

Nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ cây cát cánh (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) từ bốn chủng *Agrobacterium rhizogenes*

- Trà Đông Phương
- Vũ Thị Bạch Phượng
- Quách Ngô Diễm Phương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 03 tháng 02 năm 2016, nhận đăng ngày 02 tháng 12 năm 2016)

TÓM TẮT

Cát cánh (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.), loài duy nhất trong chi *Platycodon* (*Campanulaceae*), được phân bố chủ yếu ở vùng Đông Á. Rễ cát cánh là vị thuốc được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để chữa ho, đau họng, suyễn, lao, tiểu đường và một số bệnh viêm nhiễm. Các nghiên cứu hiện đại đã chứng minh rễ cát cánh chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học. Vì vậy, để nghiên cứu và thu nhận các hợp chất có giá trị từ rễ cát cánh, kỹ thuật cảm ứng tạo rễ tơ nhằm tạo nguồn nguyên liệu ban đầu ổn định, có khả năng tăng sinh nhanh (trong môi trường không có hormone) và sản xuất nhiều hợp chất thứ cấp đã được xây dựng trên loài thực vật này. Để thực hiện kỹ thuật trên, *Agrobacterium rhizogenes* – một công cụ chuyển gene tự nhiên có thể chuyển DNA vào bộ gene thực vật – đã

được sử dụng. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ cát cánh. Hai gene *rolB* và *rolC* chịu trách nhiệm cảm ứng tạo rễ tơ khi được kiểm tra đã sát nhập thành công vào bộ gene rễ tơ cát cánh. Lá cát cánh là nguyên liệu được cảm ứng tốt nhất với 100 % số mẫu có khả năng tạo rễ tơ. Quy trình được tối ưu hóa thời gian ngâm mẫu và thời gian đồng nuôi cấy với kết quả tốt nhất tương ứng là 10 và 15 phút (10 phút cho chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và 15 phút cho chủng *A. rhizogenes* C34) và 72 giờ. Trong tương lai, kỹ thuật cảm ứng tạo rễ tơ cát cánh được mô tả trong nghiên cứu này là một kỹ thuật hữu ích, có thể được áp dụng cho nghiên cứu và thu nhận các hợp chất thứ cấp có giá trị từ nuôi cấy rễ tơ cát cánh.

Từ khoá: *Agrobacterium rhizogenes*, gene *rol*, gene *virG*, *Platycodon grandiflorum*, rễ tơ

MỞ ĐẦU

Kỹ thuật nuôi cấy rễ tơ hiện đang là một kỹ thuật có khả năng cung cấp nguồn nguyên liệu rễ một cách chủ động cho việc thu nhận các hợp chất thứ cấp hữu ích được sử dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm [6]. Rễ tơ được hình thành từ sự chuyển gene thông qua sự xâm nhiễm của *Agrobacterium rhizogenes* – một vi khuẩn đất gram âm mang plasmide Ri. *A. rhizogenes* có thể chuyển đoạn T-DNA từ plasmide Ri vào bộ gene tế bào thực vật tại vùng mô bị vi khuẩn này xâm nhiễm. T-DNA mang 18

khung đọc mở (ORF), 4 trong số 18 ORF đó chứa gene *rolA*, *rolB*, *rolC* và *rolD*. Gene *rolB* là gene chịu trách nhiệm chính trong sự cảm ứng tạo thành rễ tơ [6, 13]. Rễ tơ ổn định về mặt di truyền hơn mô và tế bào thực vật *in vitro* khác, phát triển nhanh hơn các cơ quan thực vật bình thường mà không cần hormone ngoại sinh và chúng có thể tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp với lượng tương đương hoặc thậm chí lớn hơn cây mẹ [24]. Điều này cho thấy rễ tơ của

nhiều loài thực vật là một nguồn nguyên liệu đầy hứa hẹn chứa nhiều hợp chất có giá trị.

Cát cánh (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) là loài duy nhất trong chi *Platycodon* (Campanulaceae). Từ hơn 2000 năm về trước, rễ cát cánh là vị thuốc phổ biến được sử dụng trong nhiều bài thuốc cổ truyền ở châu Á để chữa ho, đau họng, suyễn, lao và một số bệnh viêm nhiễm [23]. Trong những năm gần đây, các nghiên cứu trên cây cát cánh chủ yếu tập trung vào hoạt tính sinh học của nó như kháng u, kháng oxy hóa, kháng viêm, chống đái tháo đường, điều hòa miễn dịch, ... [14, 23]. Rễ cát cánh chứa nhiều nhóm chất khác nhau bao gồm các triterpenoid, saponine, flavonoid, anthocyanine, phenolic, polysaccharide, ... mà trong đó, triterpenoid và saponine là các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng [9, 10, 18, 22]. Vì vậy, để nghiên cứu và thu nhận nhiều chất chuyển hóa khác nhau từ rễ cát cánh, kĩ thuật cảm ứng tạo rễ tơ nhằm thu nhận nguồn nguyên liệu ban đầu ổn định, có khả năng tăng sinh nhanh (trong môi trường không có hormone) và sản xuất nhiều hợp chất thứ cấp đã được xây dựng trên loài thực vật này.

Trong báo cáo này, chúng tôi tập trung nghiên cứu kĩ thuật tạo rễ tơ cát cánh (bằng cách sử dụng các chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* xâm nhiễm vào lá, thân và rễ cây cát cánh). Kĩ thuật này sẽ hữu ích để nghiên cứu về rễ tơ và ứng dụng sản xuất các hợp chất thứ cấp có giá trị từ quá trình nuôi cấy rễ tơ cát cánh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu sinh học

Hạt cát cánh thuần chủng được mua từ Trung tâm nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội.

Chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 được mua từ ngân hàng RIKEN-BRC thông qua dự án của MEXT Nhật Bản. Các chủng *A. rhizogenes* C25, C31, C34 được cung cấp bởi

Công ty TNHH Gia Tường, chi nhánh tỉnh Bình Dương.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường Murashige và Skoog (MS) bổ sung 30 g/L sucrose và 8 g/L agar dùng để nuôi cấy mô thực vật *in vitro*. Môi trường MS được điều chỉnh về pH 5,8 trước khi thêm agar rồi hấp khử trùng ở 121 °C trong 20 phút.

Môi trường Nutrient Broth (NB) được sử dụng để lưu trữ và tăng sinh các chủng vi khuẩn *A. rhizogenes*. Môi trường NB được điều chỉnh về pH 7,0 trước khi bổ sung 17 g/L agar và hấp khử trùng ở 121 °C trong 20 phút.

Phương pháp

Phương pháp khử trùng hạt tạo cây con *in vitro*

Hạt cát cánh sau khi lã 20 phút trong nước xà phòng được lần lượt khử trùng bề mặt với ethanol 70 % (v/v) trong 90 giây và javel 10 % (v/v) trong 10 phút. Sau đó, hạt được rửa 5 lần với nước cất đã hấp khử trùng. Hạt sau khi khử trùng được gieo trên môi trường MS rắn. Hạt đã gieo được cho nảy mầm và phát triển trong phòng nuôi cấy ở nhiệt độ 25 °C, ánh sáng trắng 16 giờ trong ngày, cường độ ánh sáng 2500 lux.

Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *A. rhizogenes*

Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *A. rhizogenes* được cải tiến từ các phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *A. rhizogenes* của Mano (1986) [11], Gai [5] và Shilpha (2015) [19]. Các chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834, C25, C31 và C34 được hoạt hóa trong 25 mL môi trường NB lỏng ở 25 °C, không có ánh sáng, lắc với tốc độ 130–150 vòng/phút trong 72 giờ. Dịch khuẩn *A. rhizogenes* thu được sau 72 giờ nuôi cấy với OD_{600nm} = 0,5–1,0 được sử dụng để xâm nhiễm vào mô thực vật.

Phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ cát cánh

Tách rời riêng lẻ từng cơ quan cây cát cánh *in vitro* (lá, thân và rễ), tạo vết thương ở mỗi cơ quan rồi nhúng vào dịch khuẩn *A. rhizogenes*

ATCC 15834, C25, C31 và C34. Sau đó, các mẫu mô được làm khô bằng giấy thấm vô trùng và đồng nuôi cấy trên môi trường MS rắn trong điều kiện không có ánh sáng. Sau thời gian đồng nuôi cấy, các mẫu mô được cấy chuyển sang môi trường MS mới không chứa hormone, có bổ sung 250 mg/L cefotaxime. Rễ mọc ra từ vị trí vết thương trên mẫu mô được giả định là rễ tơ sẽ được cấy chuyển sang môi trường MS mới. Tất cả các thao tác và nuôi cấy đều được thực hiện ở nhiệt độ 25 °C.

Phần trăm số mẫu tạo rễ tơ được tính theo công thức:

$$\text{Phần trăm số mẫu tạo rễ tơ (\%)} = \frac{\text{số mẫu tạo rễ tơ}}{\text{tổng số mẫu xâm nhiễm}} \times 100 \%$$

Phương pháp PCR kiểm tra gene chuyển

Rễ tơ cắt cánh giả định được thu nhận và bảo quản trong ống eppendorf sạch ở -20 °C trước khi sử dụng để tách chiết DNA. DNA bộ gene của rễ tơ cắt cánh được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle & Doyle (1987) [3] nhưng đã được thay đổi một số yếu tố để phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm. Trình tự primer dùng cho phản ứng PCR ở các gene *rolB*, *rolC* và *virG* được thể hiện ở Bảng 1.

Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25 µL bao gồm: 2 µL DNA; 0,5 µM primer; 0,2 mM mỗi loại dATP, dCTP, dGTP và dTTP; dung dịch đệm phản ứng PCR 1X, 1U Taq polymerase và nước cất vô trùng vừa đủ 25 µL. Trong phản ứng PCR ở mỗi primer, một chứng âm và chứng dương với thành phần tương tự nhưng thể tích DNA nạp vào phản ứng sẽ được thay thế tương ứng bằng nước hấp khử trùng và DNA tổng số của *A. rhizogenes* để tránh những giải thích sai lầm.

Phản ứng PCR được thực hiện gồm các bước: biến tính bước đầu (95 °C/5 phút), 35 chu kì lặp lại (94 °C/0,5 phút, 54 °C/0,5 phút, 72 °C/1 phút) và bước kéo dài cuối cùng (72 °C/5 phút). Sản phẩm thu được sau phản ứng PCR được phân tích trên gel agarose 1,5 % (w/v). Gel được nhuộm với ethidium bromide và soi trên bàn đèn UV để phát hiện sự hiện diện của DNA đích.

Phương pháp xử lí số liệu thống kê

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần với số mẫu trên mỗi nghiệm thức từ 30–35 mẫu. Số liệu thu được từ kết quả của thí nghiệm được phân tích thô, vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và được xử lí thống kê bằng phần mềm SPSS 16.0 (phân nhóm các giá trị bằng phương pháp Duncan với độ tin cậy 95 %).

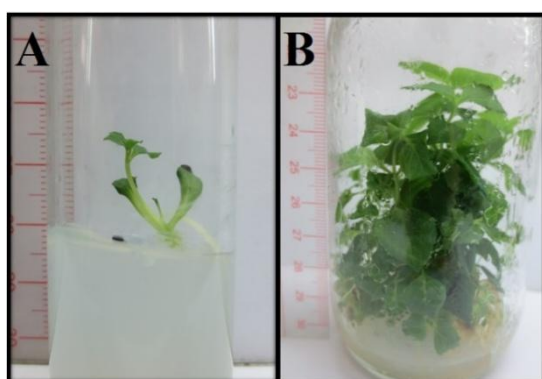
Bảng 1. Trình tự primer cho phản ứng PCR gene *rolB*, *rolC* và *virG*

Gene	Tên primer	Trình tự primer (5' – 3')
<i>rolB</i>	<i>rolB</i> F	GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT
	<i>rolB</i> R	GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC
<i>rolC</i>	<i>rolC</i> F	CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC
	<i>rolC</i> R	TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA
<i>virG</i>	<i>virG</i> F	TTA TCT GAG TGA AGT CGT CTC
	<i>virG</i> R	CGT CGC CTG AGA TTA AGT GTC

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khử trùng hạt tạo cây cát cánh *in vitro*

Hạt cát cánh đã được khử trùng và gieo trên môi trường MS có tỉ lệ nảy mầm trên 70 %. 25–40 ngày sau khử trùng, hạt cát cánh đã nảy mầm và tăng trưởng thành cây con với chiều cao từ 1 đến 2 cm, có 2 đến 4 cặp lá (Hình 1A). Cây con lúc này được cấy chuyển sang môi trường MS mới giúp cây phát triển tốt hơn. Sau 75–120 ngày nuôi cấy, cây cát cánh đạt chiều cao từ 5–10 cm, có hơn 6 cặp lá, cây xanh tốt, lá dày, to rộng (Hình 1B) được sử dụng để xâm nhiễm vi khuẩn tạo rễ tơ.



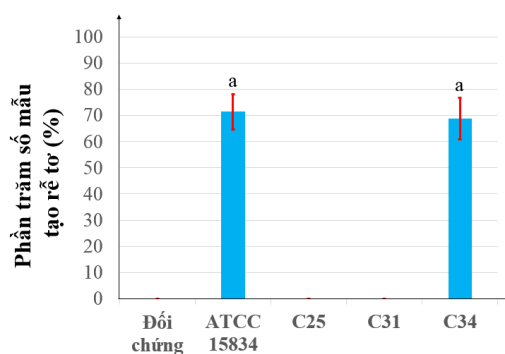
Hình 1. Cây cát cánh *in vitro* mọc từ hạt được khử trùng sau 30 ngày (A) và 90 ngày (B)

Sàng lọc chủng *A. rhizogenes* thích hợp có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ

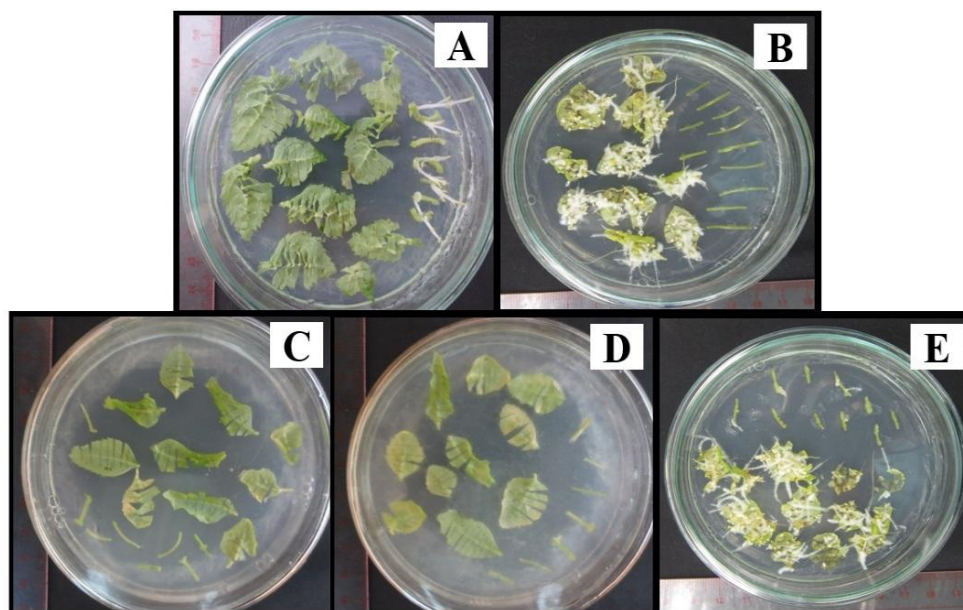
Cây cát cánh được cắt ra thành từng cơ quan, tạo vết thương, ngâm trong dịch khuẩn *A. rhizogenes* 20 phút và đồng nuôi cấy trong 96 giờ. Sau 2–6 tuần xâm nhiễm với các chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834, C25, C31 và C34, có 2 chủng (*A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 với phần trăm số mẫu tạo rễ tơ tương ứng là $71,35 \pm 6,64\%$ và $68,81 \pm 7,84\%$, không có sự khác biệt khi xử lí số liệu thống kê giữa 2 chủng này) trong số 4 chủng có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên các mẫu mô cát cánh. Ngược lại, mẫu đối chứng, mẫu được cảm ứng với chủng *A. rhizogenes* C25

và C31 lại không có hiện tượng ra rễ tơ (Hình 2 và 3).

Hiệu quả tạo rễ tơ ở mô thực vật có sự phụ thuộc vào loài thực vật và chủng *A. rhizogenes* xâm nhiễm. Chandran và Potty (2011) nhận thấy ở nhiều loài thực vật (*Ipomoea batatas*, *Solenostemon rotundifolius*, *Vigna vexillata* và *Canavalia* sp.), các chủng *A. rhizogenes* khác nhau cho hiệu quả xâm nhiễm khác nhau, trong đó chủng ATCC 15834 có khả năng xâm nhiễm hiệu quả nhất [2]. Chủng LB510 xâm nhiễm tốt trên *Talinum paniculatum* nhưng lại không tốt với *Artemisia annua* và *Artemisia cina* trong khi chủng ATCC 15834 và YMB072001 lại có khả năng xâm nhiễm rất tốt trên hai loài thực vật này [4, 12]. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên các mẫu mô cát cánh *in vitro* tốt nhất ở hai chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 nhưng lại không hiệu quả ở hai chủng *A. rhizogenes* C25 và C31. Kết quả này chứng tỏ các chủng *A. rhizogenes* khác nhau có thể có sự khác biệt về khả năng cảm ứng tạo rễ tơ ở cây cát cánh mà nguyên nhân này có thể là do sự khác biệt trong plasmide của từng chủng vi khuẩn dẫn đến hiệu quả chuyển gene khác nhau [1]. Hai chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 được chúng tôi lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Phần trăm số mẫu tạo rễ tơ ở các chủng *A. rhizogenes* khác nhau. Kí hiệu a thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nhóm thí nghiệm

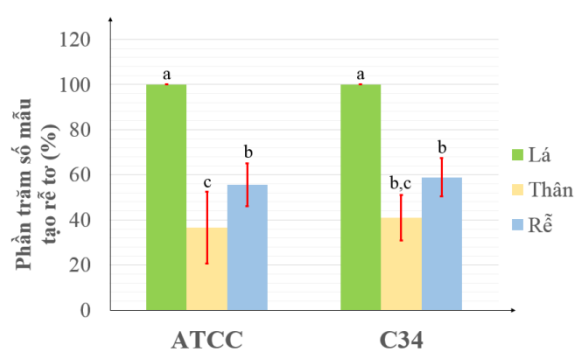


Hình 3. Sự tạo rễ tơ sau 3 tuần xâm nhiễm. A) mẫu đối chứng, B) *A. rhizogenes* ATCC 15834, C) *A. rhizogenes* C25, D) *A. rhizogenes* C31 và E) *A. rhizogenes* C34

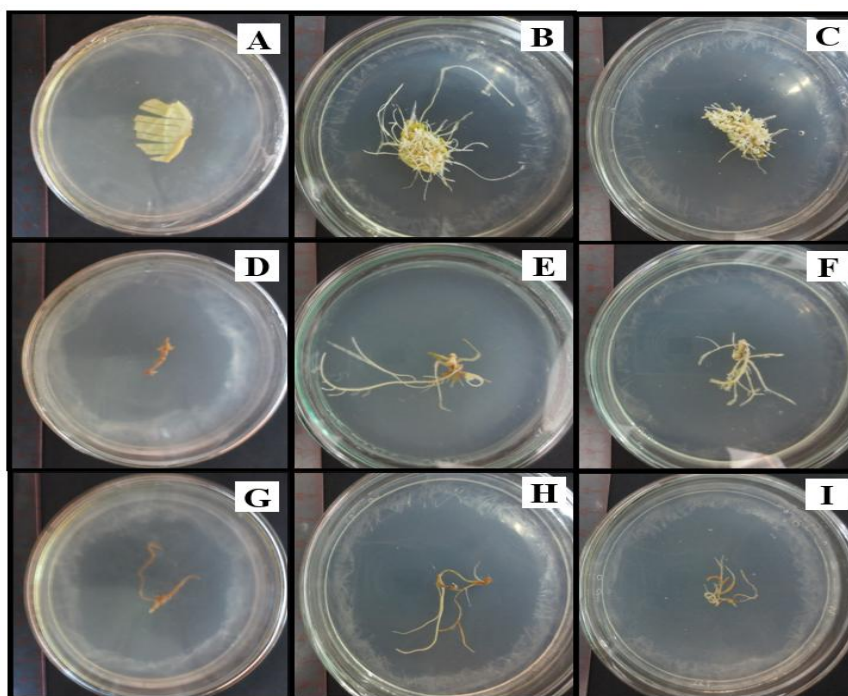
Loại mô thích hợp tạo rễ tơ cát cánh

Từng loại cơ quan (lá, thân, rễ) của cây cát cánh được tạo vết thương, ngâm trong dịch khuẩn 20 phút và đồng nuôi cấy trên môi trường MS trong 96 giờ. Phần trăm số mẫu tạo rễ tơ được ghi nhận sau 2–6 tuần kể từ khi mẫu mô bị xâm nhiễm bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 (Hình 4). Kết quả cho thấy các cơ quan khác nhau khi bị xâm nhiễm bởi *A. rhizogenes* tạo rễ tơ với tỉ lệ khác nhau. Rễ được hình thành từ vị trí vết thương hoặc gần vết thương có một số đặc điểm chung như: mọc nhiều, mảnh, dài và có lông hút (Hình 5). Lá là cơ quan tạo rễ tơ cao nhất ($100,00 \pm 0,00$ % số mẫu đều tạo rễ tơ với hai chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34), thân và rễ có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ thấp hơn (tương ứng $36,69 \pm 15,95$ % và $55,56 \pm 9,62$ % số mẫu tạo rễ tơ do chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834; $40,95 \pm 10,14$ % và $58,89 \pm 8,39$

% số mẫu tạo rễ tơ do chủng *A. rhizogenes* C34). Điều này cho thấy rằng sự chuyển gene của *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 vào tế bào ở mô lá hiệu quả hơn so với ở thân và rễ.



Hình 4. Phần trăm số mẫu tạo rễ tơ ở các cơ quan khác nhau khi xâm nhiễm với *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34. Kí hiệu a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nhóm thí nghiệm



Hình 5. Sự tạo rễ tơ ở các cơ quan cây cát cánh sau 5 tuần xâm nhiễm. A, D, G tương ứng là lá, thân, rễ đối chứng. B, E, H tương ứng là lá, thân, rễ cát cánh được cảm ứng bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834. C, F, I tương ứng là lá, thân, rễ được cảm ứng bởi *A. rhizogenes* C34

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh hiệu quả tạo rễ tơ bởi sự xâm nhiễm của *A. rhizogenes* có sự phụ thuộc vào loại mô, cơ quan hay vị trí của cơ thể thực vật mà *A. rhizogenes* xâm nhiễm, trong đó lá (đặc biệt là vùng gân lá) thông thường cho tỉ lệ xâm nhiễm cao hơn các bộ phận còn lại [2, 16, 17]. Kết quả cho thấy: ở cây cát cánh, lá là cơ quan thích hợp cho sự tạo rễ tơ thông qua sự xâm nhiễm của *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34. Tỉ lệ tạo rễ tơ ở lá cao không những liên quan đến độ nhạy cảm của lá với *A. rhizogenes* hơn so với các vùng mô khác mà còn phụ thuộc vào tình trạng sinh lý của từng vùng mô (các vùng/bộ phận non thích hợp hơn cho sự xâm nhiễm) [17]. Từ thí nghiệm này, lá cát cánh được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian ngâm mẫu trong dịch khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34

Lá cát cánh được tạo vết thương, ngâm trong dịch khuẩn từng khoảng thời gian khác nhau (5,

10, 15, 20 và 30 phút) và đồng nuôi cấy trên môi trường MS trong 96 giờ. Ngâm mẫu đã được tạo vết thương vào dịch khuẩn giúp tạo điều kiện để mẫu tiếp xúc trực tiếp với vi khuẩn, đồng thời kích thích tín hiệu giải phóng từ tế bào thực vật kích hoạt sự hoạt động của gene *vir* dẫn tới sự bám của *A. rhizogenes* lên vị trí bị thương của mẫu [7].

Phân trăm trung bình số mẫu tạo rễ tơ và thời gian xuất hiện rễ tơ ở lá được ghi nhận ở Bảng 2 và Bảng 3. Dựa vào kết quả này, chúng tôi nhận thấy ở các mốc thời gian ngâm mẫu được khảo sát, *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 đều cho tỉ lệ mẫu tạo rễ tơ trên 79 %. Thời gian xuất hiện rễ tơ dao động từ 12 đến 20 ngày ở chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và từ 13 đến 24 ngày ở chủng *A. rhizogenes* C34. Thời gian hình thành rễ tơ, thường trong phạm vi 1 tuần đến hơn 1 tháng, phụ thuộc vào loài thực vật và chủng vi khuẩn xâm nhiễm [8, 15].

Bảng 2. Phần trăm số mẫu lá cắt cánh tạo rễ tơ và thời gian xuất hiện rễ tơ khi ngâm trong dịch khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 ở những khoảng thời gian khác nhau

Thời gian ngâm mẫu (phút)	5	10	15	20	30
Phần trăm trung bình số mẫu lá tạo rễ tơ (%)	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	79,24 ± 9,38 ^b
Thời gian xuất hiện rễ tơ (ngày)	20,00 ± 7,21 ^a	12,67 ± 2,31 ^b	12,33 ± 1,15 ^b	14,67 ± 1,53 ^a	17,67 ± 2,52 ^a

Ghi chú: kí hiệu a, b thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nhóm thí nghiệm trong cùng một chỉ tiêu theo dõi

Bảng 3. Phần trăm số mẫu lá cắt cánh tạo rễ tơ và thời gian xuất hiện rễ tơ khi ngâm trong dịch khuẩn *A. rhizogenes* C34 ở những khoảng thời gian khác nhau

Thời gian ngâm mẫu (phút)	5	10	15	20	30
Phần trăm trung bình số mẫu lá tạo rễ tơ (%)	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	82,31 ± 6,83 ^b
Thời gian xuất hiện rễ tơ (ngày)	24,33 ± 5,03 ^a	14,67 ± 2,51 ^b	13,67 ± 1,53 ^c	16,33 ± 2,08 ^b	19,67 ± 1,15 ^{a, b}

Ghi chú: kí hiệu a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nhóm thí nghiệm trong cùng một chỉ tiêu theo dõi

Chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 có khả năng xâm nhiễm tốt nhất vào lá trong khoảng thời gian ngâm mẫu từ 10 đến 15 phút ($100,00 \pm 0,00$ % số mẫu lá tạo rễ tơ, khi ngâm mẫu trong dịch khuẩn 10 và 15 phút thì số ngày xuất hiện rễ tương ứng là $12,67 \pm 2,31$ và $12,33 \pm 1,15$ ngày, số liệu không có sự khác biệt khi được xử lí thống kê). *A. rhizogenes* C34 có thời gian ngâm mẫu tốt nhất là 15 phút ($100 \pm 0,00$ % số mẫu lá tạo rễ tơ và số ngày xuất hiện rễ là $13,67 \pm 1,53$ ngày). Thời gian ngâm mẫu dài (từ 30 phút trở đi) đều cho hiệu quả chuyển gene thấp hơn ở cả 2 chủng *A. rhizogenes*. Vậy, thời gian ngâm mẫu 10 phút và 15 phút tương ứng với chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy lên quá trình cảm ứng tạo rễ tơ

Lá cắt cánh được tạo vết thương, ngâm trong dịch khuẩn 10 hoặc 15 phút (tương ứng với chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 hoặc C34) và

đồng nuôi cấy trên môi trường MS rắn trong những khoảng thời gian khác nhau (24, 48, 72, 96 và 120 giờ). Kết quả phần trăm số mẫu tạo rễ tơ và thời gian xuất hiện rễ tơ được thể hiện ở Bảng 4 và Bảng 5.

Quá trình đồng nuôi cấy có ảnh hưởng đến phần trăm số mẫu tạo rễ tơ và thời gian xuất hiện rễ tơ. Đồng nuôi cấy trong 24 giờ cho hiệu quả tạo rễ tơ rất thấp ($5,16 \pm 4,51$ % và $5,90 \pm 5,24$ % tương ứng với sự xâm nhiễm của hai chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34, có trường hợp không có sự tạo rễ tơ khi lặp lại thí nghiệm) và thời gian xuất hiện rễ tơ rất dài (khoảng 60 ngày). Đồng nuôi cấy trong 48 đến 96 giờ cho hiệu quả tạo rễ tơ tăng dần và thời gian xuất hiện rễ tơ dao động trong khoảng từ $12,67 \pm 2,31$ đến $18,33 \pm 2,08$ ngày ở hai chủng, nhưng đồng nuôi cấy trong thời gian quá dài (120 giờ trở đi) dẫn đến sự giảm hiệu quả tạo rễ tơ rõ rệt.

Các kết quả của chúng tôi chứng tỏ thời gian đồng nuôi cấy quá ngắn (24 giờ) thì hiệu quả tạo

rễ tơ rất thấp, ngược lại, thời gian đồng nuôi cây kéo dài (120 giờ trở đi) sẽ tác động ngược về hiệu quả tạo rễ tơ do sự giảm ái lực của vi khuẩn với tế bào thực vật hoặc bị ức chế cạnh tranh do sự gia tăng mật độ tế bào vi khuẩn [21]. Sivanesan và Jeong (2009) nhận thấy hiệu quả tạo rễ tơ tăng dần khi đồng nuôi cây từ 24 đến 72 giờ và bắt

đầu có dấu hiệu giảm kể từ 96 giờ trở đi do mẫu mô cây không đủ sức chịu đựng sự cạnh tranh của vi khuẩn vào lúc này [20]. Vậy, đồng nuôi cây trong 72 giờ là tối ưu cho *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 để cảm ứng tạo rễ tơ ở lá cắt cánh.

Bảng 4. Phần trăm số mẫu lá cắt cánh tạo rễ tơ và thời gian xuất hiện rễ tơ khi đồng nuôi cây với *A. rhizogenes* ATCC 15834 ở những khoảng thời gian khác nhau

Thời gian đồng nuôi cây (giờ)	24	48	72	96	120
Phần trăm trung bình số mẫu tạo rễ tơ (%)	5,16 ± 4,51 ^d	72,78 ± 12,51 ^b	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	46,67 ± 7,64 ^c
Thời gian xuất hiện rễ tơ (ngày)	56,00 ± 3,61 ^a	18,33 ± 2,08 ^b	13,33 ± 1,53 ^{c,d}	12,67 ± 2,31 ^d	17,67 ± 2,08 ^{b,c}

Ghi chú: kí hiệu a, b, c, d thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nhóm thí nghiệm trong cùng một chỉ tiêu theo dõi.

Bảng 5. Phần trăm số mẫu lá cắt cánh tạo rễ tơ và thời gian xuất hiện rễ tơ khi đồng nuôi cây với *A. rhizogenes* C34 ở những khoảng thời gian khác nhau

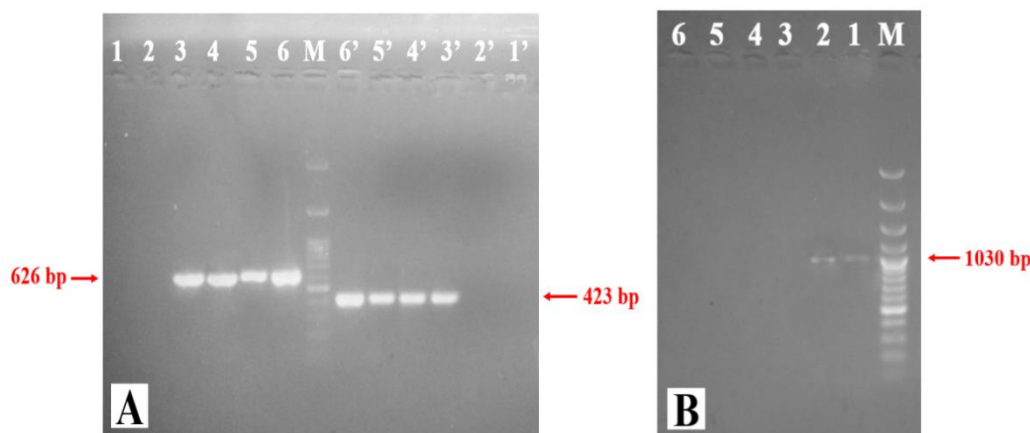
Thời gian đồng nuôi cây (giờ)	24	48	72	96	120
Phần trăm trung bình số mẫu tạo rễ tơ (%)	5,90 ± 5,24 ^d	74,24 ± 5,17 ^b	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	33,33 ± 2,89 ^c
Thời gian xuất hiện rễ tơ (ngày)	59,67 ± 5,13 ^a	17,33 ± 1,53 ^b	14,33 ± 0,58 ^b	13,67 ± 1,53 ^b	16,33 ± 1,53 ^b

Ghi chú: kí hiệu a, b, c, d thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nhóm thí nghiệm trong cùng một chỉ tiêu theo dõi.

Kiểm tra sự chuyển gene

Vùng T-DNA trong plasmide Ri của *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 chứa các gene *rol* chịu trách nhiệm cho sự cảm ứng tạo rễ tơ trên mô thực vật bị xâm nhiễm. Để chứng minh các gene này đã chèn thành công vào bộ gene rễ tơ cắt cánh, chúng tôi thực hiện phản ứng PCR với các cặp primer đặc hiệu để phát hiện ba gene *rolB*, *rolC* và *virG*. Kết quả cho thấy các sản

phẩm PCR của bộ gene rễ tơ cắt cánh đều có sự hiện diện của *rolB* và *rolC* (tương ứng khuếch đại đặc hiệu một vùng trình tự 423 bp và 626 bp) nhưng không có sự hiện diện của gene *virG* (Hình 6). Do đó, kết quả chứng minh gene *rolB* và *rolC* từ plasmide Ri của *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34 đã sát nhập thành công vào bộ gene rễ tơ cắt cánh.



Hình 6. A. Kết quả PCR với cặp primer *rolB* (phải) và *rolC* (trái). Giếng 1 và 1': chứng âm; giếng 2 và 2': rễ cát cánh *in vitro*; giếng 3 và 3': rễ tơ cát cánh cảm ứng bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 4 và 4': rễ tơ cát cánh cảm ứng bởi *A. rhizogenes* C34; giếng 5 và 5': chứng dương *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 6 và 6': chứng dương *A. rhizogenes* C34; giếng M: thang 100 bp. **B.** Kết quả PCR với cặp primer *virG*. Giếng 1 và 2: chứng dương tương ứng với chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34. Giếng 3 và 4: rễ tơ cát cánh tương ứng được cảm ứng bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34. Giếng 5 và 6: chứng âm tương ứng với chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34. Giếng M: thang 100 bp plus

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thí nghiệm của mình, chúng tôi đã xây dựng một quy trình hoàn chỉnh tạo rễ tơ cát cánh thông qua sự xâm nhiễm của hai chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 và C34. Hai gene *rolB* và *rolC* chịu trách nhiệm cảm ứng tạo rễ tơ khi được kiểm tra đã sát nhập thành công vào bộ gene rễ tơ cát cánh. Lá cát cánh là cơ quan tạo rễ tơ tốt nhất (100 % số mẫu có khả năng tạo rễ tơ). Thời gian ngâm mẫu lá tốt nhất trong dịch khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 và

C34 tương ứng là 10 và 15 phút. Thời gian đồng nuôi cấy trong 72 giờ sẽ tối ưu để tạo rễ tơ ở hai chủng này. Chúng tôi hi vọng quy trình cảm ứng tạo rễ tơ cát cánh được mô tả ở trên sẽ hữu ích cho các nghiên cứu về rễ tơ cát cánh trong tương lai cũng như trong nhiều ứng dụng khác, đặc biệt là các nghiên cứu liên quan đến sản xuất hợp chất thứ cấp vì quy trình tạo rễ tơ cát cánh này giúp có nguồn nguyên liệu ban đầu chủ động, ổn định về mặt di truyền.

Induction of *Platycodon grandiflorum* hairy roots through the mediation of four *Agrobacterium rhizogenes* strains

- Tra Dong Phuong
- Vu Thi Bach Phuong
- Quach Ngo Diem Phuong

University of Science, VNU–HCM

ABSTRACT

Balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.), the only species in *Platycodon* genus (Campanulaceae), is mainly distributed in East Asia. The rhizomes of *P. grandiflorum*, a traditional herbal medicine, have been widely used for the treatment of cough, sore throat, asthma, tuberculosis and other diseases. Recently, pharmacological researches identified important biological activities compounds in the rhizomes. Thus, to study and extract valuable compounds, a hairy root induced technique was achieved on *P. grandiflorum* for stable material with fast growth rates (in hormone-free media) and metabolites production. To achieve this, the “natural genetic tool” *Agrobacterium rhizogenes*, which can transfer DNA segments

into genome of plant, was exploited. The results suggested two (*A. rhizogenes* ATCC 15834 and C34) of four *A. rhizogenes* strains could induce hairy roots. *rolB* and *rolC* genes, which are responsible for the induction of hairy roots, were inserted into the genome of hairy roots. Leaves had the highest infection frequency of hairy root induction 100 %. The optimization of protocol, including time of immersion and co-culture, had the best results with 10 and 15 mins (10 mins for *A. rhizogenes* ATCC 15834 and 15 mins for *A. rhizogenes* C34) and 72 hours, respectively. In the future, this protocol, which was described in this paper, should be useful for studying and isolating valuable compounds from *P. grandiflorum* hairy root cultures.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *Platycodon grandiflorum*, *rol* genes, *virG* gene

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M. Akramian, S.M.F. Tabatabaei, M. Mirmasoumi, Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species, *American – Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 3, 5, 759–763 (2008).
- [2]. R.P. Chandran, V.P. Potty, Different inducer molecules and strains of *Agrobacterium rhizogenes* on enhancing transformation frequency in host plants, *Biotechnology*, 10, 2, 203–208 (2011).
- [3]. J.J. Doyle, J.L. Doyle, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15 (1987).
- [4]. T.M. Ermayanti, Transformasi *Artemisia cina* dan *Artemisia annua* dengan *Agrobacterium rhizogenes*, *Journal of Applied and Industrial Biotechnology in Tropical Region*, 2, 1–5 (2009).
- [5]. Q.Y. Gai, J. Jiao, M. Luo, Z.F. Wei, Y.G. Zu, W. Ma, Y.J. Fu, Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria*

- L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities, *PloS One*, 10, 3, e0119022 (2015).
- [6]. M.I. Georgiev, A.I. Pavlov, T. Bley, Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 6, 1175–1185 (2007).
- [7]. H.T.T. Minh, Q.N.D. Phương, B.V. Lê, Nghiên cứu quy trình chuyển gene 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, 4A, 665–672 (2011).
- [8]. Z. Hu, M. Du, Hairy roots and its application in plant genetic engineering, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48, 2, 121–127 (2006).
- [9]. H. Ishii, K. Tori, T. Tozyo, Y. Yoshimura, Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 1. Structure of prosapogenins, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1, 1928–1933 (1981).
- [10]. H. Ishii, K. Tori, T. Tozyo, Y. Yoshimura, Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 2. Isolation and structure of new triterpene glycosides, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1, 661–668 (1984).
- [11]. Y. Mano, S. Nabeshima, C. Matsui, H. Ohkawa, Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 11, 2715–2722 (1986).
- [12]. Y.S.W. Manuhara, A. Yachya, A.N. Kristanti, Effect of aeration and inoculum density on biomass and saponine content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy roots in balloon-type bubble bioreactor, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2, 4, 47–52 (2012).
- [13]. O. Nilsson, O. Olsson, Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots, *Physiologia Plantarum*, 100, 3, 463–473 (1997).
- [14]. E. Nyakudya, J.H. Jeong, N.K. Lee, Y.S. Jeong, Platycosides from the roots of *Platycodon grandiflorum* and their health benefits, *Preventive Nutrition and Food Science*, 19, 2, 59–68 (2014).
- [15]. A. Pal, S.S. Swain, A.K. Mukherjee, P.K. Chand, *Agrobacterium* pRi TL-DNA rolB and TR-DNA opine genes transferred to the Spiny Amaranth (*Amaranthus spinosus* L.), A Nutraceutical Crop, *Food Technology and Biotechnology*, 51, 1, 26–35 (2013).
- [16]. 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).
- [17]. K. Pirian, K. Piri, T. Ghiyasvand, Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to noradrenaline's production, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3, 642–649 (2012).
- [18]. A.V. Rao, D.M. Gurfinkel, The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides, *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17, 1-4, 211–236 (2000).
- [19]. J. Shilpha, L. Satish, M. Kavikkuil, M.J.V. Larga, M. Ramesh, Methyl jasmonate elicits the solasodine production and antioxidant activity in hairy root cultures of *Solanum trilobatum* L., *Industrial Crops and Products*, 71, 54–64 (2015).
- [20]. I. Sivanesan, B.R. Jeong, Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L., *African Journal of Biotechnology*, 8, 20, 5294–5300 (2009).

- [21]. J. Tao, L. Li, Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*, *South African Journal of Botany*, 72, 2, 211–216 (2006).
- [22]. Y.Z. Yan, J.C. Xue, J.R. Wu, D.S. Yoo, S.Y. Lee, Y.K. Kim, M.R. Uddin, S.U. Park, Variation of triterpenoid saponine content in *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) ADC., *Asian Journal of Chemistry*, 24, 3, 1268–1270 (2012).
- [23]. L. Zhang, Y. Wang, D. Yang, C. Zhang, N. Zhang, M. Li, Y. Liu, *Platycodon grandiflorus* – An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review, *Journal of Ethnopharmacology*, 164, 147–161 (2015).
- [24]. L.G. Zhou, J.Y. Wu, Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China, *Natural product Reports*, 23, 5, 789–810 (2006).