

SÀNG LỌC NHỮNG ĐỘT BIẾN CỦA *ARABIDOPSIS THALIANA* MANG ĐOẠN T-ADN CÓ KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU ARSENIC

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG

Viện Công nghệ sinh học

ROSS MCC LILLEY, REN ZHANG

Trường đại học Tổng hợp Wollongong, N.S.W., Ôxtrâyliá

Các dòng đột biến mang đoạn T-ADN có thể được tạo ra bằng cách chuyển một đoạn T-ADN (trans ADN) có độ dài 25 Kb vào bộ gen của *Arabidopsis thaliana*. Các đoạn T-ADN này được thiết kế rồi đưa vào các plasmit cảm ứng tạo u (tumour inducing plasmit - Ti plasmit) trong vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Đoạn T-ADN được chuyển vào bộ gen của *Arabidopsis* bằng phương pháp nuôi cấy mô hay gây nhiễm vi khuẩn vào hạt. Bằng cách này hơn 8000 dòng đột biến đã được tạo ra và hiện nay đang được lưu giữ tại trung tâm nghiên cứu *Arabidopsis* ở Mỹ và Đức. Thông qua việc sàng lọc những đột biến quan tâm từ những dòng đột biến có sẵn này, có thể dễ dàng tách được gen đột biến nhờ vào đuôi T-ADN đã được đưa vào. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có công bố nào về các đột biến quan tâm được chọn ra từ quần thể đột biến này. Vì vậy, chúng tôi đã chọn hướng sàng lọc một lượng lớn các dòng đột biến này để tìm kiếm những đột biến có khả năng chống chịu arsenic. Bằng việc chọn lọc và phân tích các đột biến có khả năng tích lũy hoặc loại trừ arsenic, chúng tôi hy vọng sẽ xác định và tìm hiểu được đặc trưng của những gen chịu trách nhiệm cho tính chống chịu arsenic ở *A. thaliana*. Kết quả này sẽ góp phần vào việc tìm hiểu cơ chế di truyền và sinh lý của tính chống chịu arsenic nói riêng và kim loại nói chung ở thực vật bậc cao. Đây là hướng nghiên cứu hoàn toàn mới mẻ và đang được tiến hành rất mạnh mẽ trên thế giới [4, 6, 9].

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu thực vật

Hạt của các dòng đột biến có mang đoạn T-

ADN của *A. thaliana* nhận được từ Trung tâm lưu trữ hạt *Arabidopsis* ở Trường đại học Ohio, Mỹ. Các dòng đột biến này bắt nguồn từ kiểu hình Columbia và vì vậy *A. thaliana* kiểu hình Columbia dạng đại (*wt*) được dùng làm đối chứng.

Đột biến xử lý EMS (etyl metylsulfonat) của *Arabidopsis pho2* là quà tặng của Dr. Delhaize E. Đại học quốc gia Ôxtrâyliá.

2. Phương pháp

Nghiên cứu sự nảy mầm của hạt được tiến hành theo phương pháp của Gilbeau và cs [3].

Hàm lượng Chlorophyll được xác định theo phương pháp của Porra và cs. [8].

Kỹ thuật vertical mesh transfer (VMT) dùng để sàng lọc các đột biến có khả năng chống chịu arsenic từ quần thể *Arabidopsis* mang đoạn T-ADN có sẵn, được cải tiến từ phương pháp của Murphey và Taize [7]. Hạt được gieo trên các lưới nylon phủ trên mặt các giá thể thủy tinh có kích thước (19×19 cm) rồi đặt theo hướng thẳng đứng vào bình sắc ký có môi trường dinh dưỡng chứa arsenic 5 ppm. Mỗi một hệ thống VMT có thể chứa nhiều giá thể như vậy. Sau khi ủ 72 giờ, các lưới nylon được chuyển sang giá thể mới đồng thời cũng quay lưới một góc 90° so với ban đầu. Sau 36 giờ ủ tiếp theo, lại tiến hành các bước chuyển giá thể và quay lưới nylon tương tự. Sau 36 giờ ủ tiếp tục, sẽ tiến hành đánh giá độ chống chịu của các cây nảy mầm thông qua việc xem xét phản ứng của rễ đối với arsenic trong môi trường nuôi khi quay lưới nylon 90° hai lần. Những cây con có rễ dài khoảng 2 mm và hình thành 2 góc quay 90° được xem là có khả năng

chống chịu với arsenic. Những cây có rễ hình thành 2 góc quay 90° nhưng độ dài rễ chỉ đạt dưới 1 mm được xem là những cây chống chịu kém. Các cây con có rễ chỉ hình thành 1 góc quay 90° được xem là những cá thể nhạy cảm với arsenic. Chỉ những cây này mầm có khả năng chống chịu arsenic được tách khỏi lưới và ngâm trong dung dịch dinh dưỡng. Sau đó được chuyển sang trồng trong các chậu chứa đất nhân tạo và đặt trong phòng nuôi cấy để thu hạt dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Hàm lượng arsenic trong mẫu được xác định theo phương pháp của Allen [1].

Khả năng hấp thụ arsenic được xác định như sau: các cây đột biến và *wt* được trồng trong các cốc khử trùng có chứa agar 0,7%. Cây được trồng từ 12-14 ngày ở nhiệt độ 23°C với chu kỳ sáng/tối là 16/8 giờ (cường độ sáng của đèn chiếu Gro-lux là 100-150 mmolm⁻²s⁻¹ trong vùng sáng từ 400-700 nm). Một ngày trước khi làm thí nghiệm, các nắp hộp được mở ra để các cây con thích nghi với môi trường bên ngoài. Khi bắt đầu thí nghiệm, các cây con được lấy ra khỏi môi trường trồng, rửa sạch và đưa vào dung dịch đệm MES (axit 2-N-morpholinoethan sulphonic) có chứa As⁺⁵ 10 ppm trong 1 giờ. Các cây này sau đó lại được chuyển sang 20 ml dung dịch MES chứa 0,5 mCi/ml ⁷³As⁺⁵ và As⁺⁵ 10 ppm, sau đó để trong phòng nuôi cấy có chu kỳ sáng tối như trên. Sau 2 ngày, các cây này được rửa với dung dịch môi trường không chứa phóng xạ rồi làm khô trên giấy lọc. Mẫu này được hiện trong hộp Molecular Dynamics (22×27 cm) trong 16 giờ. Phân tích ảnh phóng xạ được tiến hành dùng STORM 860 phospho screen, ImageQuantTM với phần mềm phiên bản 1.1. Mức độ ⁷³As⁺⁵ trong thân của các mẫu phóng xạ được xác định bằng máy đếm tự động γ (Beckman wizard TM 1480).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Sàng lọc các đột biến mang đoạn T-ADN của *A. thaliana* có khả năng chống chịu arsenic

Sử dụng kỹ thuật VMT, chúng tôi đã sàng lọc được khoảng 100000 hạt M2 từ hơn 8000 dòng *A. thaliana* đột biến mang đoạn T-ADN bao gồm 265 dòng Koncz, 6500 dòng Feldmann

và 1300 dòng Thomas. Các hạt này được sàng lọc trong môi trường chứa As⁺⁵ 10 ppm. Kết quả cho thấy sự phát triển của phần lớn các đột biến này bị ức chế ngay từ giai đoạn đầu của quá trình nảy mầm và quá trình hình thành rễ cũng bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Trong số này, 33 cá thể từ 16 dòng Koncz, 32 cá thể từ 24 dòng Feldmann và 7 cá thể từ 6 dòng Thomas đã tỏ ra có khả năng chống chịu với As⁺⁵ và được chọn lọc để chuyển sang đất trồng tiếp. Hạt thu được từ các cây này sẽ tiếp tục được sàng lọc ở vòng sau. Do một số cây đã không thụ phấn, chỉ có 65 cá thể được sàng lọc lại. Kết quả là chỉ có 2 cá thể của dòng Koncz và 9 cá thể của dòng Feldmann tỏ ra có khả năng chống chịu As⁺⁵ 10 ppm. Hai đột biến của dòng Koncz gọi là *as1* và *as2* được chúng tôi chọn để tiếp tục nghiên cứu vì chúng thuộc những dòng đột biến tách biệt và được coi là những đột biến đồng nhất. Các đột biến khác đều phân ly và vì vậy cần phải sàng lọc tiếp.

2. Hình thái của các đột biến *as1* và *as2*

Các đặc tính hình thái của các đột biến *as1*, *as2* đã được so sánh với *wt* (hình 1). Đột biến *as1* có lá và thân to, dày hơn, màu xanh tối hơn, ra hoa muộn hơn so với *wt*. Trái lại, lá của *as2* lại có màu xanh nhạt hơn, ra hoa sớm hơn *wt*. Hàm lượng chlorophyll ở lá của 2 đột biến này và của dạng *wt* được trình bày trong bảng 1.

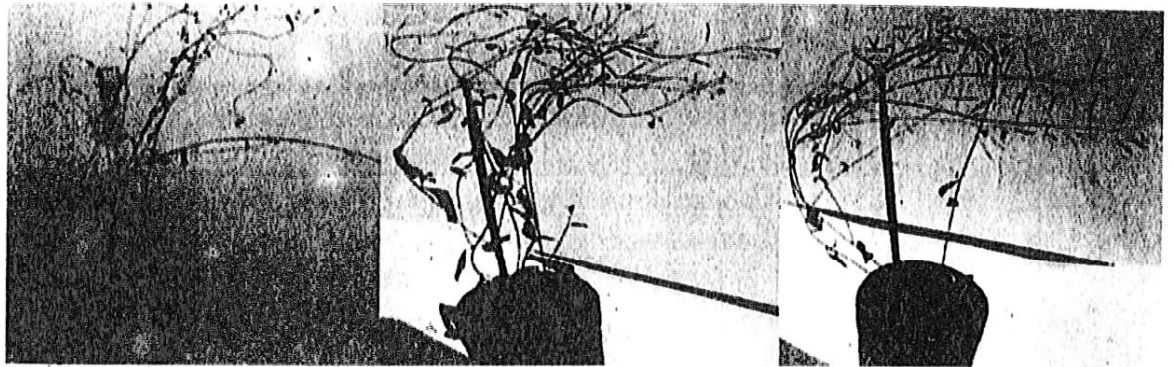
3. Ảnh hưởng của As⁺⁵ lên sự phát triển rễ của *as1* và *as2*

Hạt của *as1*, *as2* và *wt* được gieo trên giấy lọc tẩm môi trường dinh dưỡng có bổ sung As⁺⁵ 5 ppm. Kết quả cho thấy rễ của các đột biến này sau 5 ngày phát triển dài hơn so với rễ của *wt*, chứng tỏ chúng có khả năng chống chịu As⁺⁵ (bảng 2).

Bảng 1

Hàm lượng chlorophyll ở lá của *wt* và các đột biến *as1*, *as2*

Thực vật	Hàm lượng chlorophyll (µg/g)
<i>wt</i>	602,155±4,800
<i>as1</i>	675,130±18,038
<i>as2</i>	519,280±14,786



Hình 1. Hình thái của các đột biến chống chịu arsenic mang đoạn T-ADN *as1*, *as2* và dạng dại *wt* của *A. thaliana*

Chiều dài rễ của *wt* và các đột biến *as1*, *as2* sau 5 ngày mọc trên môi trường có chứa As^{+5} 5 ppm

Thực vật	Chiều dài rễ (cm)
<i>wt</i>	$0,646 \pm 0,008$
<i>as1</i>	$0,892 \pm 0,009$
<i>as2</i>	$0,730 \pm 0,008$

4. Tích lũy arsenic trong các đột biến *as1*, *as2*

Để kiểm tra xem các đột biến *as1*, *as2* là

Bảng 2

những đột biến tích lũy hay loại trừ arsenic, chúng tôi đã tiến hành phân tích hàm lượng chất này trong thân của cây 6 tuần tuổi trồng trên đất và trên môi trường thủy sinh có chứa As^{+5} 10 ppm. Các cây con được trồng trong môi trường bình thường trong 4 tuần, sau đó được tưới với As^{+5} 10 ppm cứ ba ngày một lần trong vòng 2 tuần. Các cây mọc trong môi trường thủy sinh có chứa As^{+5} 10 ppm nhưng không chứa photphat. Sau khi mọc được 2 tuần, thân các cây con đã có nhưng biểu hiện bị nhiễm độc arsenic. Số liệu bảng 3 cho thấy thân của các đột biến *as1*, *as2* có hàm lượng arsenic cao hơn đáng kể so với *wt*. Kết quả này gợi ý rằng *as1* và *as2* là những thực vật tích lũy arsenic.

Bảng 3

Hàm lượng arsenic trong thân của *wt* và các đột biến *as1*, *as2* sau 14 ngày trồng trên đất và trên môi trường thủy sinh có chứa As^{+5} 10 ppm

Môi trường	Thực vật	Hàm lượng arsenic ($\mu\text{g/g}$ trọng lượng khô)	% so với <i>wt</i>
Đất	<i>Wt</i>	$16,5 \pm 1,3$	100
	<i>as1</i>	$17,1 \pm 2,5$	104
	<i>as2</i>	$63,6 \pm 4,3$	386
Thủy sinh	<i>Wt</i>	$82,9 \pm 3,8$	100
	<i>as1</i>	$141,3 \pm 5,2$	171
	<i>as2</i>	$162,0 \pm 8,9$	195

5. Khả năng hấp thụ $^{73}As^{+5}$ của *as1*, *as2*

Cây đối chứng cùng các đột biến được trồng trên môi trường thủy sinh không có photphat hoặc agar có chứa $^{73}As^{+5}$ 500nCi. Ảnh phóng xạ nhận được (hình 2) cho thấy lá của các đột biến

có mức độ phóng xạ cao hơn lá của cây đối chứng. Kết quả đếm phóng xạ (bảng 4) chứng tỏ rằng hoạt tính phóng xạ của những bộ phận phía trên rễ của *as1* và *as2* cao hơn đáng kể so với *wt*. Kết quả này khẳng định rằng $^{73}As^{+5}$ đã được

hấp thụ và tích lũy ở các bộ phận phía trên rễ của *as1* và *as2*.

Bảng 4

Tích lũy $^{73}\text{As}^{5+}$ ở các bộ phận phía trên rễ của *wt* và các đột biến *as1*, *as2*

Thực vật	Môi trường thạch		Thủy sinh	
	Đếm /mg TLK	% so với <i>wt</i>	Đếm/mg TLK	% so với <i>wt</i>
<i>wt</i>	2577	100	808	100
<i>as1</i>	3141	122	2373	294
<i>as2</i>	8492	330	1260	156

Ghi chú: TLK: trọng lượng khô

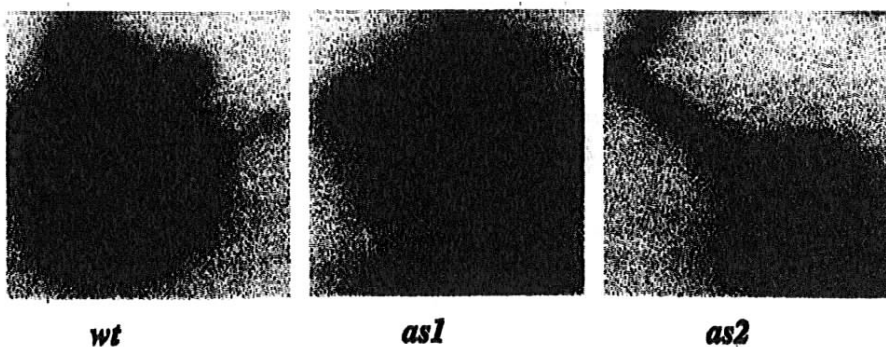
6. Tích lũy Pi trong các đột biến *as1* và *as2*

Pho2 là đột biến xử lý EMS của *A. thaliana* có khả năng tích lũy Pi trong thân đã được Delhaize và cs. công bố năm 1995. Để tìm hiểu mối liên quan giữa khả năng tích lũy arsenic và

Pi ở những đột biến này, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra hàm lượng Pi trong lá của *wt*, *as1*, *as2* và *pho2*. Các số liệu trong bảng 5 đã cho thấy hàm lượng Pi trong lá của *wt* và *as1* là tương đối giống nhau nhưng trong *as2* và *pho2* lại cao hơn đáng kể so với *wt*.



Cây mọc trên agar



Cây mọc trên môi trường thủy sinh

Hình 2. Hấp thụ $^{73}\text{As}^{5+}$ ở các cây *wt*, *as1*, *as2* sau 2 ngày trồng trên môi trường chứa As phóng xạ. Phần rễ có màu đậm ở phần dưới.

Bảng 5

Hàm lượng Pi trong lá của *wt*, *pho2*, *as1*, *as2*

Thực vật	Hàm lượng Pi ($\mu\text{g/g TLT}$)	% so với <i>wt</i>
<i>wt</i>	0,37 \pm 0,03	100
<i>pho2</i>	0,90 \pm 0,05	243
<i>As1</i>	0,43 \pm 0,05	116
<i>As2</i>	1,02 \pm 0,04	276

Ghi chú: TLT: trọng lượng tươi

III. THẢO LUẬN

Phương pháp VMT đã được sử dụng để sàng lọc các đột biến có mang đoạn T-ADN vì nó cho phép sàng lọc trực tiếp và nhanh chóng một lượng lớn các cá thể đột biến có khả năng chống chịu arsenic. Trong thí nghiệm của chúng tôi, hơn 100.000 hạt đã được sàng lọc trong một thời gian tương đối ngắn. Các đột biến thu được *as1*, *as2* có tính chống chịu, được lựa chọn dựa trên kiểu hình của rễ trong giai đoạn đầu của quá trình phát triển, là những đột biến tích lũy arsenic. Vì vậy, kỹ thuật VMT có lẽ là phương pháp tin cậy để sàng lọc các đột biến tích lũy arsenic.

Mặc dù các nghiên cứu cơ sở phân tử và sinh lý của tính chống chịu kim loại nặng ở thực vật bậc cao đang được tiến hành rất mạnh mẽ nhưng các nghiên cứu về tính chống chịu arsenic còn rất hạn chế. Chúng tôi đã chọn hướng di truyền phân tử để nghiên cứu cơ chế chống chịu arsenic, thông qua việc tìm kiếm những đột biến có khả năng tích lũy hoặc loại trừ arsenic. Từ những đột biến này, chúng tôi hy vọng sẽ tìm được gen chịu trách nhiệm cho tính chống chịu arsenic. Việc chọn quần thể *Arabidopsis* có mang đoạn T-ADN để sàng lọc đột biến là một hướng nghiên cứu mới vì cho đến nay chưa có một đột biến *Arabidopsis* chống chịu hay nhạy cảm với bất kỳ một kim loại nào đã được chọn ra từ quần thể này. Bằng cách sàng lọc như đã mô tả, chúng tôi đã tìm được một số đột biến chống chịu arsenic trong số 8000 dòng được cung cấp. Hai đột biến *as1* và *as2* từ dòng Koncz đã được tiếp tục nghiên cứu về khả năng hấp thụ, tích lũy arsenic cũng như đặc trưng phân tử của nó.

Các số liệu về hàm lượng arsenic trong thân và đặc biệt là các ảnh chụp phóng xạ cũng như các kết quả về mức độ tích lũy phóng xạ ở lá đã cho thấy rằng *as1* và *as2* là những đột biến có khả năng tích lũy kim loại. Đặc tính chống chịu của *as1*, *as2* được xác định dựa trên hình thái của rễ ở giai đoạn đầu của sự phát triển. Ở giai đoạn sau, các đột biến này đặc biệt là *as2* có triệu chứng nhiễm độc giống như *pho2* vì As^{5+} đã được vận chuyển và tích lũy vào thân cây. Có lẽ sự vận chuyển và tích lũy arsenic là giống với *pho2*. Điều này gợi ý rằng có thể *as2* và *pho2* bị đột biến ở cùng một locus. Hiện tại, cơ chế tích lũy Pi ở đột biến *pho2* vẫn còn chưa được biết đến. Delhaize và cs. [2] đã đưa ra hai giả thiết giải thích cho cơ chế này: 1) Có cơ chế sửa chữa đặc biệt trong quá trình vận chuyển Pi ở phloem giữa thân và rễ, dẫn đến sự đột biến trong gen mã hóa cho chất vận chuyển Pi ở những tế bào này. 2) Có sự đột biến hoặc ở gen mã hóa cho phân tử vận chuyển Pi đặc hiệu ở thân hoặc gen mã hóa cho một protein nhạy cảm với sự thay đổi nồng độ của Pi, dẫn đến sự thay đổi trong quá trình điều hòa hoặc biểu hiện của chất vận chuyển Pi, nhờ vậy chất này vẫn có thể hoạt động được ngay cả ở những điều kiện đã có đủ Pi. Như vậy, việc tách gen đột biến có dưới T-ADN của *as2* sẽ đẩy nhanh việc làm sáng tỏ cơ chế vận chuyển này.

Các số liệu về hàm lượng Pi ở lá của *pho2*, *as1* và *as2* cho thấy *as2* đã tích lũy một lượng đáng kể Pi và arsenic, trong khi đó *as1* dường như lại không tích lũy chất này. Như vậy, *as1* có thể đã sử dụng một cơ chế khác để chỉ hấp thụ arsenic. Bằng chứng về việc *as2* hấp thụ cả Pi và arsenic đã ủng hộ giả thiết cho rằng phốtphat và arsenic có chung một cơ chế tích lũy trong thực vật. Các phân tích tiếp theo về các đột biến *pho2*, *as1*, *as2* cần được tiếp tục tiến hành để làm sáng tỏ vai trò của các gen tham gia vào các quá trình hấp thụ và tích lũy các chất này.

Vanvliet và cs. [9] cho rằng tính nhạy cảm với Cu^{2+} của đột biến EMS của *A. thaliana* có lẽ liên quan đến sự tăng cường tích lũy Cu^{2+} trong đột biến này so với *wt*. Tuy nhiên, đột biến EMS nhạy cảm với Cd^{2+} của *A. thaliana* được Howden và Cobbett công bố [4] dường như lại là do bị mất khả năng loại bỏ kim loại này. Cả lá và rễ của đột biến này đều mất khả năng tích lũy Cd^{2+} . Lasen và cs. [6] đã thông báo về việc chọn

được đột biến EMS của *Arabidopsis* có khả năng chống chịu Al^{3+} dựa vào khả năng phát triển rễ trong sự có mặt của Al^{3+} so với *wt*. Các đột biến này có khả năng loại trừ Al^{3+} ra khỏi rễ bằng việc tăng cường tích lũy các axit hữu cơ hoặc tăng pH ở vùng rễ. Như vậy, sự loại độc của kim loại trong thực vật là một quá trình phức tạp liên quan đến hàng loạt các cơ chế khác nhau. Cho đến nay các nghiên cứu về hóa sinh phân tử và sinh lý liên quan đến sự hình thành kiểu hình tích lũy arsenic còn rất ít. Các đột biến *as1* và *as2* của chúng tôi có thể sẽ là những công cụ hữu ích cho các nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Allen E. S., 1989: Chemical analysis of ecological materials. Blackwell Scientific.
2. Delhalze E., Randall J. P., 1995: Plant Physiol., 107: 207-213.
3. Gibeaut M. D. et al., 1997: Plant Physiol., 115: 317-319.
4. Howden R., Cobbett S. C., 1992: J. Plant Physiol., 99: 100-107.
5. Koncz C. K., et al., 1992: Plant Mol. Biol., 20: 963-976.
6. Larsen B. P. et al., 1998: Plant. Physiol., 117: 9-18.
7. Murphy A., Talz L., 1995: Plant. Physiol., 108: 29-38.
8. Porra R. J, et al., 1989: Biochim. Biophys. Acta., 975: 384-394.
9. Vanvlet C. et al., 1995: Plant Physiol., 109 (3): 871-878.

SCREENING OF *ARABIDOPSIS THALIANA* T-DNA INSERTION MUTANTS IN RESPONSE TO ARSENIC STRESS

NGUYEN THI MAI PHUONG, ROSS McC LILLEY, REN ZHANG

SUMMARY

More than 8,000 T-DNA insertion mutant lines of *Arabidopsis thaliana* were screened in terms of their tolerance to 10 ppm As(V) by using vertical mesh transfer technique (VMT). Two mutants *as1* and *as2*, with enhanced root tolerance characteristics towards arsenate have been identified. Other phenotypic differences between these mutants and the *wild-type* were characterised. The chlorophyll content in the mutant *as1* was higher but lower in the mutant *as2* in comparison with the *wild-type*. The above-ground parts of these two mutants, when grown hydroponically or in soils watered with 10 ppm As(V), contained more arsenic than those of the *wild-type*. Autoradiographic studies of $^{73}As(V)$ uptake by these mutants confirmed the accumulation of As(V) in the above-ground parts. The results have suggested that *as2* was a phosphate and arsenate accumulator like *pho2* (an EMS mutant) while *as1* was only an arsenate accumulator.

Ngày nhận bài: 25-6-2002