

# Phân lập và nhận diện *Agrobacterium rhizogenes* có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*) *in vivo*

• Nguyễn Như Nhứt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM- Chi nhánh Công ty TNHH Gia Tường, Bình Dương

• Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Nhận ngày 25 tháng 07 năm 2016, đăng bài ngày 10 tháng 04 năm 2017)

## TÓM TẮT

*Agrobacterium rhizogenes* là loài vi khuẩn được ứng dụng rộng rãi trong kỹ thuật chuyển gene vào tế bào thực vật để cảm ứng tạo thành rễ tơ. Tổng cộng đã phân lập được 274 dòng khuẩn lạc khác nhau trên môi trường chọn lọc MG-Te từ 235 mẫu đất khác nhau. Trong đó có mười ba dòng có các đặc điểm hình thái, sinh hóa và bệnh học thuộc loài *A. rhizogenes* và có khả năng cảm ứng tạo thành rễ tơ

trên cây dừa cạn *in vivo*. Các dòng này được nhận diện thuộc loài *A. rhizogenes* bằng giải trình tự 16S rRNA và đều có mang các gene *rolABC* trong plasmid của chúng. Kết quả nghiên cứu này cho thấy *A. rhizogenes* hiện diện phổ biến trong đất vùng rễ cây trồng ở Việt Nam và giúp làm phong phú thêm công cụ chuyển gene cho các nghiên cứu rễ tơ cây dừa cạn trong tương lai.

**Từ khóa:** *Agrobacterium rhizogenes*, cây Dừa cạn, cây họ đậu, phân lập, rễ tơ

## MỞ ĐẦU

Rễ tơ (hairy root) được hình thành khi thực vật bị *Agrobacterium rhizogenes* xâm nhiễm vào vết thương. Vi khuẩn này đã chuyển một phần gene của nó vào trong tế bào thực vật chủ làm cho tế bào phát sinh thành rễ được gọi là rễ tơ. Hiện nay, nuôi cấy rễ tơ là một trong những kỹ thuật đầy tiềm năng trong sản xuất các hợp chất thứ cấp từ thực vật. Trong đó, rễ tơ cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*) ngoài giúp sản xuất các alkaloid có hoạt tính cao trong chữa trị ung thư ở người mà còn được sử dụng như một công cụ mô hình để nghiên cứu các con đường sinh tổng hợp alkaloid [1]. Các báo cáo trước đây cho thấy khả năng sinh tổng hợp alkaloid thay đổi giữa các dòng rễ tơ khác nhau từ cây Dừa cạn. Mặc dù chưa có nghiên cứu nào được báo cáo, nhưng sự thay đổi này được cho là có sự khác nhau trong số lượng và vị trí chèn các gene của *A. rhizogenes* vào trong bộ gen của thực

vật chủ [3]. Cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã cho thấy nguyên nhân dẫn đến sự đa dạng này ở rễ tơ là do sự khác nhau giữa các chủng *A. rhizogenes* và các điều kiện khi chuyển gene vào tế bào thực vật được chứng minh là tạo thành các dòng rễ tơ [14, 15].

Mặc dù được xem như một công cụ chuyển gene hiệu quả, các nghiên cứu chỉ sử dụng trên một vài chủng *A. rhizogenes* nhất định trong khi loài vi khuẩn này hiện diện khắp nơi trong đất [8, 12, 15]. Một số báo cáo cũng cho thấy *A. rhizogenes* hoang dại cũng có thể có khả năng chuyển gene cao trên vài loài thực vật chủ [9, 10, 16]. Do đó, nghiên cứu này đã được thực hiện nhằm vào việc thu nhận các chủng *A. rhizogenes* có trong đất vùng rễ của một số loại cây trồng làm công cụ cho kỹ thuật nuôi cấy rễ tơ cây dừa cạn sau này.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Mẫu đất và mẫu thực vật *in vivo*

Các mẫu đất vùng rễ của một số loại cây trồng được thu từ các tỉnh thành như Long An, Tiền Giang, Bình Dương và thành phố Hồ Chí Minh. Đất được lấy ở vùng rễ cây có độ sâu khoảng 10–15 cm. Mẫu sử dụng để phân lập là mẫu trộn chung của đất lấy từ 5 điểm khác nhau trong 1 ruộng. Mỗi mẫu khoảng 100 g được chứa trong túi nylon vô trùng. Mẫu được bảo quản kín và trong thùng lạnh 8–10 °C.

Cây đậu đen và cây Dừa cạn *in vivo* được sử dụng làm thực vật chủ để nhận dạng và sàng lọc chủng vi khuẩn được phân lập có khả năng gây cảm ứng tạo rễ tơ. Tám giống thực vật chủ gồm bốn giống cây họ đậu [đậu đen (*Vigna cylindrica*), đậu nành (*Glycine max*), đậu phộng (*Arachis hypogaea*) và đậu xanh (*Vigna radiata*)] và bốn giống dừa cạn (*Catharanthus roseus* VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077) do công ty FVN cung cấp. Hạt giống được gieo trên các khay chuyên dùng để ươm giống và được đặt trong nhà lưới.

### Phân lập

Các chủng *Agrobacterium* có trong đất được phân lập theo Wang [15], và José [8], bằng cách sử dụng môi trường MG-Te bán chọn lọc *Agrobacterium*. Cho 0,5 mL nước cất vô trùng vào 0,5-1,0 g mẫu đất và để yên 30 phút cho mẫu mềm ra. Sau đó, pha loãng mẫu bằng nước cất vô trùng. Cho 50-100 µL mẫu này thành dạng vết trên môi trường MG-Te. Ủ ở 28 °C trong 3-4 ngày (do tellurite có xu hướng làm giảm tốc độ tăng trưởng của *Agrobacterium*). Sau đó, tách lấy những khuẩn lạc riêng lẻ đặc trưng của *Agrobacterium* có dạng tròn đều với màu đen có ánh kim để tiếp tục làm thuần thêm một hoặc bước nữa. Các chủng vi khuẩn thu được sẽ được nhận dạng dựa trên các đặc điểm hình thái, kiểm tra sinh hóa, khả năng gây bệnh rễ tơ trên cây đậu đen và cây dừa cạn. Sau cùng các chủng sẽ được nhận diện bằng cách giải trình tự DNA.

### Nhận diện *Agrobacterium* bằng các kiểm tra đặc điểm hình thái và sinh hóa

*Agrobacterium rhizogenes* được nhận diện theo mô tả của George [6], Emanuel và Lorrence [4], Murugesan et al. [12], và José [8]. Theo đó, các dòng khuẩn lạc đặc trưng được kiểm tra khả năng phát triển trên môi trường 2E-Te (không bổ sung Te) nhằm loại bỏ các dòng khuẩn lạc thuộc các loài khác trong giống *Agrobacterium* (José, [8]). Các dòng khuẩn lạc phát triển được trên 2E-Te tiếp tục được kiểm tra hình thái và sinh hóa đặc trưng của *Agrobacterium* theo Emanuel và Lorrence [4], như hình dạng tế bào, nhuộm Gram, khả năng phát triển trên môi trường TSA, lên men glucose sinh acid trên môi trường TSI, oxidase và khả năng phát triển trên môi trường MacConkey Agar (MAC). Các dòng thu được cũng được kiểm tra khả năng bắt màu với Congo red trên môi trường Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA), phát triển được trên môi trường kiểm pH 11 Hofer's agar và khả năng tổng hợp 3-ketolactose theo Murugesan et al. [12]. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn cũng được đánh giá khả năng sinh tổng hợp curdlan, khả năng phát triển trên một số môi trường như thạch peptone glucose, potato glucose agar (PGA), môi trường có nồng độ muối cao và khả năng di động theo George [6]. Tất cả các dòng mang đặc tính phù hợp với *A. rhizogenes* được nuôi cấy và bảo quản trên môi trường thạch Yeast Mannitol Broth (YMB).

### Nhận diện *A. rhizogenes* bằng các xét nghiệm bệnh học

Các dòng vi khuẩn có đặc điểm phù hợp với *A. rhizogenes* được xác nhận dựa trên khả năng gây bệnh rễ tơ trên các cây *in vivo* theo phương pháp được báo cáo bởi Janse J. D. [7], Georgina et al. [5], Kereszt et al. [9], và Manijeh et al. [11], và có biến đổi. Sau khi nảy mầm 5 ngày, các cây đậu được tạo vết thương ở trụ dưới mầm bằng dao mổ và sau đó được cho nhiễm với sinh khối vi khuẩn được trích từ khuẩn lạc thu được sau khi nuôi cấy 2 ngày trên môi

trường thạch YMB. Theo dõi sự hình thành rễ tơ sau 2 tuần gây nhiễm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 10 lần, mỗi lần 100 cây. Đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không có vi khuẩn. Khả năng xâm nhiễm gây bệnh tạo rễ tơ của các chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua tỷ lệ cây có biểu hiện triệu chứng rễ tơ (%) và được tính bằng số lượng cây có rễ tơ xuất hiện/tổng số cây được gây nhiễm.

#### Sàng lọc *A. rhizogenes* có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên cây Dừa cạn

Với cây Dừa cạn *in vivo*, cây sau khi nảy mầm 7–8 tuần cũng được gây nhiễm tương tự như các cây họ đậu. Vị trí gây nhiễm là đoạn thân ngay dưới các cặp lá thật thứ nhất, thứ hai hoặc thứ ba tùy theo đường kính đốt thân. Sự hình thành rễ tơ được ghi nhận sau 3–4 tuần gây nhiễm.

#### Xác nhận *A. rhizogenes* bằng giải trình tự gene 16S ribosome RNA và xác định sự hiện diện của các gene rol

Các dòng vi khuẩn có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên cây dừa cạn tiếp tục được xác nhận bằng kỹ thuật sinh phân tử thông qua giải trình tự gene 16S ribosom DNA và sự hiện diện của các gene rol đặc trưng cho *A. rhizogenes*. RNA của 16S ribosom được tách chiết bằng bộ kit của QIAGEN. Trình tự 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') và 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Sản phẩm PCR được tinh chế và gửi giải trình tự. Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được BLAST trên ngân hàng dữ liệu gene NCBI. Plasmid DNA của vi khuẩn được tách chiết bằng phương pháp CTBA. Các gene rolA, rolB và rolC trên plasmid được khuếch đại bằng các cặp mồi có trình tự rolAF (5'-CGT TGT CGG AAT GGC CCA GAC C-3'), rolAR (5'-CGT

AGG TCT GAA TAT TCC GGT CC-3'), rolBF (5'-GCT CTT GAC GTG CTA GAT TT-3'), rolBR (5'-GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC-3'), rolCF (5'-CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC-3') và rolCR (5'-TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA-3'). Sản phẩm PCR sẽ được nhận diện bằng cách điện di trên gel agarose 1 % với đệm TAE 1X. Phát hiện gene trên gel bằng cách ngâm trong dung dịch ethidium bromide rồi chụp dưới đèn UV.

#### Xử lý số liệu

Số liệu thu được từ kết quả các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS (version 20.0) và được trình bày dưới dạng số trung bình.

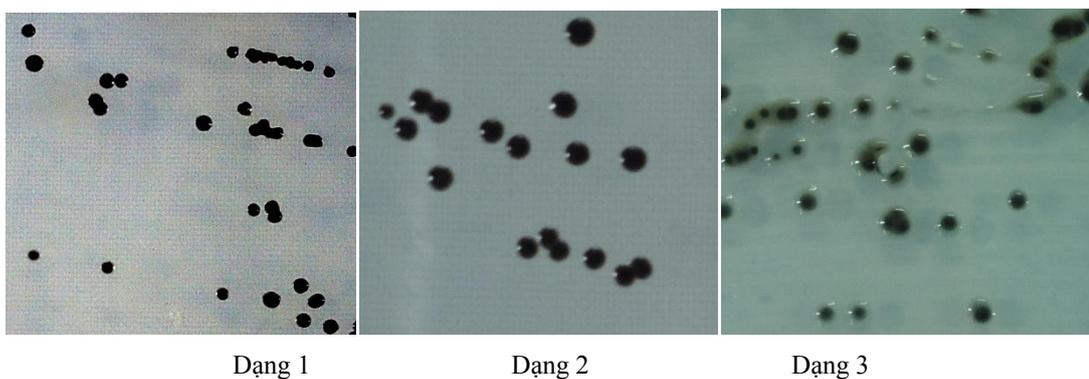
### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Phân lập *A. rhizogenes*

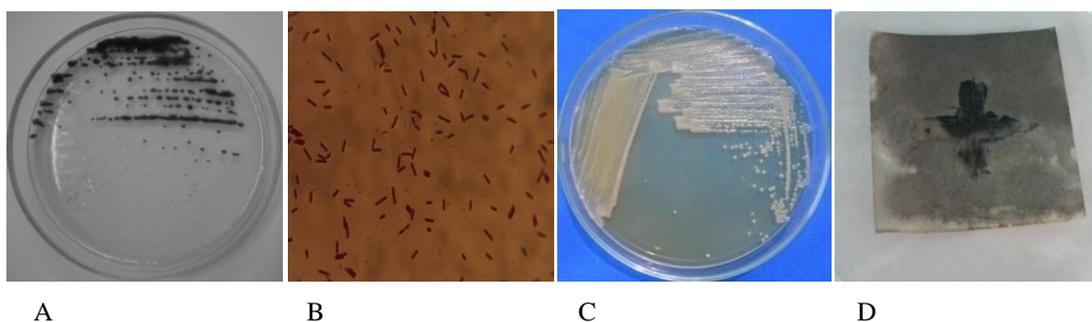
Từ 235 mẫu đã thu được (Bảng 1), sau khi phân lập trên môi trường chọn lọc MG-Te, kết quả quan sát cho thấy quần thể vi khuẩn mục tiêu hiện diện rất ít trong mẫu sau 4–5 ngày ủ ở 25°C. Các khuẩn lạc vi khuẩn xuất hiện rời rạc với số lượng thấp tương tự như báo cáo của José [5]. Có mẫu có 3 dạng khuẩn lạc khác nhau, nhưng, đa số mẫu chỉ có 1 dạng khuẩn lạc. Một số mẫu khác có 2 dạng khuẩn lạc khác nhau. Ngoài ra còn có một số mẫu không thấy có sự hiện diện khuẩn lạc (chủ yếu là các mẫu đất vùng rễ của cây lúa, cây đậu bắp và đậu que). Dạng thứ nhất với khuẩn lạc tròn lồi, mép liền, bóng, màu đen ánh kim, đường kính khuẩn lạc nhỏ hơn 1 mm (Hình 1). Dạng khuẩn lạc thứ hai cũng tương tự nhưng có đường kính trung bình lớn hơn, 2–3 mm. Dạng thứ ba chiếm đa số với khuẩn lạc tròn lồi, bóng và nhầy, có ánh kim, tâm khuẩn lạc có màu đen, vùng ngoài màu đen nhạt và trong suốt có đường kính trung bình 2–3 mm. Cả ba dạng khuẩn lạc đều có mặt dưới phẳng, không ăn sâu và không tiết sắc tố vào môi trường.

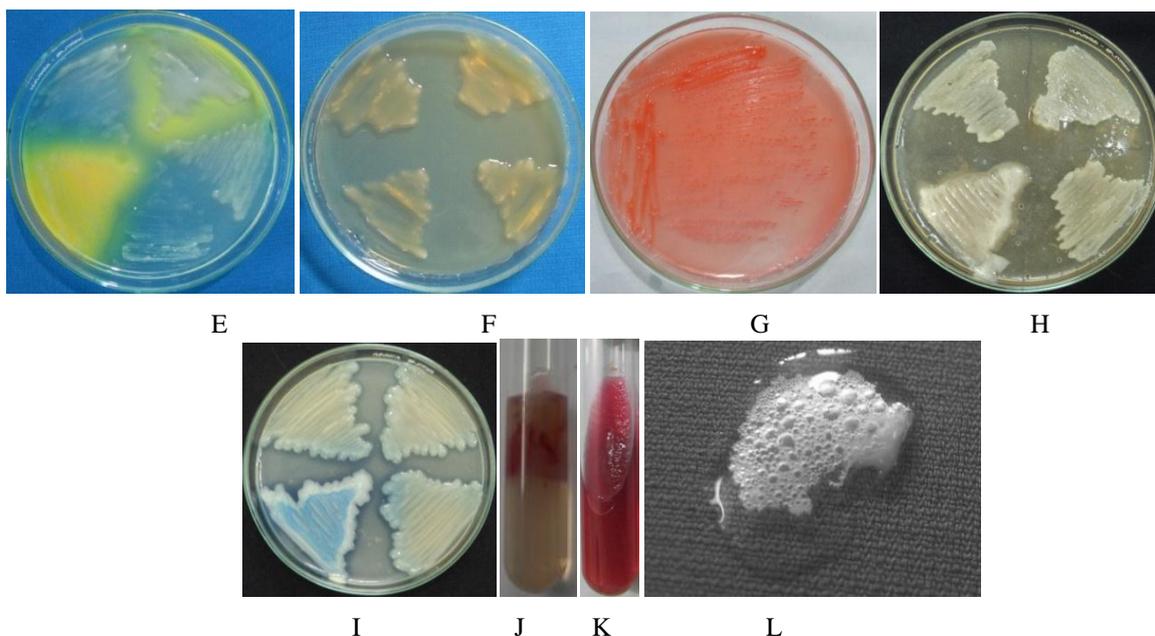
**Bảng 1.** Kết quả phân lập *Agrobacterium* trên môi trường MG-Te

Ký hiệu mẫu đất	Số mẫu đất	Đặc điểm mẫu	Số dòng khuẩn lạc			
			Dạng khuẩn lạc 1	Dạng khuẩn lạc 2	Dạng khuẩn lạc 3	Tổng cộng
DHa1→30	30	Đất vùng rẫy dưa hấu	4	6	29	39
DLe1→20	20	Đất vùng rẫy dưa leo	2	6	16	24
ĐBa1→35	35	Đất vùng rẫy đậu bắp	4	7	17	28
ĐĐe1→5	5	Đất vùng rẫy đậu đen	2	3	5	10
ĐĐu1→18	18	Đất vùng rẫy đậu đũa	6	9	12	27
ĐNa1→10	10	Đất vùng rẫy đậu nành	4	3	7	14
ĐPh1→30	30	Đất vùng rẫy đậu phộng	9	23	30	62
ĐQu1→25	25	Đất vùng rẫy đậu que	0	0	0	0
ĐXa1→22	22	Đất vùng rẫy đậu xanh	7	18	19	44
Lua1→40	40	Đất vùng rẫy lúa nước	5	9	12	26
Tổng cộng	235		43	84	147	274



**Hình 1.** Ba dạng khuẩn lạc khác nhau trên môi trường MG-Te mang đặc trưng của *Agrobacterium*





**Hình 2.** Minh họa một số kiểm tra hình thái và sinh hóa của *A. rhizogenes*. A: phát triển trên môi trường 2E-Te có erythritol như nguồn carbon duy nhất sau 5 ngày nuôi cấy; B: nhuộm Gram; C: phát triển trên môi trường TSA sau 3 ngày nuôi cấy; D: phản ứng oxidase; E: khả năng chuyển hóa lactose thành 3-ketolactose (màu vàng là dương tính); F: phát triển trên môi trường Hofer's pH 11; G: phát triển và bắt màu của sinh khối với thuốc thử Congo trên môi trường YEMA; H: phát triển trên môi trường PGA; I: khả năng tổng hợp curdlan (màu xanh là dương tính); J: khả năng di động; K: phát triển trên môi trường TSI sau 3 ngày nuôi cấy và L: phản ứng catalase.

Trong giống *Agrobacterium*, chỉ có *A. rhizogenes* có khả năng sử dụng erythritol làm nguồn carbon [15]. Kết quả kiểm tra cho thấy trong số 274 dòng khuẩn lạc đã phân lập được chỉ có 64 dòng có khả năng phát triển trên môi trường 2E-Te với erythritol như nguồn carbon duy nhất. Các dòng khuẩn lạc này tiếp tục được kiểm tra các đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hóa đặc trưng cho giống *Agrobacterium* theo Emanuel và Lorrence [4] và đã thu được 59 dòng khuẩn lạc có các đặc điểm phù hợp với giống *Agrobacterium* là Gram âm, hình que ngắn hoặc dài, phát triển tốt trên môi trường TSA, không phát triển trên môi trường MAC, không lên men glucose sinh acid trên môi trường TSI sau 24 giờ. Tuy nhiên, *Rhizobium* cũng có những đặc điểm tương tự với *Agrobacterium* [4]. *Agrobacterium* được phân biệt với *Rhizobium* thông qua các đặc điểm như có khả năng chuyển hóa tạo thành 3-ketolactose từ lactose trên môi trường Lactose agar *Agrobacterium*, có khả

năng bắt màu đỏ với thuốc thử Congo trên môi trường YEMA, phát triển được trên môi trường Hofer's có pH 11. Ngoài ra, khả năng chuyển hóa lactose thành 3-ketolactose cũng đã được Murugesan và cộng sự [4] ứng dụng để nhận diện *A. rhizogenes* khỏi *rhizobium* và những loài khác trong giống *Agrobacterium*. Dựa vào các kiểm tra sinh hóa trên đã thu được 34 dòng có đặc điểm phù hợp với *A. rhizogenes*. Cả 34 dòng thu được đều cho thấy phát triển tốt trên môi trường PGA, môi trường thạch glucose peptone, có khả năng di động, dương tính với catalase như mô tả trong khóa phân loại của Bergey năm 2004 và trong đó có 19 dòng có khả năng tổng hợp polysaccharide ngoại bào dạng curdlan.

#### **Nhận diện *A. rhizogenes* bằng các xét nghiệm bệnh học trên cây *in vivo***

Hiện nay, khả năng gây bệnh trên thực vật vẫn đang được sử dụng như là một trong những đặc điểm

để nhận diện đến loài các chủng *Agrobacterium* [4, 14, 15]. *A. rhizogenes* được nhận dạng thông qua khả năng xâm nhiễm vào vết thương và gây ra sự cảm ứng hình thành rễ tơ tại vị trí nhiễm. Thông thường sự nhận diện khả năng gây bệnh của *Agrobacterium* được thực hiện trên hai hoặc nhiều hơn các loài thực vật chủ khác nhau (Burr và Katz, 1983). Các cây họ đậu dễ dàng bị bệnh rễ tơ do sự xâm nhiễm của *A. rhizogenes* và biểu hiện của bệnh (Hình 3) cũng rõ ràng hơn trên các loài khác [2, 5, 9, 16] nên chúng được sử dụng như những mô hình trong nghiên cứu chức năng của gene trong rễ tơ. Do đó, trong nghiên cứu này, các dòng vi khuẩn thu được đã được tiếp tục nhận diện dựa trên khả năng gây bệnh rễ tơ trên bốn loài cây họ đậu khác nhau nhằm sàng lọc những dòng có khả năng này. Dựa trên các số liệu thu được đã cho thấy trong số 34 dòng sau khi được nhận dạng bằng các kiểm tra hình thái và sinh hóa thì chỉ có 14 dòng (chiếm 41,2 %) có khả năng gây ra triệu chứng

rễ tơ trên cây họ đậu sau 10 ngày xâm nhiễm. Trong đó, dòng C04 không có khả năng xâm nhiễm trên cây đậu xanh, dòng C09 không có khả năng xâm nhiễm trên cây đậu phộng và đậu xanh và dòng C24 thì không có khả năng xâm nhiễm trên cây đậu nành (Bảng 2). Các dòng *A. rhizogenes* hoang dại đã phân lập được này có khả năng xâm nhiễm gây bệnh rễ tơ trên cây đậu nành với tỷ lệ đáp ứng 1–21 %, trong khi đó chủng *A. rhizogenes* K599 hoang dại có thể gây đáp ứng đến 100 % [16]. Trong bốn loài đậu được sử dụng, cây đậu đen có đáp ứng bệnh rễ tơ với cả 14 dòng này và tỷ lệ cây có biểu hiện nhìn chung cao hơn so với ba loài họ đậu còn lại (tỷ lệ đáp ứng dao động từ 25 % đến 76 %). Dựa vào kết quả này đã giúp sàng lọc được 14 dòng vi khuẩn đã phân lập có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy cây đậu đen là cây thích hợp hơn cây đậu nành, đậu xanh và đậu phộng trong sàng lọc nhận diện *A. rhizogenes*.



**Hình 3.** Minh họa sự xuất hiện triệu chứng rễ tor trên cây đậu đen (trái) và cây đậu phộng (phải) *in vivo* mười ngày sau khi được gây nhiễm với dòng vi khuẩn C18 đã phân lập được

**Bảng 2.** Khả năng xâm nhiễm gây bệnh rễ tor trên cây họ đậu của các dòng vi khuẩn đã phân lập được

Dòng	Dạng khuẩn lạc	Tỷ lệ cây có biểu hiện triệu chứng rễ tor (%)			
		Đậu đen	Đậu nành	Đậu phộng	Đậu xanh
C02	Dạng 2	25 <sup>h</sup>	9 <sup>cde</sup>	31 <sup>c</sup>	14 <sup>fgh</sup>
C04	Dạng 3	46 <sup>def</sup>	13 <sup>bc</sup>	8 <sup>d</sup>	0 <sup>i</sup>
C05	Dạng 3	54 <sup>cd</sup>	21 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	12 <sup>gh</sup>
C09	Dạng 3	38 <sup>fg</sup>	2 <sup>f</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>i</sup>
C10	Dạng 2	52 <sup>cde</sup>	2 <sup>f</sup>	50 <sup>b</sup>	27 <sup>cde</sup>
C12	Dạng 3	43 <sup>efg</sup>	7 <sup>cdef</sup>	46 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>
C15	Dạng 1	59 <sup>bc</sup>	6 <sup>def</sup>	8 <sup>d</sup>	34 <sup>bcd</sup>

C18	Dạng 3	67 <sup>ab</sup>	1 <sup>f</sup>	50 <sup>b</sup>	54 <sup>a</sup>
C20	Dạng 3	48 <sup>de</sup>	3e <sup>f</sup>	49 <sup>b</sup>	37 <sup>bc</sup>
C24	Dạng 2	50 <sup>cde</sup>	0 <sup>f</sup>	24 <sup>c</sup>	37 <sup>bc</sup>
C26	Dạng 3	54 <sup>cd</sup>	21 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	12 <sup>gh</sup>
C29	Dạng 3	76 <sup>a</sup>	18 <sup>ab</sup>	4 <sup>d</sup>	6 <sup>hi</sup>
C32	Dạng 2	70 <sup>a</sup>	2 <sup>ef</sup>	8 <sup>d</sup>	21 <sup>efg</sup>
C34	Dạng 3	35 <sup>g</sup>	13 <sup>bcd</sup>	2 <sup>d</sup>	24 <sup>def</sup>

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng một cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở  $p=0,05$ .

#### Sàng lọc *A. rhizogenes* có khả năng cảm ứng rễ tơ trên cây Dừa cạn *in vivo*

Trong thời gian gần đây, thông qua rễ tơ được chuyển gene bằng *A. rhizogenes*, cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) được xem như một trong những cây mô hình cho các nghiên cứu *in vitro* về chức năng của các gene liên quan đến các con đường biến dưỡng alkaloid ở thực vật. Ngoài ra, nuôi cấy rễ tơ từ cây dừa cạn cũng được xem là một trong những hướng đi có tiềm năng trong sản xuất các alkaloid có hiệu quả cao trong điều trị nhiều bệnh ung thư ở người. Tuy nhiên, hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ của *A. rhizogenes* vào tế bào thực vật nói chung phụ thuộc rất nhiều yếu tố [15]. Trong đó, các chủng *A. rhizogenes* được phân lập từ các nguồn khác nhau sẽ có khả năng cảm ứng nhau [13]. Các số liệu thu được sau ba tuần gây nhiễm đã cho thấy chỉ có 13 dòng

trong số 14 dòng vi khuẩn đã sàng lọc ở trên có khả năng gây xâm nhiễm bệnh rễ tơ trên bốn giống dừa cạn VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077 (Bảng 3). Dòng C05 hoàn toàn không gây đáp ứng trên cả bốn giống dừa cạn. Biểu hiện đáp ứng ở cây dừa cạn cũng dễ dàng được nhận biết như ở các cây họ Đậu (Hình 4). So với các cây họ Đậu (Bảng 2), nhìn chung, tỷ lệ đáp ứng ở cây dừa cạn cao hơn với thời gian xuất hiện rễ tơ dài hơn kể từ khi gây nhiễm. Kết quả cho thấy có sự tương đồng với nhau giữa các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo*, mỗi dòng vi khuẩn khác nhau có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ khác nhau trên cùng một giống dừa cạn và với cùng một dòng vi khuẩn thì khả năng cảm ứng tạo rễ tơ của nó cũng khác nhau trên các giống dừa cạn.



Hình 4. Minh họa sự đáp ứng của bốn giống Dừa cạn *in vivo* khi được xâm nhiễm bằng dòng C18 đã phân lập được sau 3 tuần gây nhiễm.

Bảng 3. Khả năng xâm nhiễm gây bệnh rễ tơ trên cây Dừa cạn *in vivo* của các dòng vi khuẩn đã phân lập được

Chủng	Dạng khuẩn lạc	Tỷ lệ cây có xuất hiện triệu chứng rễ tơ (%)			
		VIN002	VIN05	VIN072	VIN077
C02	Dạng 2	44 <sup>cd</sup>	43 <sup>cd</sup>	38 <sup>d</sup>	16 <sup>ef</sup>
C04	Dạng 3	35 <sup>ef</sup>	37 <sup>cde</sup>	26 <sup>f</sup>	9 <sup>gh</sup>
C05	Dạng 3	0 <sup>i</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>j</sup>	0 <sup>i</sup>
C09	Dạng 3	33 <sup>fg</sup>	41 <sup>cd</sup>	19 <sup>g</sup>	27 <sup>c</sup>
C10	Dạng 2	42 <sup>cd</sup>	25 <sup>fg</sup>	48 <sup>c</sup>	19 <sup>de</sup>
C12	Dạng 3	67 <sup>a</sup>	44 <sup>c</sup>	33 <sup>e</sup>	39 <sup>b</sup>
C15	Dạng 1	46 <sup>cd</sup>	38 <sup>cde</sup>	0 <sup>j</sup>	10 <sup>fgh</sup>
C18	Dạng 3	47 <sup>bc</sup>	61 <sup>b</sup>	81 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>
C20	Dạng 3	0 <sup>i</sup>	31 <sup>ef</sup>	13 <sup>h</sup>	0 <sup>i</sup>
C24	Dạng 2	15 <sup>h</sup>	11 <sup>h</sup>	6 <sup>i</sup>	10 <sup>fg</sup>
C26	Dạng 3	40 <sup>de</sup>	69 <sup>a</sup>	59 <sup>b</sup>	49 <sup>a</sup>
C29	Dạng 3	16 <sup>h</sup>	18 <sup>gh</sup>	13 <sup>h</sup>	3 <sup>hi</sup>
C32	Dạng 2	53 <sup>b</sup>	42 <sup>cd</sup>	0 <sup>j</sup>	23 <sup>cd</sup>
C34	Dạng 3	28 <sup>g</sup>	36 <sup>de</sup>	16 <sup>gh</sup>	20 <sup>de</sup>

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng một cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở  $p=0,05$ .

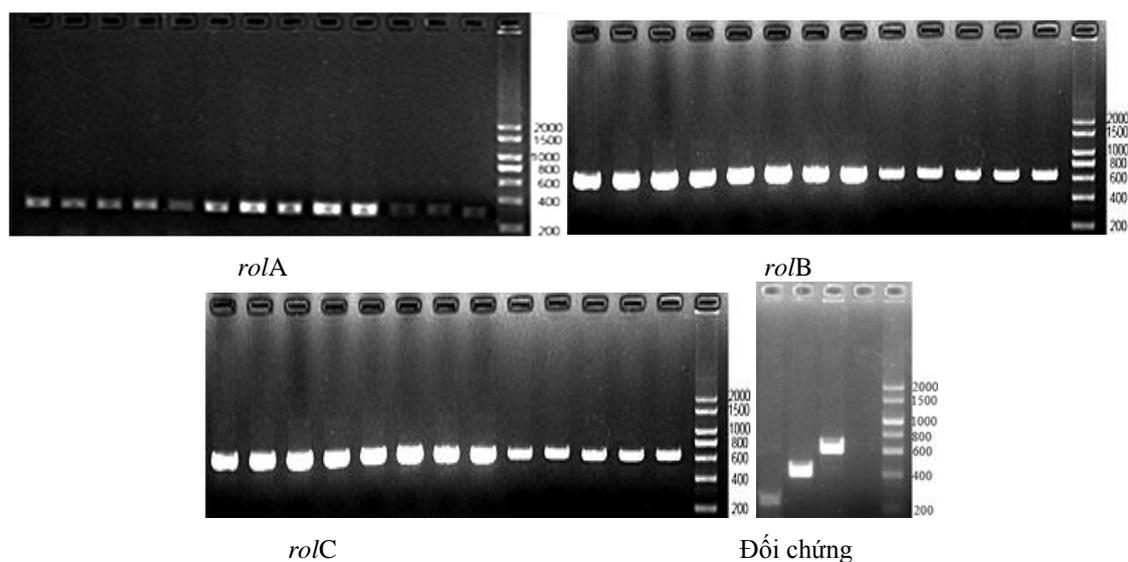
**Nhận diện *A. rhizogenes* bằng kỹ thuật sinh học phân tử**

Dựa trên các kết quả kiểm tra hình thái, sinh hóa và bệnh học, kết quả đã sàng lọc được 13 dòng có đặc điểm nhận diện phù hợp với loài *A. rhizogenes* và chúng có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên cây dừa cạn. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chúng đã cho thấy các dòng vi khuẩn thu được có độ tương đồng cao với loài *A. rhizogenes* (Bảng 4). Ngoài ra,

kết quả xác định sự hiện diện các gene rol có trong plasmid Ri đặc trưng cho *A. rhizogenes* cũng đã cho thấy cả 13 dòng thu được đều có chứa các gene *rolABC* (Hình 5).

**Bảng 4.** Kết quả so sánh bắt cặp đoạn gene 16s ribosome trên ngân hàng dữ liệu NCBI và nhận diện gene *rolABC* ở 13 chủng vi khuẩn có khả năng tạo rễ tơ trên cây dứa cạn

Dòng	Trình tự 16S ribosom DNA		Sự hiện diện gen <i>rol</i>		
	Loài tương đồng	Độ tương đồng	A	B	C
C02	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99%	Có	Có	Có
C04	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	100%	Có	Có	Có
C09	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	100%	Có	Có	Có
C10	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	100%	Có	Có	Có
C12	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99%	Có	Có	Có
C15	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99%	Có	Có	Có
C18	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99%	Có	Có	Có
C20	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	100%	Có	Có	Có
C24	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99%	Có	Có	Có
C26	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99%	Có	Có	Có
C29	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99%	Có	Có	Có
C32	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	100%	Có	Có	Có
C34	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99%	Có	Có	Có



**Hình 5.** Kết quả phân tích PCR xác nhận sự hiện diện các gene *rolABC* trong plasmid của mười ba dòng vi khuẩn đã sàng lọc được. *rolA*, *rolB* và *rolC*: Xác nhận sự hiện diện các gene *rol*; các giếng từ trái sang phải tương ứng với các dòng vi khuẩn C02, C04, C09, C10, C12, C15, C18, C20, C24, C26, C29, C32, C34 và thang chuẩn; Đối chứng: các giếng từ trái sang phải tương ứng với *rolA*, *rolB*, *rolC*, nước và thang chuẩn.

## KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy *Agrobacterium rhizogenes* có thể được phân lập từ đất trồng của nhiều loại cây trồng khác nhau ở nước ta. Trên môi trường chọn lọc MG-Te, loài vi khuẩn này có ba dạng khuẩn lạc khác nhau có thể phân biệt bằng mắt thường. Trong số ba mươi bốn dòng phân lập được, qua kiểm tra bệnh học và kết quả phân tích sinh học

phân tử cho thấy có mười ba chủng *A. rhizogenes* khác nhau về hình dạng khuẩn lạc cũng như khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên các giống dưa cạn *in vivo*. Tiềm năng của chúng cho các nghiên cứu ứng dụng nuôi cấy rễ tơ cần được tiếp tục nghiên khảo sát sâu hơn.

# Isolation and identification of *Agrobacterium rhizogenes* inducing hairy roots of *Catharanthus roseus in vivo*

- **Nguyen Nhu Nhut**

University of Science, VNU-HCM - Gia Tuong Company, Binh Duong branch

- **Bui Van Le**

University of Science, VNU-HCM

## ABSTRACT

*Agrobacterium rhizogenes* is a common tool for transforming foreign genes into plant cell and inducing hairy root formation. A total of 274 colonies of *Agrobacterium* species was isolated on selective MG-Te medium from 235 samples of rhizosphere soils. There were only thirteen colonies belonged to *A. rhizogenes* being able to efficiently induce the hairy root formation of *Catharanthus roseus in vivo* based

on the morphological, biochemical, and pathogenicity tests. These thirteen colonies were identified as *A. rhizogenes* based on 16S rRNA sequence and possessing *rolABC* genes. The results indicated *A. rhizogenes* was universal in rhizosphere soil in Vietnam and riched transgenic tools for researching *C. roseus* hairy roots in the future.

**Keywords:** *Agrobacterium rhizogenes*, *Catharanthus roseus*, hairy root, isolation, leguminous plant

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. B.Y. Binder, C.A. Peebles, J.V.Shanks, K.Y San, The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol. Prog.*, 25, 3, 861–865 (2009).
- [2]. T.J. Burr, B.H. Katz., Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology*, 73, 163-165 (1983).

- [3]. S. Chandra, H. Lata, A. Varma., *Biotechnology for Medicinal Plants*. Springer, London (2013).
- [4]. G. Emanuel, H.G. Lorrence, *Practical handbook of microbiology*. CRC Press (2009).
- [5]. G.E. Navarrete, X.A. Affantranger, O.J. Elías, G. Gabriel, C.D. Camino, C.Francisco, Q. Carmen, G.M. Peter, S. Federic, Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, 2, 1819–1824, (2007).
- [6]. M.G. George, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer (2005).
- [7]. J.D. Janse., *Phytobacteriology—Principles and practice*. CABI Publishing (2005).
- [8]. C. José, Jiménez-López, *Biochemical testing*. Intech, (2012).
- [9]. Kereszt, D. Li, A. Indrasumunar, D.T.C. Nguyen., Nontachaiyapoom, K.S. Mark., M.P. Gresshoff, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols*, 2, 948–952 (2007).
- [10]. S. Majumdar, S. Garai, S. Jha, Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant Cell Rep*, 30, 5, 941–54 (2011).
- [11]. M.M. Dehcheshmeh, E. Esmaeil, D.T. Stephen, N.K Brent, A novel method based on combination of semi-in vitro and *in vivo* conditions in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of Glycine species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 50, 2, 282–291 (2014).
- [12]. S. Murugesan, C. Manoharan, R. Vijayakumar, A. Panneerselvam, Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the root nodules of some leguminous plants. *International Journal of Microbiological Research*, 1, 3, 92–96 (2010).
- [13]. M. Sun, J.J. Zeng, A study on the hairy root culture and antitumor alkaloids production of *Catharanthus roseus*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 30, 10, 741–755 (2005).
- [14]. T. Tzvi, C. Vitaly, *Agrobacterium—From biology to biotechnology*. Springer (2008).
- [15]. W. Kan, *Agrobacterium protocols*, 1. Humana Press (2006).
- [16]. X.T. He, W.L. Lin, P.J. Liang, M. Chen, C. Xu., Hairy root induced by wild-type *Agrobacterium rhizogenes* K599 in soybean, cucumber and garden balsam *in vivo*. *Yi Chuan*, 27, 5, 783–786 (2005).