằng DAB và NBT, theo tuần tự. DAB bị oxy hóa bởi  $\text{H}_2\text{O}_2$  tạo sản phẩm có màu nâu tối [40]. NBT bị khử bởi  $\text{O}_2^-$  tạo sản phẩm formazan xanh lục [30]. Rễ lúa sau khi xử lý với dung dịch As(III) 100  $\mu\text{M}$  trong 3 giờ được xử lý với DAB hoặc NBT. Quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, cường độ màu nâu tối-biểu thị lượng  $\text{H}_2\text{O}_2$ , và màu xanh lục-biểu thị lượng  $\text{O}_2^-$ , gia tăng rõ rệt trong rễ theo sự tăng của nồng độ dung dịch As(III) xử lý (hình 2). Ở mẫu đối chứng, cường độ các màu hầu như không đáng kể. Sự sản sinh ROS tập trung nhiều ở vùng tăng trưởng nơi có cường độ biến dưỡng mạnh nhất. Như vậy, sự xử lý As đã cảm ứng sự sản sinh ROS trong rễ lúa.



Hình 2. Ảnh hưởng của stress As đến sự sản sinh ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$  và  $\text{O}_2^-$ ) trong rễ mầm lúa. Cường độ màu tăng biểu hiện sự gia tăng ROS tích tụ trong rễ

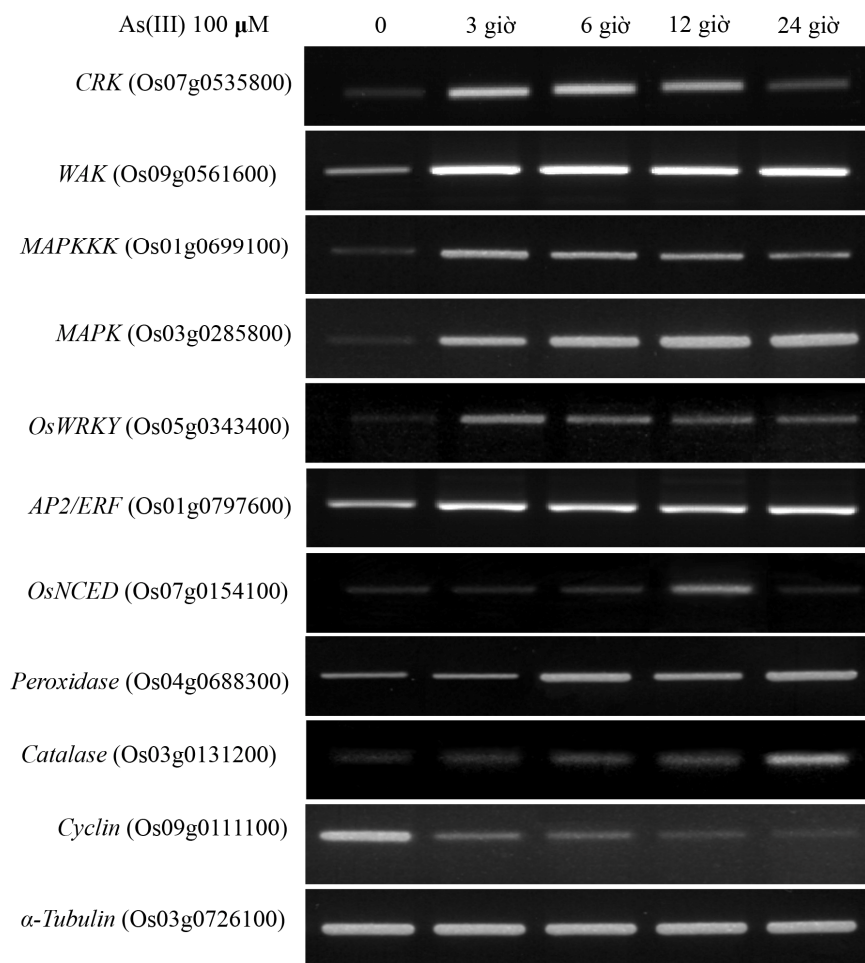
#### Sự biểu hiện gen đáp ứng với stress As ở rễ lúa

Để xác định có hay không stress As cảm ứng sự thay đổi mức độ biểu hiện gen trong rễ

lúa, một vài nhóm gen mã hóa cho các protein kinase trên màng tế bào (*CRK*, *WAK*), protein kinase của con đường truyền tín hiệu nội bào (*MAPKKK*, *MAPK*), các nhân tố phiên mã

(*OsWRKY*, *AP2/ERF*) và gen liên quan đến quá trình loại bỏ ROS (*catalase*, *peroxidase*), sinh tổng hợp acid abscisic (*OsNCED*), đến sự phân chia tế bào (*cyclin*) được phân tích bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng. Dưới tác động của As(III) 100  $\mu$ M, tất cả các gen phân tích đều cho thấy có sự gia tăng cường độ biểu hiện, ngoại trừ gen liên quan đến sự phân bào (hình 3). Các gen mã hóa protein kinase trên màng (*CRK*, *WAK*), protein kinase truyền tín hiệu nội bào (*MAPKKK*, *MAPK*) và nhân tố phiên mã (*OsWRKY*, *AP2/ERF*) thay đổi mức độ biểu

hiện rất sớm, chỉ 3 giờ sau khi xử lý stress As. Sự biểu hiện của các gen liên quan đến sinh tổng hợp auxin và loại bỏ ROS (*catalase*, *peroxidase*) được cảm ứng muộn hơn, 6-12 giờ dưới tác động của stress As. Trong suốt quá trình xử lý As, một vài gen như *CRK*, *MAPKKK*, *OsWWRKY* và *OsNCED* có khuynh hướng giảm cường độ biểu hiện ở thời điểm 24 giờ. Ở tất cả các thời điểm xử lý stress As, cường độ biểu hiện của gen *cyclin* đều cho thấy suy giảm so với đối chứng.



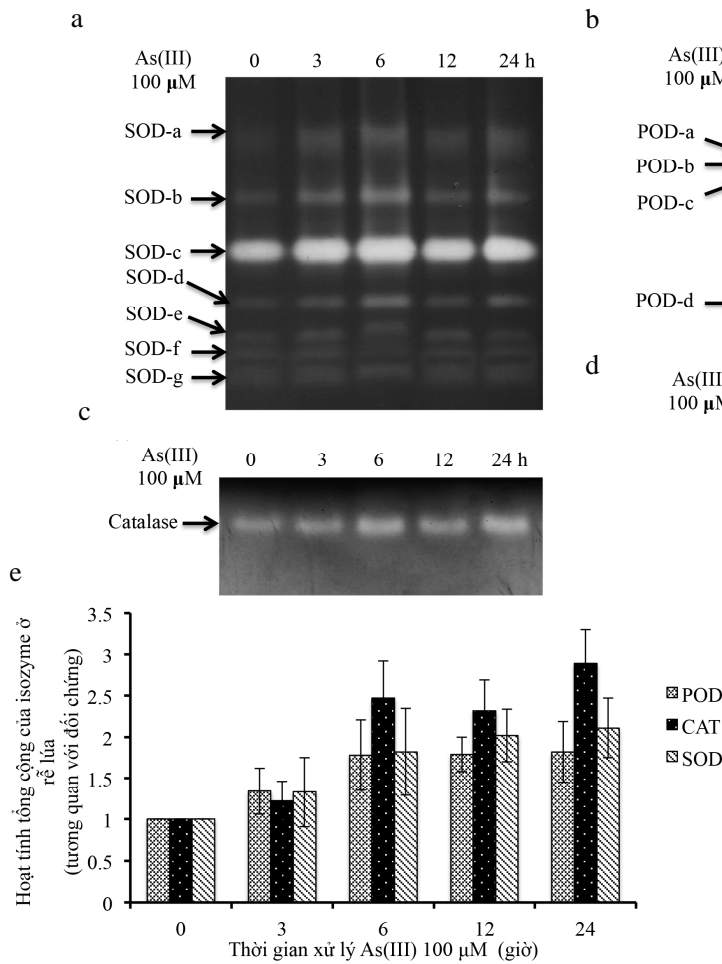
Hình 3. RT-PCR bán định lượng xác định mức độ biểu hiện của một số gen mã hóa protein kinase gắn màng (*CRK*, *WAK*), protein truyền tín hiệu nội bào (*MAPKKK*, *MAPK*), nhân tố phiên mã (*OsWRKY*, *AP2/ERF*), protein enzyme khử ROS (*peroxidase*, *catalase*), hormone acid abscisic (*OsNCED*) và gen hoạt hóa phân chia tế bào (*cyclin*) ở rễ lúa dưới điều kiện stress As tại các thời điểm 0, 3, 6, 12 và 24 giờ. Gen  *$\alpha$ -Tubulin* xác nhận sự cân bằng hàm lượng cDNA trong các phản ứng PCR.



**Stress As hoạt hóa các isozyme kháng oxy hóa ở rễ lúa**

Hoạt tính của một số enzyme có vai trò kháng oxy hóa do ROS, bao gồm SOD, catalase và POD, sản sinh dưới tác động của stress As được xác định bằng kỹ thuật phân tích hoạt tính enzyme trên gel không biến tính (NativePAGE). Rễ lúa xử lý với dung dịch As(III) 100  $\mu$ M cho thấy có sự xuất hiện của 7 loại SOD đồng dạng đặc trưng (hình 4a). Hoạt tính của tất cả các isozyme SOD đồng loạt gia tăng chỉ sau 3 giờ xử lý với stress As. Trong sự đáp ứng với tác động của As, có 4 đồng dạng của POD được xác định trong rễ lúa. Hoạt tính của POD-a, -b và -c

tăng dần so với đối chứng bắt đầu từ thời điểm 6 giờ, tuy nhiên, hoạt tính của POD-d cao hơn đối chứng tại thời điểm 3 giờ và duy trì đến thời 24 giờ của quá trình khảo sát (hình 4b). Đối với enzyme CAT, chỉ có 1 isozyme được xác định trên gel (hình 4c). Hoạt tính của CAT thay đổi không đáng kể so với đối chứng tại thời điểm 3 giờ nhưng tăng mạnh tại thời điểm 6 và 24 giờ dưới stress As. Phân tích tương quan hoạt tính của các enzyme giữa rễ lúa xử lý với As so với đối chứng cho thấy, hoạt tính tổng cộng của các isozyme của ba enzyme POD, CAT và POD tăng nhanh bắt đầu từ thời điểm 6 giờ và tiếp tục tăng đến 24 giờ (hình 4e).



**Hình 4.** Ảnh hưởng của stress As đến hoạt tính các isozyme kháng oxy hóa ở rễ cây mầm lúa

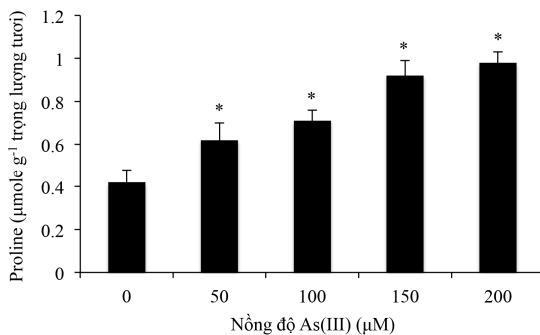
a. Isozyme superoxide dismutase (SOD); b. Isozyme catalase (CAT); c. Isozyme peroxidase (POD); d. Gel Coomassie blue xác định sự cân bằng hàm lượng protein giữa các công thức xử lý; e. Tương quan hoạt tính tổng cộng của isozyme ở rễ lúa xử lý As(III) so với đối chứng không xử lý As(II) (hoạt tính = 1).

**Acid amin proline sinh tổng hợp mạnh dưới stress As**

Acid amin proline được chứng minh có vai

trò trong sự đề kháng của thực vật với stress kim loại nặng [35]. Trong nghiên cứu này, sự sinh tổng hợp proline trong rễ lúa xử lý với As

được xác định, sử dụng phương pháp hiện màu với thuốc thử ninhydrine. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự gia tăng hàm lượng proline trong rễ lúa tại tất cả các nồng độ As xử lý so với đối chứng (hình 5). Hàm lượng proline tăng dần theo sự tăng của nồng độ dung dịch As. Tại nồng độ As 150  $\mu\text{M}$ , lượng proline trong rễ lúa cao gấp đôi so với đối chứng. Như vậy, trong sự đề kháng với stress As của rễ lúa, proline có thể giữ một vai trò quan trọng.



Hình 5. Sự tích tụ acid amin proline trong rễ mầm lúa dưới tác động của stress As ở các nồng độ khác nhau. \* khác biệt có ý nghĩa tại mức  $p < 0,05$ .

## THẢO LUẬN

Arsenic ở khắp nơi trong nước ngầm, trong đất canh tác thường có nguồn gốc từ tự nhiên và từ các hoạt động của con người như luyện kim, khai thác khoáng sản [24]. Arsenic tích tụ trong cây trồng, đặc biệt trong lúa gạo, thường ở dạng As vô cơ [As(III), As (V)] hoặc hữu cơ (acid dimethylarsinic). Độc tính của As phụ thuộc vào dạng của nó, trong đó As(III) > As(V) > As hữu cơ [43]. Ảnh hưởng của As đối với sự sinh trưởng của cây trồng đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu trên các đối tượng cây trồng khác nhau [16, 21, 27, 38]. Trong nghiên cứu này, sự suy giảm sinh trưởng của rễ cây mầm lúa dưới tác động của As(III) đã được xác định. Hơn nữa, phân tích ICP-MS đã cho thấy hàm lượng As tích tụ trong rễ mầm lúa tăng mạnh theo sự gia tăng nồng độ dung dịch As (III) và thời gian xử lý. Ma et al. (2008) [23], Meharg & Hartley-Whitaker (2002) [24], và Tripathi et al. (2007) [42] đã xác định các phosphate transporter và đặc biệt hai transporter,

OsNIP2;1 và OsNIP2;2, đóng vai trò chính trong quá trình hấp thu chủ động As từ môi trường và tích lũy chúng trong tế bào rễ và chồi thực vật. Như vậy, quá trình sinh trưởng của rễ mầm lúa dưới stress As bị giảm sút do sự gia tăng tích lũy của As gây độc cho tế bào.

Tăng cường sự sinh tổng hợp các ROS là một trong những đáp ứng chính của thực vật với các stress môi trường, nhất là đối với các kim loại nặng như Cu, Cr, Cd, Hg, As [19, 20, 41, 48]. ROS sản sinh trong tế bào thực vật chủ yếu tại lưới nội chất, peroxisome, ty thể, lục lạp và NADPH oxidase trên màng nguyên sinh chất [31]. Trong tế bào, ROS giữ hai vai trò đồng thời. Khi tích lũy ở nồng độ cao, ROS tác dụng peroxide hóa lipid gây hư hỏng màng tế bào. ROS còn phá hủy cấu trúc protein, làm ảnh hưởng mạnh đến quá trình trao đổi chất [9, 12]. Ngược lại, ở nồng độ thấp, ROS hoạt động như những tín hiệu nội bào cảm ứng sự biểu hiện của các gen kháng oxy hóa và các hệ thống đề kháng stress môi trường ở thực vật [26, 28, 44].

Trong nghiên cứu này, dùng chất chỉ thị DAB và NBT đã cho thấy As kích thích sự sản sinh mạnh các ROS là  $\text{H}_2\text{O}_2$  và  $\text{O}_2^-$  ở rễ mầm lúa. Tham gia vào sự chuyển hóa và loại bỏ ROS khi tích tụ với lượng lớn giúp bảo vệ thực vật chống lại stress oxy hóa có vai trò quan trọng của phức hệ enzyme kháng oxy hóa [45]. Phân tích RT-PCR bán định lượng cho thấy 2 gen mã hóa cho các enzyme kháng oxy hóa, bao gồm *peroxidase* và *catalase*, gia tăng mức độ biểu hiện dưới tác động của stress As. Các enzyme kháng oxy hóa (SOD, CAT, POD) được nhìn nhận là một hệ thống đề kháng quan trọng của thực vật giúp chống lại stress oxy hóa gây ra bởi kim loại nặng [14]. Dùng kỹ thuật phân tích enzyme trên gel cho thấy hoạt độ của 3 isozyme SOD, CAT và POD trong rễ lúa đã gia tăng rõ rệt dưới tác động khi xử lý stress As. Góp phần vào cơ chế đề kháng với stress kim loại nặng còn có vai trò của proline. Acid amin proline được chứng minh là yếu tố loại bỏ gốc tự do và ổn định thế oxy hóa khử của tế bào trong điều kiện stress [33, 35]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy hàm lượng proline của tế bào gia tăng mạnh theo sự gia tăng của nồng độ As(III) xử lý.



Sự tiếp nhận các tín hiệu stress môi trường tại màng tế bào và dẫn truyền các tín hiệu này trong tế bào có vai trò quan trọng của các protein kinase gắn màng và hệ thống truyền tín hiệu nhiều bậc MAPK (Mitogen-activated protein kinases) [2, 5, 25]. Trong nghiên cứu này, dưới tác động của As, hai gen mã hóa protein kinase gắn màng là *CRK* và *WAK* đã gia tăng mạnh cường độ biểu hiện. Hệ thống MAPK gồm 3 bậc protein kinase (MAPK kinase kinase-MAPKKK, MAPK kinase-MAPKK và MAPK) nhận tín hiệu từ bên ngoài và truyền vào trong nhân tế bào hoặc các bào quan đích giúp kích hoạt các gen chức năng thông qua hoạt động trung gian của các nhân tố phiên mã. Ở lúa, có tất cả 74 *MAPKKK*, 8 *MAPKK* và 17 *MAPK* gen [47] trong hệ thống nhiều bậc MAPK. Phân tích RT-PCR đã cho thấy, hai gen trong con đường này là *MAPKKK* (*Os01g0699100*) và *MAPK* (*Os03g0285800*) được hoạt hóa biểu hiện dưới điều kiện stress As.

Acid abscisic (ABA) là một hormone thực vật có vai trò ức chế mạnh sự sinh trưởng ở thực vật. Sự gia tăng hàm lượng ABA trong mô thực vật dưới các điều kiện stress lạnh, muối và stress nước đã được chứng minh [8]. Ở nghiên cứu hiện tại, dưới tác động của stress As, mức độ biểu hiện của gen có vai trò sinh tổng hợp acid abscisic (*OsNCED*) được cảm ứng gia tăng. Bên cạnh đó gen có chức năng hoạt hóa phân chia tế bào là *cyclin* bị giảm biểu hiện khi xử lý rễ lúa với As. Như vậy, sự gia tăng biểu hiện của gen tổng hợp acid abscisic và giảm mức biểu hiện của gen phân chia tế bào có thể có liên quan trọng sự ức chế sinh trưởng của rễ lúa dưới stress As.

Sự điều hòa tại mức độ phiên mã của các gen chức năng là một trong những cơ chế điều khiển quan trọng của toàn bộ các quá trình sinh học tế bào, trong đó các nhân tố phiên mã giữ vai trò chủ đạo [36]. Tương tác với yếu tố cis (cis-elements) trong vùng promoter của gen tương ứng, nhân tố phiên mã giúp gia tăng sự biểu hiện của những gen đích này. WRKY và AP2/ERF là hai nhân tố phiên mã giữ vai trò quan trọng trong sự điều hòa biểu hiện các gen đáp ứng với các stress môi trường ở thực vật [11, 18]. Trong nghiên cứu này, hai gen *OsWRKY* và *AP2/ERF* gia tăng cường độ biểu

hiện dưới tác động của stress As.

## KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu của chúng tôi đã xác định chức năng quan trọng của hệ thống các enzyme kháng oxy hóa và acid amin proline trong sự đề kháng với stress As. Sự hoạt hóa các gen mã hóa nhân tố phiên mã và các gen chức năng của con đường truyền tín hiệu nội bào có thể đóng vai trò thiết yếu giúp thực vật đáp ứng nhanh với độc tố As trong môi trường. Những phát hiện này góp phần vào chiến lược cải thiện đặc điểm di truyền của lúa nhằm giảm thiểu ảnh hưởng của As trong canh tác.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả bày tỏ sự cảm ơn sâu sắc đến GS Huang Hao-Jen, khoa Khoa học Sự sống, Đại học Quốc gia Cheng Kung, Đài Loan đã khuyến khích và ủng hộ nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abedin M. J., Meharg A. A., 2002. Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil*, 243: 57-66.
2. Agrawal G. K., Iwahashi H., Rakwal R., 2003. Rice MAPKs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302: 171-180.
3. Alam M. B., Sattar M. A., 2000. Assessment of arsenic contamination in soils and waters in some areas of Bangladesh. *Water Science and Technology*, 42: 185-192.
4. Bates L. R., Waldren R. P., Teare I. D., 1973. A rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
5. Becraft P. W., 2002. Receptor kinase signaling in plant development. *Annual review of cell and developmental biology*, 18: 163-192.
6. Bhattacharjee Y., 2007. A sluggish response to humanity's biggest mass poisoning. *Science*, 315: 1659-1661.
7. Bleeker P. M., Hakvoort H. W. J., Blik M.,

- Souer E., Schat H., 2006 Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate tolerant *Holcus lanatus*. *Plant journal*, 45: 917-929.
8. Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H., 2014. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances*, 32(1): 40-52.
  9. Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., van Montagu M., Inze D., van Breusegem F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and molecular life sciences*, 57: 779-795.
  10. Del Razo L. M., Quintanilla-Vega B., Brambila-Colombres E., Calderon-Aranda E. S., Manno M., Albores A., 2001. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicology and applied pharmacology*, 177: 132-148.
  11. Eulgem T., Somssich I. E., 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 366-371.
  12. Foreman J., Bothwell J.H., Demidchik V., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones D. G., Davies J. M., Dolan L., 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442-446.
  13. Geen A., Bostick B. C., Pham T. K. T., Vi M. L., Nguyen N. M., Phu M. P., Pham H. V., Radloff K., Aziz Z., Mey J. L., Stahl M. O., Harvey C. F., Oates P., Weinman B., Stengel C., Frei F., Kipfer R., Berg M., 2013. Retardation of arsenic transport through a Pleistocene aquifer. *Nature*, 501: 204-207.
  14. Gupta M., Ahmad M. A., 2014. Arsenate induced differential response in rice genotypes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107: 46-54.
  15. Hartley-Whitaker J., Ainsworth G., Meharg A. A., 2001a. Copper and arsenate induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell and Environment*, 24: 713-722.
  16. Hartley-Whitaker J., Ainsworth G., Vooijs R., Ten Bookum W., Schat H., Meharg A. A., 2001b. Phytochelatin are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiology*, 126: 299-306.
  17. Hindmarsh J. T., 2000. Arsenic, its clinical and environmental significance. *The Journal of trace elements in experimental medicine*, 13: 165-172.
  18. Hinz M., Wilson I. W., Yang J., Buerstenbinder K., Llewellyn D., Dennis E.S., Sauter M., Dolferus R., 2010. Arabidopsis RAP2.2: An ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiology*, 153: 757-772.
  19. Heyno E., Klose C., Krieger-Liszky A., 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytologist*, 179: 687-699.
  20. Lin C. Y., Trinh N. N., Fu S. F., Hsiung Y. C., Chia L. C., Lin C. W., Huang H. J., 2013. Comparison of early transcriptome responses to copper and cadmium in rice roots. *Plant Molecular Biology*, 81: 507-522.
  21. Liu X., Zhang S., Shan X., Zhu Y.G., 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amyolytic activity of wheat. *Chemosphere*, 61: 293-301.
  22. Lowry O., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1): 265-275.
  23. Ma J. F., Yamaji N., Mitani N., Xu X. Y., Su Y. H., McGrath S. P., Zhao F. J., 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29): 9931-9935.

24. Meharg A. A., Hartley-Whitaker J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, 154: 29-43.
25. Mira H., Martínez N., Peñarrubia L., 2002. Expression of a vegetative-storage-protein gene from *Arabidopsis* is regulated by copper, senescence and ozone. *Planta*, 214: 939-946.
26. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. Reactive oxygen gene network of plant. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498.
27. Mokgalaka-Matlala N. S., Flores-Tavizón E., Castillo-Michel H., Peralta-Videa J. R., Gardea-Torresdey J. L., 2009. Arsenic tolerance in mesquite (*Prosopis* sp.): low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 822-826.
28. Mylona P. V., Polidoros A. N., 2010. ROS regulation and antioxidant genes, In: Gupta SD (ed) *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*, Science Publishers, USA pp. 101-127.
29. Nordstrom D. K., 2002. Public health-Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science*, 296: 2143-2145.
30. Ogawa K., Kanematsu S., Asada K., 1997. Generation of Superoxide Anion and Localization of CuZn-Superoxide Dismutase in the Vascular Tissue of Spinach Hypocotyls: Their Association with Lignification. *Plant Cell Physiology*, 38(10): 1118-1126.
31. Pérez-Pérez M. E., Lemaire S. D., Crespo J. L., 2012. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiology*, 160(1): 156-164.
32. Raab A., Schat H., Meharg A. A., Feldmann J., 2005. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytologist*, 168: 551-558.
33. Rai V. K., 2002. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum*, 45:481-487.
34. Rosen B. P., Liu Z., 2009. Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environment International*, 35: 512-515.
35. Sharma S. S., Dietz K. J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metals stress. *Journal of experimental botany*, 57: 711-726.
36. Sharma M., Kumar R., Solanke A., Sharma R., Tyagi A., Sharma A., 2010. Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 284: 455-475.
37. Smith E., Juhasz A. L., Weber J., Naidu R., 2008. Arsenic uptake and speciation in rice plants grow under green house conditions with arsenic contaminated irrigation water. *Science of the total environment*, 392: 277-283.
38. Sneller E. F. C., VanHeerwaarden L. M., Kraaijeveld-Smit F. J. L., TenBookum W. M., 1999. Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatin. *New Phytologist*, 144: 223-232.
39. Stone R., 2008. Arsenic and paddy rice: a neglected cancer risk. *Science*, 321: 184-185.
40. Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D. B., 1997. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant journal*, 11(6):1187-94.
41. Trinh N. N., Huang T. L., Chi W. C., Fu S. F., Chen C. C., Huang H. J., 2014. Chromium stress response effect on signal transduction and expression of signaling genes in rice. *Physiologia Plantarum*, 150: 205-224.
42. Tripathi R. D., Tripathi R. D., Srivastava S.,

- Mishra S., Singh N., Tuli R., Gupta D. K., Maathuis F. J. M., 2007. Arsenic hazards: Strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology*, 25: 158-165.
43. Tuli, R., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Tripathi, R.D., 2010. Recent advances in arsenic accumulation and metabolism in rice. *Molecular Breeding*, 26: 307-323.
44. Vanderauwera S., Zimmermann P., Rombauts S., Vandenabeele S., Langebartels C., Ghuysse W., Inzé D., Van Breusegem F., 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, 139(2): 806-821.
45. Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F., 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany*, 53(372): 1227-1236.
46. Wang Y. S., Yang Z. M., 2005. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology*, 46: 1915-1923.
47. Yang Z., Ma H., Hong H., Yao W., Xie W., Xiao J., Li X., Wang S., 2015. Transcriptome-based analysis of mitogen-activated protein kinase cascades in the rice response to *Xanthomonas oryzae* infection. *Rice*, 8: 4.
48. Yeh C. M., Chien P. S., Huang H. J., 2007. Distinct signaling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of experimental botany*, 58: 659-671.

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RESPONSE TO ARSENIC IN RICE (*Oryza sativa* L.)

Trinh Ngoc Nam<sup>1</sup>, Le Hong Thia<sup>2</sup>, Nguyen Vuong Tuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of HoChiMinh City

<sup>2</sup>Institute for Environmental Science, Engineering and Management, Industrial University of HoChiMinh City

### SUMMARY

Arsenic (As) is classified as one of toxic metalloids, that directly affects to most plants. Moreover, As is also a human carcinogen due to drinking As-contaminated groundwater or eating plant food including rice cultivated in polluted areas. The effect of As on rice growth was established, but the precised mechanism of rice response to As remains to be elucidated. This study investigated the biochemical and molecular changes in roots of rice seedlings under As stress. A 100 mM As(III) solution strongly inhibited the growth and induced reactive oxygen species (ROS) production in rice roots. Using ICP-MS, we found As content in rice roots increased with increasing concentration of As solution treatment. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that several genes as ROS-related, protein kinase-related, signal transduction-related, transcription factor-related and auxin synthesis-related genes were up-regulated during As stress. However, cell cytokinesis-related gene was down-regulated. Polyacrylamide gel electrophoresis and activity-gel assay showed that enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) were strongly induced under As stress, as an antioxidant defense system. In addition, the contrileuted to elucidating increase of proline content, function as radical scavenger and cellular redox potential buffer, was found in As treated rice roots. Our findings more or less on the biochemical and molecular mechanism in response to As stress in plants.

**Keywords:** *Oryza sativa*, arsenite, proline, reactive oxygen species, semi-quantitative RT-PCR.

Ngày nhận bài: 15-11-2014