

NGHIÊN CỨU TẠO RỄ TƠ *IN VITRO* CÂY THÀNH NGÀNH (*Cratoxylum pruniflorum* Kurz) THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobacterium rhizogenes*

Nguyễn Trần Phước Huy^{1,2*}, Trần Nguyễn Lê Uyên¹, Cao Huệ Trinh¹,
Phan Diễm Quỳnh¹, Hà Thị Loan¹, Nguyễn Đăng Quân¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

²Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao

*Email: ntp Huy.snn@tphcm.gov.vn

Ngày nhận bài: 18/11/2022; Ngày chấp nhận đăng: 10/3/2023

TÓM TẮT

Thành ngành (*Cratoxylum pruniflorum* Kurz) thuộc loài cây mọc hoang dại và phổ biến khắp các vùng trên lãnh thổ nước ta, đặc biệt ở các tỉnh miền núi phía Bắc. Chúng được sử dụng để làm thuốc và nước uống khá phổ biến trong phạm vi dân gian. Gần đây các nhà khoa học phát hiện trong dịch chiết của thành ngành có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như các xanthone trong vỏ và rễ cây, các epigallocatechin gallate và epicatechin gallate trong lá, ngoài ra còn có các tannin, terpenoids và saponins, v.v. có hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hoá và hoạt tính gây độc đối với các dòng tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, cuống lá *in vitro* cây thành ngành được chuyển gen hình thành rễ tơ thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 với mật độ vi khuẩn 4.10^4 CFU/mL trong điều kiện bổ sung 100 μ M acetosyringone. Thời gian đồng nuôi cấy trong 72 giờ cho tỷ lệ hình thành rễ tơ cao nhất đạt 4,66% trên môi trường SH không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng. Hai dòng rễ tơ R1 và R2 được chọn lọc thông qua kỹ thuật PCR, trong đó dòng R2 tăng trưởng tốt trên môi trường lỏng SH với khối lượng tươi đạt 582,08 mg, tăng 2,19 lần so với khối lượng ban đầu nuôi cấy. Kết quả trên là cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn sau này trên cây thành ngành.

Từ khoá: *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, acetosyringone, *Cratoxylum pruniflorum*, môi trường SH, rễ tơ, thành ngành.

1. MỞ ĐẦU

Cây thành ngành (*C. pruniflorum* Kurz) chứa tannin pyrocatechic, anthocyanoside, flavonoid, v.v. và các flavonoid có tác dụng hoạt hoá hệ thần kinh, trong đó có hệ thần kinh thực vật. Ngoài ra dịch chiết cây có tác dụng chống oxy hoá mạnh [1]. Một số nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các thành phần hợp chất có trong rễ cây thành ngành: về thành phần hoạt chất từ dịch chiết rễ, các nghiên cứu trước đây đã cho thấy các hợp chất xanthone trong rễ có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm; một số nghiên cứu về hoạt tính sinh học của xanthone và anthraquinone được phân tách từ rễ và vỏ cây cho thấy hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính gây độc đối với các dòng tế bào ung thư [2].

Ứng dụng công nghệ sinh học để nhân giống và nhân nuôi sinh khối cây dược liệu là hướng nghiên cứu có thể mang lại nhiều ứng dụng thực tiễn và có tính thương mại cao. Nhân giống vô tính *in vitro* có nhiều ưu điểm như hệ số nhân giống cao, cây giống giữ nguyên được các đặc tính của cây mẹ, đồng đều, sạch bệnh, sức sống cao khi đưa ra môi trường tự nhiên...

nên đã và đang được ứng dụng rộng rãi vào sản xuất nhiều loại cây trồng, trong đó có cây dược liệu. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu quy trình nhân giống *in vitro* cây thành ngành. Kết quả đã tạo được cây *in vitro* sạch bệnh và bước đầu đã xác định được môi trường nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng cây thành ngành *in vitro* [3].

Hiện nay việc sản xuất các hợp chất thứ cấp có nguồn gốc từ thực vật được chú trọng vì chúng an toàn đối với sức khỏe con người. Tuy nhiên nguồn dược liệu trong tự nhiên đang bị suy giảm nhanh chóng cả về lượng và chất do tình trạng khai thác quá mức như hiện nay, đi kèm với các tác động do biến đổi khí hậu gây ra như thời tiết ngày càng khắc nghiệt, lũ quét sạt lở xảy ra với mức độ thường xuyên hơn. Điều này dẫn đến nhiều loài dược liệu quý bị đe dọa nghiêm trọng, một số loài có nguy cơ tuyệt chủng làm ảnh hưởng lớn đến nguồn cung cấp dược liệu cho con người. Sản xuất sinh khối thông qua nuôi cấy rễ tơ chuyển gen đang là một hướng đi mới nhằm có thể đáp ứng nhu cầu về sản xuất hợp chất thứ cấp từ thực vật nói chung và cây thành ngành nói riêng [3].

Nuôi cấy sinh khối rễ tơ nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) là một giải pháp hữu hiệu, có thể khắc phục được những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống (dễ nhiễm dịch bệnh, tồn dư thuốc bảo vệ thực vật ...) và phương pháp nuôi cấy tạo sinh khối tế bào thực vật (do tồn dư của các chất điều hoà sinh trưởng thực vật trong tế bào trong quá trình nuôi cấy gây ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe người sử dụng). Tusevski và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu về rễ tơ của *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) cho thấy rễ tơ có khả năng sản xuất các flavonol glycosides quercetin 6-C-glycoside, rutin và isorhamnetin O-hexoside; phân tích thành phần hợp chất trong rễ tơ bằng HPLC đã xác định được sự có mặt của kaempferol thuộc nhóm flavonoid aglycones; đồng thời kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng catechin và epicatechin trong rễ chuyển gen cao hơn so với rễ không chuyển gen [4]. Từ đó nuôi cấy rễ tơ cây dược liệu là một phương pháp hữu ích cho việc sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học cao. Ở Việt Nam, tạo dòng rễ tơ từ thực vật và đặc biệt ở cây thành ngành còn rất mới mẻ. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ cây thành ngành (*C. pruniflorum*) thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834, trên cơ sở đó chọn lọc được dòng rễ tơ có khả năng sinh trưởng tốt, làm cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn sau này.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Cây thành ngành *in vitro* từ phòng Thực nghiệm cây trồng - Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM, kế thừa từ nghiên cứu của Nguyễn Trần Phước Huy và cộng sự về nhân giống *in vitro* cây thành ngành (*C. pruniflorum*) [3]. Về chủng vi sinh vật, dòng vi khuẩn *A. rhizogene* ATCC 15834 chứa plasmid pRi (Ri: root inducing) mang gen *rol* A, B và C, được mua từ ngân hàng chủng vi sinh vật của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Các hoá chất sử dụng trong nghiên cứu gồm môi trường SH (Schenk & Hildebrandt, 1972 - Duchefa biochemie, Hà Lan), môi trường WPM (Lloyd G. & McCown, 1980 - Duchefa biochemie, Hà Lan), môi trường Yeast Mannitol Broth - YMB (Himedia, Ấn Độ), Benzyl amino purine - BAP (Duchefa biochemie, Hà Lan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát vật liệu thích hợp cho hình thành rễ tơ

Các mẫu lá, cuống lá và đoạn thân cây thành ngành *in vitro* được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu. Mẫu lá *in vitro* được cắt bỏ mép lá và giữ nguyên vện đường gân chính, mẫu cuống lá được cắt thành những đoạn 1 cm không chứa phần lá, mẫu đoạn thân được cắt thành đoạn 1,5 cm chứa nách lá. Các mẫu sau khi cắt được lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 theo quy trình của Bulgakov và cộng sự [5]. Sau khi lây nhiễm, các mẫu được

đồng nuôi cấy trên môi trường SH thạch rắn trong điều kiện tối, nhiệt độ nuôi cấy 25 ± 2 °C theo nhiệt độ quy định của phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật. Theo dõi tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ (%) sau 6 tuần nuôi cấy.

2.2.2. Khảo sát mật độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ *in vitro*

Vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 được lấy từ tủ âm sâu (-80 °C) và hoạt hoá trên môi trường Yeast Mannitol Broth (YMB) thạch rắn. Theo quy trình chuyển gen tạo rễ tơ trên cây sâm Ngọc Linh của Hà Thị Loan và cộng sự, khuẩn lạc đơn được nuôi cấy tăng sinh trên môi trường YMB lỏng lắc ở 25-26 °C, 120-150 rpm, nuôi cấy tăng sinh trong 16-20 giờ [6]. Mật độ vi khuẩn đạt $10^4 - 10^5$ CFU/mL được sử dụng cho lây nhiễm. Trong nghiên cứu này, dung dịch vi khuẩn đã nuôi ở trên sau khi đạt được dung dịch vi khuẩn ở một số nồng độ tế bào khác nhau từ $3.10^2 - 6,3.10^6$ CFU/mL được đưa vào bình tam giác, ủ với mẫu trong thời gian từ 45 phút, lắc nhẹ trong bóng tối sau đó vớt ra thấm bằng giấy lọc vô trùng, đặt lên môi trường SH thạch rắn, theo dõi mẫu trong 12 tuần và ghi nhận tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%), số rễ tơ (rễ/mẫu) và chiều dài rễ tơ (cm).

Để xác định thời gian đồng nuôi cấy thích hợp, các mẫu cây thành ngành sau khi chuyển gen được đặt trên môi trường đồng nuôi cấy SH có bổ sung acetosyringone (AS) 100 µM trong khoảng thời gian khảo sát từ 24-96 giờ, đặt mẫu trong buồng tối, nhiệt độ 25 °C và ghi nhận tỷ lệ hình thành rễ tơ (%).

2.2.3. Kiểm tra rễ tơ chuyển gen bằng phương pháp PCR

DNA khuôn của vi khuẩn *A. rhizogenes* và rễ tơ *C. pruniflorum* được thu nhận bằng phương pháp CTAB [7]. Tiến hành PCR khuếch đại đoạn gen *rolC* bằng cặp mồi *rolCF/rolCR* và đoạn gen *virD2* với cặp mồi *virDF/virDR*, kích thước sản phẩm PCR lần lượt là 520 bp và 338 bp. Trình tự primer của gen *rolC* và gen *virD2* như Bảng 1 [8].

Bảng 1. Trình tự primer của gen *rolC* và gen *virD2*

Gene	Primer	Trình tự primer (5' – 3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>rolC</i>	<i>rolCF</i>	ATGGCTGAAGACGACCTGTG	520
	<i>rolCR</i>	TTAGCCGATTGCAAACCTTGCA	
<i>virD2</i>	<i>virDF</i>	ATGCCCGATCGAGCTCAAG	338
	<i>virDR</i>	GACCCAAACATCTCGGCTG	

Phản ứng PCR được thực hiện bằng máy SimpliAmp (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Chu kỳ PCR khuếch đại gen *rolC* gồm: biến tính ở 95 °C trong 5 phút, sau đó là 35 chu kỳ ở (1) biến tính 95 °C 30 giây; (2) bắt cặp, 54 °C, 30 giây; (3) kéo dài, 72 °C, 60 giây và bước cuối cùng là 72 °C trong 5 phút. Chu trình PCR khuếch đại gen *virD2* gồm biến tính ở 94 °C trong 5 phút, sau đó là 30 chu kỳ ở (1) biến tính, 94 °C, 60 giây; (2) bắt cặp, 62 °C, 30 giây; (3) kéo dài, 72 °C, 60 giây và bước cuối cùng là 72 °C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X. Sau đó, được tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR trên gel agarose bằng bộ Kit Dneasy Plant Extraction (Qiagen, Mỹ).

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	1 phản ứng (µL)
H ₂ O	18,85
Dream buffer (Mg ²⁺)	1,5
dNTPs (2 mM)	2,0
F (10 pM)	0,2
R (10 pM)	0,2
Taq (1 u/µL)	1,25
DNA	1,0
Tổng thể tích	25

2.2.4. Đánh giá khả năng sinh trưởng của một số dòng rễ

Các dòng rễ tơ có chứa gen *rolC* được nuôi cấy trên môi trường SH lỏng theo quy trình của Hà Thị Loan và cộng sự [6]. Tốc độ sinh trưởng của các dòng rễ tơ được đánh giá sau mỗi tháng nuôi cấy và liên tục trong 5 tháng theo các chỉ tiêu hệ số tăng trưởng sinh khối rễ tơ (lần) và khối lượng sinh khối tươi rễ tơ (mg).

$$\text{Hệ số tăng trưởng sinh khối rễ tơ (lần)} = \frac{\text{Khối lượng tươi mẫu cấy thu được (mg)}}{\text{Khối lượng tươi mẫu cấy ban đầu (mg)}}$$

2.3. Thu thập, xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần. Số liệu thí nghiệm được thu thập, tính toán và xử lý thô trên phần mềm Microsoft Excel 2010 để thu giá trị trung bình, phân tích Duncan's test bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV với mức độ tin cậy $p \leq 0,5$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

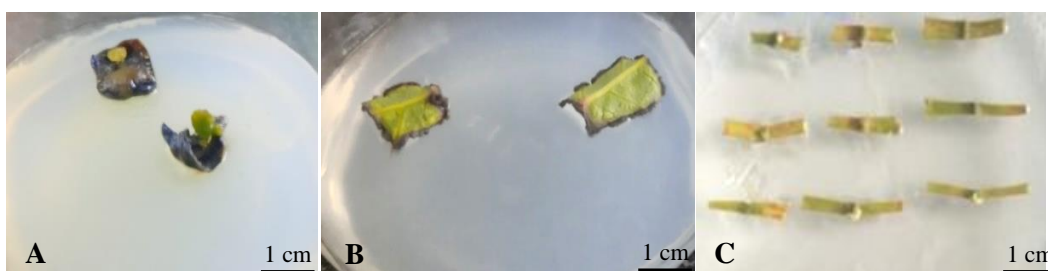
3.1. Khảo sát vật liệu thích hợp cho hình thành rễ tơ

Chồi cây thành ngạnh *in vitro* được chuyển vào môi trường WPM bổ sung 2 mg/L BA và nuôi cấy trong 8 tuần nhằm gia tăng số lượng mẫu cho chuyển gen tạo rễ tơ. Mẫu mô lá, cuống lá và đoạn thân *in vitro* được sử dụng để khảo sát vật liệu chuyển gen tạo rễ tơ. Kết quả Bảng 3 cho thấy sau 6 tuần quan sát, mô lá và cuống lá cho dấu hiệu cảm ứng tạo rễ tơ tương đồng nhau, không có sự khác biệt về mặt thống kê, thấp nhất là đoạn thân mang mắt chồi bên cho tỷ lệ mẫu có dấu hiệu cảm ứng tạo rễ tơ là 3,3%. Ở các mô lá và cuống lá *in vitro* có sự hình thành mô sẹo tại vị trí lây nhiễm, trong khi mẫu đoạn thân *in vitro* không có dấu hiệu khác biệt so với trạng thái ban đầu.

Bảng 3. Kết quả khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ *in vitro* cây thành ngạnh

Loại mô	Tỷ lệ mẫu có dấu hiệu tạo rễ tơ (%)	Mô tả hình thái
Cuống lá <i>in vitro</i>	14,8 ^a ± 0,4	Hình thành sẹo ở vị trí lây nhiễm
Lá <i>in vitro</i>	14,2 ^a ± 2,2	Hình thành sẹo ở mép lá
Đoạn thân <i>in vitro</i>	3,3 ^b ± 0,2	Không có dấu hiệu tại vị trí lây nhiễm
CV (%)	19,1	

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ tin cậy $p \leq 0,05$.



Hình 1. Kết quả khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ *in vitro* cây thành ngạnh sau 6 tuần
A - cuống lá *in vitro*; B - mô lá *in vitro*; C - đoạn thân *in vitro*

Kết quả khảo sát 03 loại vật liệu (mô lá, cuống lá và đoạn thân *in vitro*) cho sự lây nhiễm hình thành rễ tơ đã xác định mô lá và cuống lá là cơ quan được chọn để chuyển gen tạo rễ tơ

cây thành ngạnh. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Rahimi và cộng sự đã chỉ ra mẫu lá và cuống lá của cây *Valeriana sisymbriifolium* sau khi lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tóc cao hơn so với mẫu trụ hạ điệp [9], Hoàng Thị Thanh Minh và cộng sự cũng nhận thấy sự cảm ứng tạo rễ tóc từ mẫu lá cây đậu phộng cao hơn so với các mẫu khác [10]. Như vậy, mô lá và cuống lá *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy đều thích hợp cho tạo rễ tơ ở cây thành ngạnh.

3.2. Khảo sát mật độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ *in vitro*

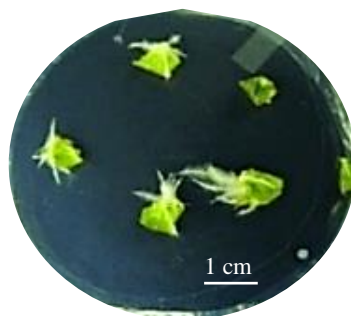
Mật độ *A. rhizogenes* là một trong những thành tố có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ của thực vật. Trong chu kỳ sinh trưởng, vi khuẩn phát triển và có sức sống mạnh nhất ở pha tăng trưởng, do đó chúng được sử dụng để lây nhiễm với mẫu vật [11]. Để xác định được ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả biến nạp vào mô lá và cuống lá cây thành ngạnh sau 12 tuần nuôi cấy *in vitro*, tiến hành nhiễm khuẩn mẫu cuống lá trong 45 phút, bổ sung AS 100 μ M ở các mật độ vi khuẩn khác nhau để xác định mật độ tối ưu. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy sự khác nhau về tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ sau khi mô lá và cuống lá được lây nhiễm *A. rhizogenes* ở các mật độ khác nhau tương ứng với khác giá trị $3,0.10^2 - 6,3.10^6$ CFU/mL.

Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes* đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ mô cuống lá thành ngạnh *in vitro*

Nghiệm thức	Mật độ khuẩn (CFU/mL)	Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
M1	$3,0.10^2$	$2,34^a \pm 0,11$	$2,32^b \pm 0,23$	$1,82^b \pm 0,18$
M2	$3,7.10^3$	$3,46^c \pm 0,22$	$1,89^a \pm 0,19$	$1,59^a \pm 0,25$
M3	$4,0.10^4$	$6,59^e \pm 0,12$	$3,45^c \pm 0,25$	$3,25^c \pm 0,19$
M4	$5,2.10^5$	$4,34^d \pm 0,12$	$2,16^b \pm 0,24$	$1,70^b \pm 0,19$
M5	$6,3.10^6$	$2,94^b \pm 0,13$	$1,39^a \pm 0,16$	$1,17^a \pm 0,21$
CV (%)		11,60	13,23	11,25

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ tin cậy $p \leq 0,05$.

Tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tơ đạt cao nhất khi mật độ vi khuẩn đạt 4.10^4 CFU/mL (6,59%), có trung bình 3,45 rễ/mẫu, rễ dài trung bình 3,25 cm. Ở mật độ vi khuẩn thấp hơn (3.10^2 CFU/mL và $3,7.10^3$ CFU/mL) hay cao hơn ($5,2.10^5$ CFU/mL và $6,3.10^6$ CFU/mL) cho các kết quả tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ, số rễ/mẫu và chiều dài rễ thấp hơn. Ở mô cuống lá không nhận thấy có sự cảm ứng tạo rễ tơ với các mật độ vi khuẩn khác nhau.

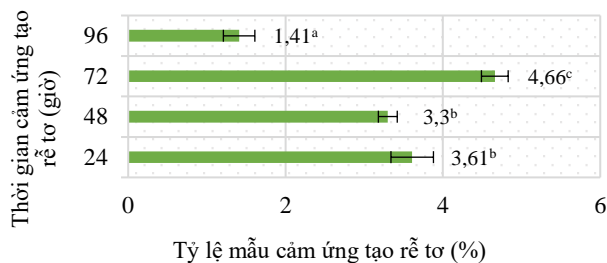


Hình 2. Kết quả mẫu mô lá được lây nhiễm với vi khuẩn ở mật độ 4.10^4 CFU/mL

Mật độ vi khuẩn cho chuyển gen trên cây thành ngạnh (4.10^4 CFU/mL) thấp hơn so với kết quả của chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 dùng cảm ứng trên cây sâm Ngọc Linh [6], hay của chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 dùng cảm ứng rễ tơ trên cây Kim sa [12]. Theo Bivadi

et al. (2014), sự khác nhau này có thể là do tính nhạy của thực vật chủ với chủng vi khuẩn xâm nhiễm [13]. Theo đó, có thể mô lá cây thành ngạnh nhạy với chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 đã dẫn đến mật độ vi khuẩn cần thiết để gây nhiễm thấp. Như vậy, mật độ vi khuẩn 4.10^4 CFU/mL là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ.

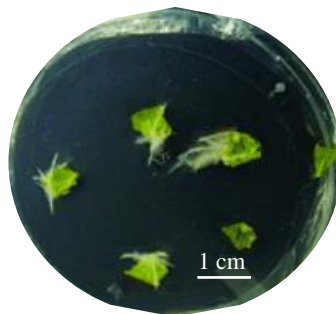
Quá trình đồng nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong quá trình biến nạp của vi khuẩn *Agrobacterium* vào tế bào chủ. Thời gian đồng nuôi cấy là thời gian vi khuẩn đã bám vào mẫu ở quá trình nhúng mẫu vào dịch vi khuẩn, có điều kiện tăng sinh số lượng trên môi trường rắn. Sự chuyên và sáp nhập T-DNA vào bộ gen tế bào thực vật xảy ra trong giai đoạn này. Hình 3 cho thấy, ở các khoảng thời gian đồng nuôi cấy khác nhau, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ là khác nhau. Thời gian đồng nuôi cấy 72 giờ thu được tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất (4,66%), các rễ mảnh, màu trắng, có lông tơ xung quanh rễ chính. Ở thời gian đồng nuôi cấy thấp hơn (24 giờ, 48 giờ) hay cao hơn (96 giờ) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ thấp hơn, có thể do vi khuẩn xâm nhập vào ít nên quá trình biến nạp có thể không hoàn toàn, nhưng nếu thời gian đồng nuôi cấy dài hiệu quả chuyển gen lại giảm do lượng vi khuẩn phát sinh lớn sẽ gây hại trực tiếp đến mô lá thành ngạnh. Thời gian đồng nuôi cấy 72 giờ cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ tốt nhất trên cây thành ngạnh, kết quả tương thích với thời gian đồng nuôi cấy trên cây sâm Ngọc Linh [6].



Hình 3. Kết quả ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ cây thành ngạnh

Mỗi chủng vi khuẩn và mỗi loài thực vật chủ khác nhau sẽ có thời gian đồng nuôi cấy khác nhau. Với chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834, thời gian đồng nuôi cấy thích hợp để thu nhận rễ tơ trên cây đậu phộng 14 và cây *Dubiosia myoporoides* là 48 giờ 15 trong khi trên cây *Gynostemma pentaphyllum* thì thời gian này là 2 tuần [16]. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng nếu thời gian đồng nuôi cấy quá ngắn thì quá trình biến nạp có thể không hoàn toàn, trong khi đó thời gian đồng nuôi cấy quá dài có thể ảnh hưởng không tốt đến quá trình biến nạp do ái lực của vi khuẩn với tế bào thực vật sẽ giảm hoặc sẽ ức chế cạnh tranh [17], đồng thời làm sức sống của mô thực vật giảm [18].

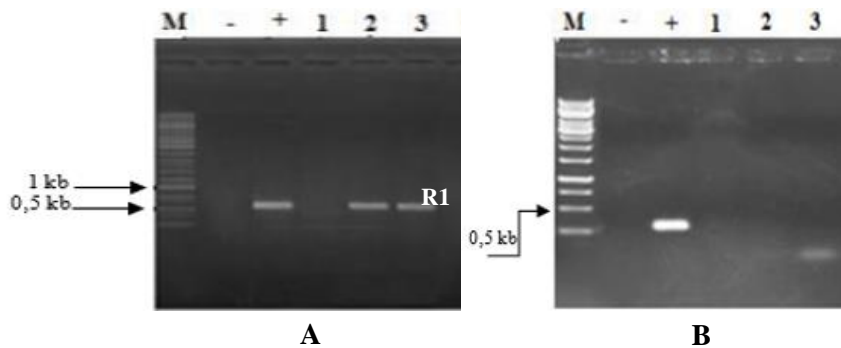
Như vậy, thời gian đồng nuôi cấy trong 72 giờ là thích hợp để cảm ứng hình thành rễ tơ cây thành ngạnh.



Hình 4. Mẫu mô lá thành ngạnh *in vitro* được đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. rhizogenes* trong 72 giờ

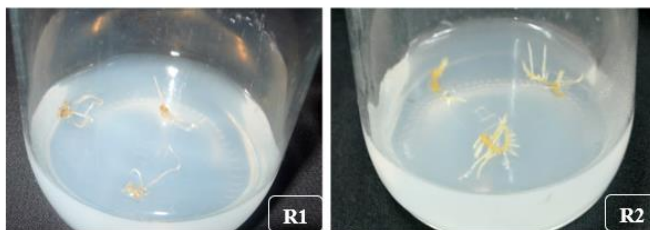
3.3. Kiểm tra rễ tơ chuyển gen bằng phương pháp PCR

Sau thời gian nuôi cấy, các dòng rễ được chọn có các đặc điểm rễ trắng, đầu rễ không bị thâm đen, sinh trưởng tốt, sạch vi khuẩn. Sau khi tách chiết DNA của bộ gen rễ tơ thành ngânh, phản ứng PCR được thực hiện với cặp primer *rolCF* và *rolCR* để khuếch đại đặc hiệu vùng 520 bp của gen *rolC* và cặp primer gen *virDF* và *virDR* khuếch đại đặc hiệu vùng 338 bp của gen *virD2*. Kết quả điện di sản phẩm PCR của hai cặp primer gen *rolC* và *virD2* cho thấy gen *rolC* và gen *virD2* được khuếch đại ở mẫu đối chứng dương (pRi plasmid 15834). Các giếng chạy sản phẩm PCR của rễ tơ đều có sự hiện diện của gen *rolC* ở vị trí 520 bp (cùng vị trí với đối chứng dương gen *rolC*) và không thấy sự hiện diện của gen *virD2* ở vị trí 338 bp.



Hình 5. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn gen *rolC* (A) và đoạn gen *virD2* (B) M: Thang chuẩn 1 kb (Biorad); (-): nước cất; (+): sản phẩm PCR của Ri plasmid; 1. Rễ không chuyển gen; Các giếng 2, 3 (A): sản phẩm PCR nhân gen *rolC* của các dòng rễ tơ; R1, R2: các dòng rễ tơ mang gen *rolC*; Các giếng 2, 3 (B): sản phẩm PCR nhân gen *virD2* của các dòng rễ tơ mang gen *rolC*.

Từ kết quả trên có thể kết luận gen *rolC* từ Ri-plasmid của vi khuẩn *A. rhizogenes* 15834 đã được chuyển vào rễ tơ thành ngânh. Sự vắng mặt của gen *virD2* trong những dòng rễ tơ đem phân tích cũng khẳng định vi khuẩn sau khi lây nhiễm với mô lá đã được khử sạch hoàn toàn và không còn sót lại trên bề mặt tế bào của rễ tơ. Như vậy, có thể khẳng định đã sàng lọc được 2 dòng rễ tơ thành ngânh.

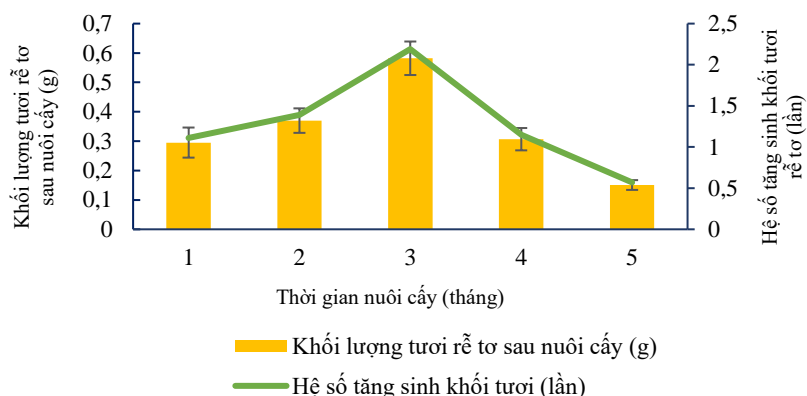


Hình 6. Các dòng rễ tơ R1 và R2 cây thành ngânh có chứa gen *rolC*

3.4. Đánh giá khả năng sinh trưởng của một số dòng rễ tơ

Dòng rễ tơ R1 có màu trắng, mảnh, phần gốc sự hóa nâu, ít phân nhánh thành các rễ thứ cấp. Dòng rễ tơ R2 có màu vàng nhạt, rễ kéo dài và phân nhánh nhiều tạo thành các rễ thứ cấp có màu trắng. Dựa vào các đặc điểm về hình thái và khả năng tăng trưởng phân nhánh, dòng rễ R2 được lựa chọn cho việc nhân nhanh trên môi trường lỏng nhằm làm tăng khối lượng rễ tơ.

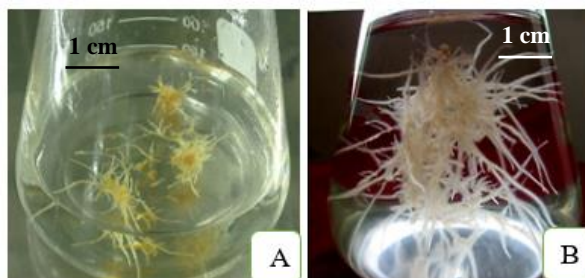
Dòng rễ tơ R2 sau khi chọn lọc đã được bố trí nuôi cấy trên môi trường lỏng SH. Khối lượng rễ tơ ban đầu nuôi cấy là $265,6 \pm 6$ mg. Sau 5 tháng nuôi cấy, kết quả tăng trưởng sinh khối rễ tơ được trình bày ở Hình 7.



Hình 7. Khả năng tăng trưởng sinh khối của dòng rễ tơ R2 sau 5 tháng nuôi cấy

Kết quả biểu đồ 2 cho thấy, sự sinh trưởng của rễ tơ qua các giai đoạn có sự khác biệt rõ rệt. Giai đoạn đầu từ 1-2 tháng, rễ sinh trưởng kém, có thể đây là giai đoạn khởi đầu của nuôi cấy, các tế bào rễ hấp thu chất dinh dưỡng tích lũy chuẩn bị cho quá trình phân chia tế bào nên chưa có sự tăng sinh khối mạnh mẽ, sinh khối tươi chỉ tăng 1,39 lần sau 2 tháng.

Sang tháng thứ 3, rễ phát triển tốt, sinh khối tăng cao hơn so với 2 tháng trước đó với hệ số tăng sinh khối đạt 2,19 lần, khối lượng tươi đạt 582,08 mg (Hình 8). Giai đoạn tháng thứ 4-5 sinh khối rễ dừng tăng trưởng hoặc bị giảm, rễ có thể bị chết, mềm, màu nâu, sinh khối bị giảm đi. Như vậy, có thể nhận thấy thời gian để các dòng rễ tơ sinh trưởng tốt nhất là 3 tháng kể từ khi bắt đầu nuôi cấy.



Hình 8. Rễ tơ thành ngạnh trước và sau khi nuôi cấy 3 tháng nuôi cấy trên môi trường SH lỏng
A. Rễ tơ trước khi nuôi cấy; B. Rễ tơ sau 3 tháng nuôi cấy

Sử dụng mô lá và cuống lá, để lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* ở mật độ vi khuẩn 4.10^4 CFU/mL trong 72 giờ cho kết quả hình thành 4 dòng rễ tơ được đặt tên lần lượt là R1, R2, R3 và R4. Sau khi sàng lọc bằng phương pháp PCR thu nhận được 2 dòng rễ tơ (R1 và R2) có chứa gen *rolC*. Tiến hành nhân nhanh rễ tơ trên môi trường lỏng SH sau 3 tháng cho khối lượng tươi rễ tơ đạt 582,08 mg, tăng gấp 2,18 lần so với khối lượng ban đầu trước khi nuôi cấy (265,6 mg). Mỗi loài thực vật khác nhau có khả năng sinh trưởng của rễ tơ khác nhau. Có những loài hình thành các rễ tơ dễ cảm ứng với thành phần môi trường và khả năng tăng trưởng mạnh dẫn đến hệ số nhân nhanh rễ tơ cao gấp nhiều lần so với thành ngạnh như rễ tơ Đàng sâm tăng trưởng mạnh sau 30 ngày với hệ số nhân rễ đạt 32,07 lần [19], rễ tơ cây bá bệnh tăng trưởng 13,5-16 lần trong môi trường lỏng sau 2 tuần nuôi cấy [20]. Tuy nhiên, có những loài có hệ số tăng trưởng rễ tơ thấp tương đương với thành ngạnh như rễ tơ Đan Sâm tăng trưởng 3,08 lần trong môi trường lỏng [21].

4. KẾT LUẬN

Kết quả khảo sát các loại vật liệu chuyển gen (mô lá, cuống lá, đoạn thân *in vitro*) thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 đã xác định được mô cuống lá và lá *in vitro* là vật liệu nhận gen thích hợp cho chuyển gen ở cây thành ngạnh. Lây nhiễm mô lá bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834 với mật độ 4.10^4 CFU/mL; nồng độ AS 100 μ M; thời gian nhiễm khuẩn 45 phút, thời gian đồng nuôi cây 72 giờ là những điều kiện thích hợp cho quá trình cảm ứng tạo rễ tơ cây thành ngạnh với tỷ lệ chuyển gen đạt 4,66%. Qua đánh giá và sàng lọc bằng kỹ thuật PCR đã thu nhận được hai dòng rễ tơ có chứa gen *rolC* (dòng R1 và R2). Dòng R2 sinh trưởng tốt trên môi trường lỏng SH với khối lượng tươi sinh khối đạt 582,08 mg, tăng gấp 2,19 lần so với khối lượng ban đầu. Qua các kết quả trên cho thấy tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tóc và sinh khối rễ tạo ra trên các dòng rễ đối với thành ngạnh còn thấp hơn so với một số loài thực vật khác chúng tổ thành ngạnh là một trong những loài khó để trong việc hình thành và nhân nhanh sinh khối rễ tơ. Cần tiếp tục nghiên cứu chuyển gen với số lượng lớn hơn và các chủng vi khuẩn khác nhau, thử nghiệm các loại môi trường dinh dưỡng và các dạng môi trường nuôi cấy khác nhau để chọn lọc ra các dòng rễ tối ưu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi – Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2004.
2. Boonak, N., Karalai, C., Chantrapromma, S., Ponglimanont, C., Fun, H. K., Kanjana-Opas, A., & Laphookhieo, S. - Bioactive prenylated xanthenes and anthraquinones from *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*. *Tetrahedron* **62** (2006) 8850-8859. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.06.003>
3. Nguyễn Trần Phước Huy, Thái Hạnh Tuyên, Trần Nguyễn Lê Quyên, Cao Huệ Trinh, Phan Diễm Quỳnh, Hà Thị Loan - Nhân giống *in vitro* cây thành ngạnh (*Cratoxylum pruniflorum* Kurz), Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc, Nhà xuất bản Đại học Thái Nguyên, Thái Nguyên, 2021, tr. 154-159.
4. Tusevski, O., Stanoeva, J. P., Stefova, M., Kungulovski, D., Pancevska, N. A., Sekulovski, N., Panov, S., Simic, S. G. - Hairy roots of *Hypericum perforatum* L.: a promising system for xanthone production. *Cent Eur J Biol* **8** (2013)1010–1022. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0224-7>
5. Bulgakov, V. P., Khodakovskaya, M. v, Labetskaya, N. v, Chernoded, G. K. & Zhuravlev, Y. N. - The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry* **49** (1998) 1929-1934. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00351-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00351-3)
6. Loan Ha Thi, Xo Duong Hoa, Binh Nguyen Quoc, Quan Nguyen Hoang, Dao Vu Thi, Pawlicki-Jullian Nathalie, Gontier Eric - Study on obtaining of hairy root of *Panax vietnamensis* by using rol gene transformation via *Agrobacterium rhizogenes*. *Academia Journal of Biology* **36** (2014) 293-300. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v36n1se.4411>
7. Benbouza, H., Baudoin, J.-P. & Mergeai, G. - Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *BASE* **10** (2) (2006) 73-76.
8. Diop, M. F., Hehn, A., Ptak, A., Chrétien, F., Doerper, S., Gontier, E., Bourgaud, F., Henry, M., Chapleur, Y. Laurain-Mattar, D. - Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L. - relationships to galanthamine content. *Phytochemistry Reviews* **6** (2007) 137–141. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9043-z>

9. Rahimi, K., Haghbeen, K., Marefatjo, J., Jazii, F. R. & Sheikhani, R. - Successful production of hairy root of *Valeriana sisymbriifolium* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Biotechnology* **7** (2008) 200-204.
10. Hoàng Thị Thanh Minh, Quách Ngô Diễm Phương, Bùi Văn Lê - Nghiên cứu quy trình chuyển gen tạo rễ tơ *in vitro* cây đậu phộng (*Arachis hypogaea* L.) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* nhằm thu nhận Resveratrol. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* **9** (2011) 665-672.
11. Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M.-A. & Jacquin-Dubreuil, A. - Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rolA*, *B*, *C* genes only. *J Biotechnol* **81** (2000) 151-158. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00287-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00287-X)
12. Petrova, M., Zayova, E., Vlahova, M. - Induction of hairy roots in *Arnica montana* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Cent Eur J Biol* **8** (2013) 470-479. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0157-6>
13. Bivadi, V., Zakaria, R. A., Zare, N., Yazdani, B. - Effects of different tissue culture conditions in Hairy roots induction in *Hypericum perforatum* L. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)* **7** (2014) 646-653.
14. Karthikeyan, A., Palanivel, S., Parvathy, S. & Raj, R. B. - Hairy root induction from hypocotyl segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Afr J Biotechnol* **6** (15) (2007) 1817-1820. DOI: 10.5897/AJB2007.000-2268
15. Yoshimatsu, K., Sudo, H., Kamada, H., Kiuchi, F., Kikuchi, Y., Sawada, J. I., & Shimomura, K. - Tropane alkaloid production and shoot regeneration in hairy and adventitious root cultures of *Duboisia myoporoides*-*D. leichhardtii* Hybrid. *Biol Pharm Bull* **27** (2004) 1261-1265. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1261>
16. Chang, C.-K., Chang, K.-S., Lin, Y.-C., Liu, S.-Y. & Chen, C.-Y. - Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins. *Biotechnol Lett* **27** (2005) 1165-1169. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-8653-7>
17. Tao, J. & Li, L. - Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes* - *South African Journal of Botany* **72** (2006) 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.07.010>
18. Lièvre K. - Elaboration d'une méthode de transformation génétique de la rue officinale par *Agrobacterium tumefaciens*. Conséquence de l'introduction du gène de la cinnamate-4-hydroxylase sur la voie de biosynthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L. (2004).
19. Nguyễn Thị Huyền và Nguyễn Văn Việt - Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* sinh khối rễ tơ cây Đẳng Sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f.). *Tạp chí Khoa học công nghệ và lâm nghiệp*, tháng 10/2017, 34-41.
20. Phan Tường Lộc, Đặng Thị Ngọc, Nguyễn Huỳnh Cẩm Tú, Hoàng Văn Dương, Trần Thị Ngọc Hà - Cảm ứng tạo rễ tơ cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia* JACK) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* và chọn dòng rễ tổng hợp Eurycomanone cao, Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc, Huế, 2020, 866-871.
21. Ninh Thị Thảo, Lê Tiến Vinh, Lã Hoàng Anh, Nguyễn Thị Thủy, Nguyễn Thị Phương Thảo - Nghiên cứu cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ cây Đan Sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* **13** (2) (2015) 251-258.

ABSTRACT

STUDY ON HAIRY ROOTS INDUCTION OF *Cratoxylum pruniflorum* Kurz VIA *Agrobacterium rhizogenes*

Nguyen Tran Phuoc Huy^{1, 2*}, Tran Nguyen Le Quyên¹, Cao Hue Trinh¹,
Phan Diem Quynh¹, Ha Thi Loan¹, Nguyen Dang Quan¹

¹*Ho Chi Minh City Biotechnology Center*

²*Center for Business Incubation of Agricultural High Technology*

*Email: ntp Huy.snn@tphcm.gov.vn

Cratoxylum pruniflorum Kurz is a wild plant that grows across our country, particularly in the northern mountainous provinces. In a popular folkway, it is used to make medicine and drinking water. Scientists recently discovered that *C. pruniflorum* Kurz contains a variety of biologically active compounds, including xanthenes in the bark and roots, epigallocatechin gallate, and epicatechin gallate in the leaves, as well as tannins, terpenoids, saponins... have antibacterial, antioxidant, and cytotoxic properties against cancer cell lines. In this study, perfoliate tissue was transgenic for hairy roots induction *in vitro* using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 with a bacterial density of 4.10^4 CFU/mL, acetosyringone (AS) concentration of 100 μ M, and a co-culture period of 72 hours yielded the highest average rate of hairy roots induction at 4.66% on SH medium without growth regulators. Two hairy root lines R1 and R2 were selected through PCR, in which the hairy root line R2 grew well on SH liquid medium with a fresh weight of 582.08 mg, an increase of 2.19 times compared to the original weight. The above results are the basis for further studies on *C. pruniflorum* Kurz.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, acetosyringone, *Cratoxylum pruniflorum*, hairy roots, SH medium.