

Nghiên cứu cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ cây Hoa Móng tay (*Impatiens balsamina* L.) từ mười bốn chủng *Agrobacterium rhizogenes*

- **Phan Trung Hải**
- **Quách Ngô Diễm Phương**
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
- **Nguyễn Như Nhứt**
Công ty Gia Tường, Tỉnh Bình Dương

(Bài nhận ngày 31 tháng 08 năm 2015, nhận đăng ngày 14 tháng 04 năm 2016)

TÓM TẮT

Cây Hoa Móng tay (*Impatiens balsamina* L.) là một loài cây được trồng phổ biến ở Việt Nam và đang được sử dụng nhiều trong các bài thuốc dân gian cổ truyền. Trong đó rễ cây gồm nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp có giá trị đã được chứng minh có tác dụng trong việc kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxi hóa và ngăn ngừa ung thư... Nuôi cấy rễ tơ là phương pháp đang được quan tâm nghiên cứu có thể thu được số lượng lớn các hợp chất thứ cấp bởi vì rễ tơ phát triển nhanh chóng, ổn định về mặt di truyền và không cần bổ sung các hormone tăng trưởng. Trong nghiên cứu này, với mục đích thu nhận nguồn vật

Từ khóa: *Agrobacterium rhizogenes*, rễ tơ, *Impatiens balsamina* L.

liệu rễ tơ, chúng tôi khảo sát một số yếu tố khác nhau ảnh hưởng đến quá trình cảm ứng tạo rễ tơ như: dòng vi khuẩn, mô gây nhiễm, OD dịch khuẩn, thời gian ngâm mẫu và thời gian đồng nuôi cấy. Kết quả cho thấy 3 chủng *Agrobacterium rhizogenes* phân lập tại Việt Nam (chủng C02, C18, C26) cho cảm ứng tạo rễ tơ cao trên mô lá với OD dịch khuẩn là 0,5 đến 1,0; thời gian ngâm mẫu là 5 phút và thời gian đồng nuôi cấy là 72 giờ. Trong đó, rễ tơ được cảm ứng từ chủng C02 cho khả năng sinh trưởng mạnh nhất với môi trường nuôi cấy là B5.

MỞ ĐẦU

Cây thuốc dân gian từ lâu đã được nhiều người quan tâm đến, đây là nguồn tài nguyên thực vật rất có giá trị trong việc phòng trừ bệnh, là nguyên liệu cho các lĩnh vực y dược. Cây Hoa Móng tay (*Impatiens balsamina* L.) là một loại cây phổ biến ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Ở Việt Nam cây Hoa Móng tay được trồng rất phổ biến và ở một số nước Châu Á cây được sử dụng nhiều trong một số bài thuốc y học cổ truyền. Trong một số báo cáo, cây Hoa Móng tay có chứa các hợp chất như naphthoquinone, coumarin, phenolic acid, flavonoid, anthocyanidin và steroid có tác dụng kháng

khuẩn, kháng nấm, chống oxi hóa và ngăn ngừa ung thư [3, 14]. Cây Hoa Móng tay được coi như là một sản phẩm thiên nhiên tiềm năng cho việc phát triển các loại thuốc chữa trị các loại bệnh nhằm phục vụ cho sức khỏe con người.

Trong thành phần cây Hoa Móng tay với các hợp chất có hoạt tính sinh học cao hiện đang được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi, đặc biệt, hợp chất lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) có trong rễ cây Hoa Móng tay có nhiều tác dụng trị liệu khác nhau như kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, kháng viêm [3]...Việc thu nhận các hợp chất từ rễ còn hạn

chế do hàm lượng thấp và không thể chủ động sản xuất.

Agrobacterium rhizogenes là một loại vi khuẩn trong đất gây bệnh rễ tơ trên cây 2 lá mầm. Bệnh này do việc vận chuyển và nhập các T-DNA từ plasmid vào hệ gen trong tế bào thực vật [13]. Đặc biệt rễ tơ có khả năng sinh trưởng nhanh, phân nhánh cao, kỹ thuật nuôi cấy rễ chuyển gen dễ dàng và có thể được nuôi cấy tạo sinh khối liên tục.

Nuôi cấy rễ tơ đang là một hướng nghiên cứu đầy tiềm năng với nhiều triển vọng ứng dụng quan trọng trong sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học khác nhau và trong cải thiện môi trường và không phụ thuộc vào các yếu tố hormone sinh trưởng. Ngoài ra, nuôi cấy rễ tơ là một phương pháp được nhiều nhà khoa học cho là hữu hiệu và đầy triển vọng trong nghiên cứu biểu hiện gene và trong sản xuất protein tái tổ hợp. Việc sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học từ việc nuôi cấy rễ tơ trên các loài thực vật đang là một hướng đi mới có tiềm năng to lớn. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu khảo sát khả năng tạo rễ tơ cây Hoa Móng tay (*Impatiens balsamina* L.) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* trên cơ sở dùng mô nguyên liệu *in vitro*, đồng thời nghiên cứu nuôi cấy rễ *in vitro* góp phần đáp ứng nguồn nguyên liệu dùng chế biến sản phẩm sử dụng trong lĩnh vực y dược.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* (C01, C02, C04, C05, C10, C11, C17, C18, C21, C25, C26, C27, C29, C30) do phòng thí nghiệm Chi nhánh Công ty TNHH Gia Tường Bình Dương cung cấp. Các chủng này được nuôi cấy và bảo quản trên môi trường thạch nghiêng Yeast Manitol Broth (YMB) ở 25 °C.

Hạt giống cây Hoa Móng tay (*Impatiens balsamina* L.) do Chi nhánh công ty TNHH Gia Tường Bình Dương cung cấp.

Phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ

Vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* được hoạt hóa trên môi trường lỏng YMB, lắc với vận tốc 150 vòng/ phút trong 48 giờ ở 25 °C. Vi khuẩn sau khi hoạt hóa được cấy vào môi trường YMB để tăng sinh khối. Khi *Agrobacterium rhizogenes* phát triển đến giữa pha tăng trưởng với OD_{600nm} = 1,0 được dùng để gây nhiễm chuyển gene.

Các mẫu cây Hoa Móng tay *in vitro* 45 ngày tuổi được nuôi cấy trong các Erlen được cắt tạo vết thương với chiều dài từ 0,5 đến 1 cm. Sau đó mẫu được ngâm trong huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* với thời gian ngâm mẫu là 5 phút. Các mẫu được đặt trên giấy thấm vô trùng để loại bỏ vi khuẩn sau đó đặt trên các đĩa chứa môi trường MS không bổ sung chất điều hòa tăng trưởng để thực hiện quá trình đồng nuôi cấy. Quá trình đồng nuôi cấy được thực hiện trong tối. Sau 2 ngày đồng nuôi cấy các mẫu được rửa với môi trường MS lỏng có bổ sung cefotaxime với nồng độ 500 mg/L để loại bỏ vi khuẩn trên bề mặt mẫu. Sau khi rửa, mẫu được chuyển vào nuôi cấy trên môi trường MS rắn bổ sung cefotaxime (500 mg/L) để loại bỏ vi khuẩn [4]. Sau 14 ngày nuôi cấy, quan sát kết quả sự xuất hiện rễ tơ.

Tỷ lệ tạo rễ tơ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ tạo rễ (\%)} = \frac{\text{số mẫu tạo rễ tơ}}{\text{tổng số mẫu gây nhiễm}} \times 100$$

Xác định các điều kiện thích hợp cảm ứng tạo rễ tơ trên cây Hoa Móng tay

Khảo sát loại mô thích hợp để tạo rễ tơ

Tiến hành quy trình tạo rễ với các vị trí xâm nhiễm khác nhau như: lá; trụ hạ diệp và trụ thượng diệp. Sau 14 ngày thu kết quả dựa trên chỉ số tỷ lệ cảm ứng ra rễ để chọn ra loại mô thích hợp cho việc cảm ứng tạo rễ tơ.

Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian gây nhiễm lên khả năng cảm ứng tạo rễ tơ

Thời gian ngâm mẫu trong dung dịch vi khuẩn thay đổi lần lượt: 5; 10; 15 và 20 phút. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ mẫu cảm ứng ra rễ tơ với thời gian ngâm mẫu khác nhau

Khảo sát ảnh hưởng của OD dịch khuẩn lên sự hình thành rễ tơ cây Hoa Móng tay

Tiến hành quy trình tạo rễ tơ cây Hoa Móng tay bằng các chủng *A. rhizogenes* với OD dịch khuẩn được thay đổi lần lượt là 0,1; 0,5; 1,0 và 1,5. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ mẫu cảm ứng ra rễ tơ với các OD dịch khuẩn khác nhau.

Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy lên khả năng cảm ứng tạo rễ tơ

Tiến hành khảo sát thời gian đồng nuôi cấy với các thời gian khác nhau: 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ nhằm tìm ra thời gian đồng nuôi cấy thích hợp cảm ứng tạo rễ tơ.

Kiểm tra sự chuyển gen

Phương pháp PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu của gen *rolB* để kiểm tra sự chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. DNA. Cặp mồi khuếch đại đoạn gen *rolB* là *rolBF* (5'-GCTCTTGACGTGCTAGATTT-3') và *rolBR* (5'-GAAGGTGCAAGCTAC CTCTC-3'). Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích hỗn hợp là 25 μ L gồm 2 μ L DNA của các mẫu rễ tơ (hay Ri plasmid), 2,5 μ L dNTPs 2 mM, 0,5 μ L Taq DNA polymerase (1 unit/ μ L), 0,5 μ mol với mỗi mồi, 2,5 μ L Taq buffer 5X và bổ sung nước siêu sạch để đủ thể tích. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *rolB* là biến tính ban đầu ở 95 °C trong 5 phút, 30 chu kỳ (94 °C trong 60 giây, 54 °C trong 30 giây và 72 °C trong 60 giây) và 5 phút kéo dài ở 72 °C. Sản phẩm khuếch đại PCR được phân tích và kiểm tra kích thước bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1 % trong đệm TAE 1X. Gel sau đó sẽ được nhuộm với dung dịch nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV.

Phương pháp nuôi cấy rễ tơ

Tiến hành cân 0,3 g rễ tơ *in vitro* được nuôi lỏng lác trong Erlen 100 mL chứa 20 mL môi trường nuôi cấy trong điều kiện 80 vòng/phút, ở 25–28 °C.

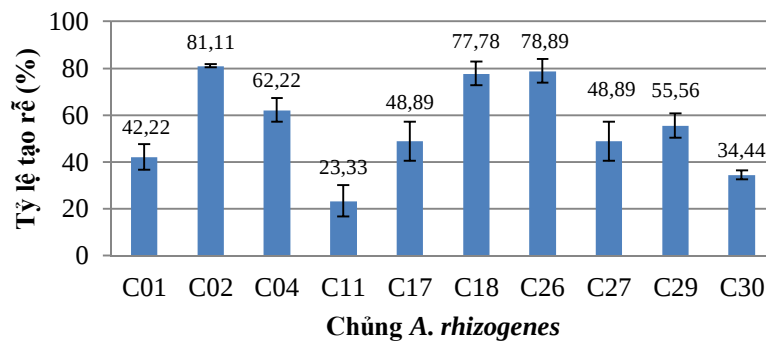
Xử lý thống kê

Số liệu thu được từ kết quả của các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2007, SPSS 20.0 phân nhóm các giá trị bằng phương pháp Duncan và so sánh các giá trị bằng phương pháp Dunnett. Kết quả được trình bày ở dạng: trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD).

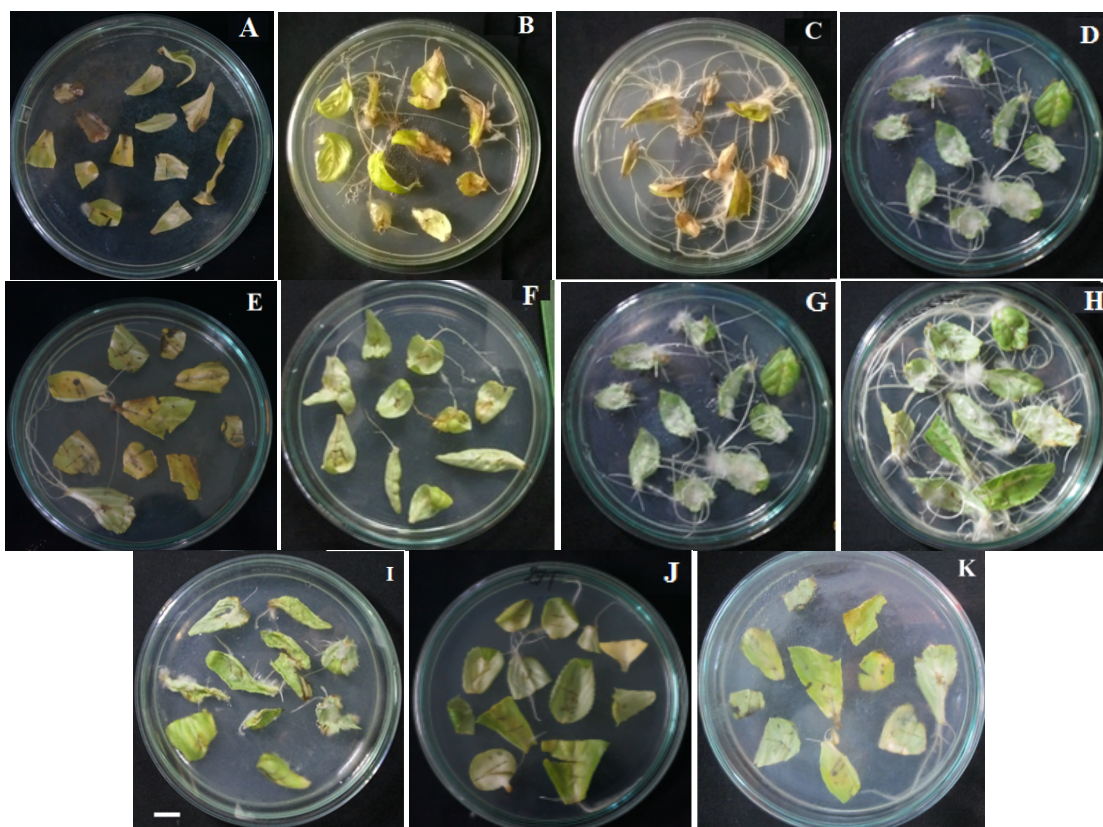
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc chủng *A. rhizogenes* có khả năng cảm ứng hình thành rễ tơ trên cây Hoa Móng tay

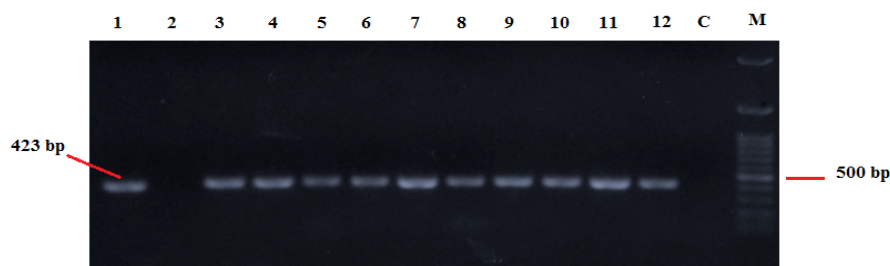
Trong 14 chủng *A. rhizogenes* khảo sát có 10 chủng cảm ứng tạo rễ tơ trên lá cây Hoa Móng tay đó là C01, C02, C04, C11, C17, C18, C26, C27, C29 và C30 với các tỷ lệ ra rễ khác nhau. Rễ hình thành ở vị trí gần vết thương và vết thương, có hình thái khác nhau phụ thuộc vào chủng vi khuẩn cảm ứng. Ở mẫu đối chứng không xảy ra hiện tượng ra rễ. Trong mười chủng cảm ứng hình thành rễ tơ ba chủng C02, C18 và C26 cho tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ cao hơn đáng kể so với các chủng còn lại với tỷ lệ tạo rễ lần lượt là 81,13 %; 77,76 % và 78,86 % trong đó rễ tạo thành phát triển nhanh, mạnh, nhiều tơ và phân nhánh nhiều (Hình 2). Khả năng cảm ứng hình thành rễ tơ còn phụ thuộc vào từng loài *A. rhizogenes* khác nhau [6]. Điều này cũng đã được chứng minh trong báo cáo về khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên các loài *Portulaca oleracea* từ 5 chủng *A. rhizogenes* cho thấy chủng *A. rhizogenes* 15834 cho tỷ lệ tạo rễ cao hơn (66 %) so với các chủng còn lại (K. Pirian và cộng sự, 2012) [1]. Ngoài ra, sự biến đổi hình thái rễ tơ được cảm ứng từ các chủng *A. rhizogenes* còn có thể phụ thuộc vào cấu trúc T-DNA khác nhau ở mỗi loài hiện diện trong rễ chuyển gen.



Hình 1. Tỷ lệ tạo rễ từ mô lá của các chủng *A. rhizogenes*



Hình 2. Mẫu rễ sau 14 ngày xâm nhiễm: A: mẫu đối chứng; B: C01; C: C02; D: C04; E: C11; F: C17; G: C18; H: C26; I: C27; J: C29; K: C30



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR *rolB*

1: sản phẩm PCR plasmid *A. rhizogenes*; 2: nước, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12: theo thứ tự lần lượt là sản phẩm PCR bộ gen của mẫu rễ tương ứng được cảm ứng bởi các chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* C01, C02, C04, C11, C17, C18, C26, C27, C29 và C30; C: rễ *in vitro* đối chứng, M: thang 100 bp

Sản phẩm PCR sau khi được điện di trên gel agarose và quan sát dưới đèn UV cho thấy các mẫu rễ tơ được cảm ứng từ mười chủng *A. rhizogenes* đều có xuất hiện vạch có kích thước khoảng 423 bp và trùng với vạch sản phẩm PCR plasmid của vi khuẩn *A. rhizogenes* (Hình 3). Kết quả điện di trên chứng tỏ các mẫu rễ được cảm ứng bởi các chủng vi khuẩn là các dòng rễ tơ được chuyển gen.

Khảo sát loại mô thích hợp để tạo rễ tơ

Thử nghiệm khả năng cảm ứng rễ tơ trên các loại mô khác nhau (lá, trụ hạ diệp và trụ thượng diệp), kết quả cho thấy loại mô thích hợp nhất

cho việc cảm ứng tạo rễ tơ ở cả ba chủng vi khuẩn là mô lá, với tỷ lệ tạo rễ lần lượt tương ứng là 83,33; 76,67 và 81,11 %. Ở từng loại mô cho tỷ lệ tạo rễ khác nhau có thể là do tùy vào bề mặt tiếp xúc với vết thương và cấu tạo các loại mô khác nhau. Kết quả này cũng trùng với kết quả của một số báo cáo trước đây. Trong nghiên cứu quy trình tạo rễ tơ trên *Portulaca oleracea* ghi nhận mẫu lá cho tỷ lệ tạo rễ cao hơn so với thân và rễ [1]. Kết quả nghiên cứu tạo rễ trên *Solanaceae* sử dụng mô lá làm vật liệu gây nhiễm cảm ứng tạo rễ tơ là cao nhất so với thân và trụ hạ diệp [6].

Bảng 1. Tỷ lệ tạo rễ tơ từ các loại mô khác nhau bằng ba chủng *A. rhizogenes*

Bộ phận	Tỷ lệ tạo rễ (%)		
	C02	C18	C26
Lá	83,33 ± 3,33 ^a	76,67 ± 3,33 ^a	81,11 ± 3,84 ^a
Trụ hạ diệp	36,67 ± 5,77 ^b	16,67 ± 5,77 ^b	70,00 ± 0,00 ^b
Trụ thượng diệp	46,67 ± 5,77 ^b	0,00 ^c	63,33 ± 5,77 ^b

Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột không cùng kí tự biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 0,05.

Khảo sát ảnh hưởng của OD dịch khuẩn lên sự hình thành rễ tơ cây Hoa Móng tay

Với kết quả thí nghiệm trong Bảng 2 cho thấy với OD khác nhau sẽ cho tỷ lệ tạo rễ khác nhau. Hai chủng C02 và C18 cho tỷ lệ tạo rễ cao nhất ở hai nồng độ OD là 0,5 và 1,0 (tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ đạt tương ứng là 81,11 và 80,00 % ở chủng C02 và 81,11 và 84,44 % ở chủng C18).

Trong khi đó chủng C26 ở hai nồng độ 1,0 và 1,5 cho tỷ lệ tạo rễ là cao nhất là 85,55 và 75,56 %. Với nồng độ OD 0,1 cho tỷ lệ ra rễ ở cả ba chủng là thấp nhất. Kết quả trên cho thấy với mỗi chủng *A. rhizogenes* khác nhau thì có một nồng độ OD xâm nhiễm khác nhau. Trong báo cáo khi nghiên cứu tạo rễ tơ đã tiến hành gây nhiễm trên mô chồi *in vitro* *Impatiens walleriana* L. với OD₆₀₀ = 0,98

đã cho tỷ lệ tạo rễ tơ là 100 % sau 10 ngày gây nhiễm [9]. Tương tự với nghiên cứu tạo rễ tơ trên *Impatiens hawkerii* Bull. được cảm ứng bằng *A.*

rhizogenes A4M70GUS với $OD_{600} = 0,6$ sau 10 ngày gây nhiễm cho tỷ lệ cảm ứng rễ tơ là 98 % [8].

Bảng 2. Tỷ lệ tạo rễ tơ được cảm ứng bởi các ba chủng *A. rhizogenes* với OD khác nhau

OD	Tỷ lệ tạo rễ (%)		
	C02	C18	C26
0,1	42,22 ± 8,39 ^c	54,44 ± 6,94 ^c	34,44 ± 6,94 ^c
0,5	81,11 ± 3,85 ^a	81,11 ± 5,09 ^a	65,56 ± 5,09 ^b
1,0	80,00 ± 5,77 ^a	84,44 ± 5,09 ^{ab}	85,55 ± 3,84 ^a
1,5	67,78 ± 1,92 ^b	72,22 ± 1,93 ^b	75,56 ± 10,71 ^a

Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột không cùng kí tự biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 0,05.

Nồng độ vi khuẩn đóng một vai trò quan trọng trong việc cảm ứng hình thành rễ tơ. Với nồng độ dưới mức tối ưu dẫn đến sự hạn chế của vi khuẩn để chuyển các tế bào thực vật trong khi mật độ cao có thể làm giảm tỷ lệ tạo rễ bằng cách ức chế cạnh tranh do *A. rhizogenes* cũng là một loài gây bệnh trên thực vật vì thế khi nồng độ tế bào quá cao làm ảnh hưởng tổn thương nặng hơn đến các tế bào thực vật làm chết tế bào.

Ảnh hưởng của thời gian ngâm mẫu

Với các mốc thời gian khảo sát trong cả ba chủng *A. Rhizogenes*, thời gian ngâm mẫu từ 5

đến 15 phút đều cho cho tỷ lệ tạo rễ cao nhất. Kết quả tỷ lệ tạo rễ tương ứng với các mốc thời gian ngâm mẫu ở cả ba chủng là: chủng C02 (70,00; 77,78 và 76,67 %), chủng C18 (67,78; 76,67 và 73,33 %) và chủng C26 (70,00; 81,11 và 82,22 %). Thời gian ngâm mẫu 20 phút cho kết quả tỷ lệ cảm ứng ra rễ thấp nhất ở chủng C02 là 57,78 %; chủng C18 là 40,00 % và chủng C26 là 64,44 %. Các số liệu trên cho thấy các chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* có khả năng cảm ứng tạo rễ không giống nhau với các mốc thời gian ngâm mẫu khác nhau.

Bảng 3. Tỷ lệ tạo rễ tơ được cảm ứng bởi các chủng *A. rhizogenes* với thời gian ngâm mẫu khác nhau

Thời gian ngâm mẫu (phút)	Tỷ lệ tạo rễ (%)		
	C02	C18	C26
5	70,00 ± 5,78 ^a	67,78 ± 9,62 ^a	70,00 ± 3,33 ^{ab}
10	77,78 ± 5,09 ^a	76,67 ± 6,67 ^a	81,11 ± 3,85 ^a
15	76,67 ± 3,33 ^a	73,33 ± 8,81 ^a	82,22 ± 6,93 ^a
20	57,78 ± 6,93 ^b	40,00 ± 8,81 ^b	64,44 ± 10,01 ^b

Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột không cùng kí tự biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 0,05.

Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy

Thời gian đồng nuôi cấy là một yếu tố quan trọng trong quá trình chuyển gen. Vi khuẩn *A. rhizogenes* cần có khoảng thời gian thích hợp để xâm nhiễm vào mô thực vật qua các vết thương từ đó chuyển gen vào bộ gen tế bào thực vật. Với thời gian đồng nuôi cấy là 72 giờ, tỷ lệ tạo rễ cao

nhất ở cả ba chủng C02; C18 và C26 (tỷ lệ cảm ứng rễ tơ đạt 81,11; 85,56 và 87,78 % tương ứng). Tỷ lệ tạo rễ tăng dần khi tăng thời gian đồng nuôi cấy từ 24 đến 72 giờ và giảm tỷ lệ ở 96 giờ. Với thời gian là 72 giờ có tỷ lệ tạo rễ cao nhất đây có thể là thời gian đồng nuôi cấy thích hợp cho vi khuẩn xâm nhiễm chuyển gen vào tế

bào mô lá. Với thời gian đồng nuôi cấy ở 96 giờ có thể ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen do sự gia tăng mật độ vi khuẩn, điều này dẫn đến quá trình ức chế cạnh tranh với tế bào thực vật và trong thời gian đồng nuôi cấy này xuất hiện một số mẫu chết bởi tế bào vi khuẩn bao quanh [12]. Kết quả tương tự trong nghiên cứu trên

Plumbago zeylanica L. khi khảo sát ảnh hưởng thời gian đồng nuôi cấy từ 1 đến 5 ngày cho thấy tỷ lệ tạo rễ tăng khi thời gian đồng nuôi cấy từ 1 đến 3 ngày và giảm ở các ngày còn lại, nguyên nhân do sự gia tăng của mật độ vi khuẩn gây chết mô [11].

Bảng 4. Tỷ lệ tạo rễ tơ được cảm ứng bởi chủng *A. rhizogenes* với thời gian đồng nuôi cấy khác nhau

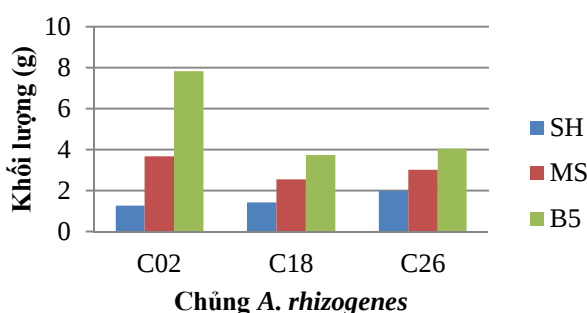
Thời gian đồng nuôi cấy (giờ)	Tỷ lệ tạo rễ (%)		
	C02	C18	C26
24	30,00 ± 3,33 ^c	20,00 ± 3,33 ^d	21,11 ± 10,71 ^b
48	46,67 ± 12,01 ^b	38,89 ± 11,70 ^c	35,56 ± 13,47 ^b
72	81,11 ± 1,92 ^a	85,56 ± 6,93 ^a	87,78 ± 1,92 ^a
96	56,67 ± 8,81 ^b	61,11 ± 11,70 ^b	76,67 ± 8,81 ^a

Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột không cùng kí tự biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 0,05.

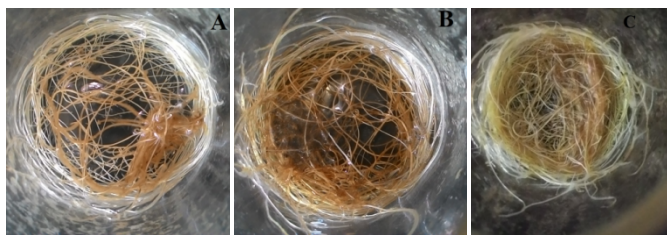
Khảo sát môi trường nuôi cấy rễ thích hợp

Kết quả tăng trưởng rễ được thể hiện qua sự chênh lệch khối lượng $\Delta(g)$. Mỗi loài thực vật có sự hấp thu khác nhau về thành phần môi trường. Với môi trường nuôi cấy B5, các dòng rễ tơ được cảm ứng từ cả 3 chủng khảo sát đều cho khối lượng rễ tơ cao hơn so với hai môi trường còn lại. Khối lượng rễ tơ sau 25 ngày nuôi cấy ở chủng C02 là 7,82 g (tăng 26 lần); C18 là 3,74 g (tăng 12,5 lần) và C26 là 4,06 g (tăng 13,5 lần). Trong đó dòng rễ tơ được cảm ứng từ chủng C02 sinh trưởng mạnh gần gấp đôi với hai chủng C18 và

C26. Các kết quả trên tương tự như trong báo cáo (Shih-Hung Huang và cộng sự, 2014) với môi trường B5 là môi trường nuôi cấy rễ tơ *Gentiana scabra* thích hợp nhất sau 5 tuần nuôi cấy khối lượng rễ tăng lên 46 lần [7]. Tương tự với kết quả khi khảo sát khả năng sinh trưởng của rễ tơ trên cây *Artemisia annua* L. và *Momordica charantia* trong các môi trường nuôi cấy khác nhau cho thấy môi trường B5 cho kết quả rễ tơ sinh trưởng tốt nhất so với các môi trường khảo sát khác [10, 2].



Hình 4. Ảnh hưởng của các loại môi trường lên khả năng sinh trưởng của rễ



Hình 5. Rễ tơ được cảm ứng từ chủng C02 sau 25 ngày nuôi cấy: A: môi trường SH; B: môi trường MS; C: môi trường B5

Kết quả trên cho thấy các dòng rễ tơ cây Hoa Móng tay có tốc độ sinh trưởng nhanh nên có triển vọng ứng dụng thực tiễn cao. Cần tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lý hóa để nâng cao sinh khối rễ cũng như hàm lượng hoạt chất có trong rễ, đồng thời thiết lập quy trình nuôi cấy sinh khối ở quy mô lớn (bioreactor) phục vụ sản xuất hợp chất thứ cấp dùng trong lĩnh vực y dược.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã chọn lọc được ba chủng vi khuẩn (C02, C18 và C26) cho tỷ lệ cảm ứng hình thành rễ tơ cao trên cây Hoa Móng tay và khảo

sát được một số yếu tố ảnh hưởng lên khả năng tạo rễ tơ từ các chủng chọn lọc. Trong đó mô lá là vật liệu thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ trên cây Hoa Móng tay khi xâm nhiễm với mật độ khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 1,0$ với thời gian gây nhiễm là 5 đến 15 phút và thời gian đồng nuôi cấy là 72 giờ. Qua kết quả kiểm tra gen *rolB* bằng phương pháp PCR, các dòng rễ đều mang gen chuyển. Môi trường B5 là môi trường thích hợp cho sự tăng sinh khối rễ tơ. Dòng rễ tơ được cảm ứng từ chủng C02 cho khả năng sinh trưởng nhanh nhất.

Hairy induction from *Impatiens balsamina* L. using fourteen *Agrobacterium rhizogenes* strains

- **Phan Trung Hai**
- **Quach Ngo Diem Phuong**
University of Science, VNU-HCM
- **Nguyen Nhu Nhut**
Gia Tuong Company, the Binh Duong province branch

ABSTRACT

Impatiens balsamina L. is a plant commonly grown in Vietnam. It has long been used as traditional medicine. All of the secondary metabolites produced by *Impatiens balsamina* L. root possessed biological activities. The main advantage of using hairy root cultures is their ability of growing fast in defined basal media without supplementation of phytohormones. The aim of this research is to invest some factors that could affect on the hairy root production such as

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *Impatiens balsamina* L.

A. rhizogenes strain, type of tissue, OD concentration, immersion time and co-cultivation time. The results showed that 3 strain *A. rhizogenes* C02, C18 and C26 isolated from nature in Vietnam could induce the best hairy root formation at the 0.5–1.0 OD concentration bacteria with 5' of immersion time and 72 hours of co-cultivating. Among them, C02 is the strain that could offer the best result in B5 medium.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. K. Pirian, K. Piri, T. Ghiyasvand, Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production, *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.*, 3, 642-649 (2012).
- [2]. M. Thiruvengadam, N. Praveen, K. M. Maria John, Y.S. Yang, S.H. Kim, I.M. Chung, Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 118, 545-557 (2014).
- [3]. R.R. Manikandan, H.K. Prabhavathi, K. Sundaram, Efficiency of *Impatiens balsamina* extracts for antimicrobial activity, *A Journal of Science and Technology*, 2, 68-72 (2011).
- [4]. M. Akramian, S.M.F. Tabatabaei, M. Mirmasoumi, Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 3, 759-763 (2008).
- [5]. S.U. Park, P.J. Facchini, *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and *California poppy*, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures, *Journal of Experimental Botany*, 51, 1005–1016 (2000).
- [6]. P.K. Pawar, V.L. Maheshwari, *Agrobacterium Rhizogenes* Mediated hairy root induction in two medicinally important members of family *Solanaceae*, *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 3, 414-417 (2004).

-
- [7]. S.H. Huang, R.K. Vishwakarma, T.T. Lee, H.S. Chan, H.S. Tsay, Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*, *Bot. Stud.*, 55, 1-8 (2014).
- [8]. S. Milošević, A. Subotić, A. Cingel, S. Jevremović, S. Ninković, Efficient genetic transformation of *Impatiens hawkerii* Bull. (Balsamiaceae) using *Agrobacterium rhizogenes*, *Archives of Biological Sciences*, 61, 467-474 (2009).
- [9]. S. Milošević, M. Lojić, D. AntoniĆ, A. Cingel, A. Subotić, Changes of antioxidative enzymes in *Impatiens walleriana* L. shoots in response to genetic transformation, *Genetika*, 47, 1, 71- 84 (2015).
- [10]. S. Ahlawat, P.I. Saxena, M. Ram, P. Alam, T. Nafis, A. Mohd, M.Z. Abdin, Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots for enhanced production of artemisinin in *Artemisia annua* L. plants, *African J. Biotechnol.*, 11, 8684-8691 (2012).
- [11]. I. Sivanesan, B.R. Jeong, Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L., *Journal of Biotechnology*, 8, 5294-5300 (2009).
- [12]. J. Su, R.Q. Duan, C.Q. Hu, Y.P. Li, F. Wang, Regeneration, agrobacterium-mediated transformation for Chinese cabbage, *Fujian J. Agric. Sci.*, 17, 241-243 (2002).
- [13]. V. Veena, C.G. Taylor, *Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 43, 383-403 (2007).
- [14]. Z.S. Ding, F.S. Jiang, N.P. Chen, G.Y. Lv, C.G. Zhu, Isolation and Identification of an anti-tumor component from leaves of *Impatiens balsamina*, *Molecules* 2008, 13, 220-229 (2008).