

Nghiên cứu sự tăng trưởng trong môi trường lỏng của rễ tơ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) được cảm ứng bằng *Agrobacterium rhizogenes*

Nguyễn Như Nhứt^{1,2}, Bùi Văn Lệ¹

Tóm tắt – Rễ tơ từ cây dừa cạn được cảm ứng bằng *Agrobacterium rhizogenes* có tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Điều kiện để nuôi cấy tăng sinh khối thay đổi tùy theo từng dòng rễ khác nhau. Ở điều kiện nuôi cấy lỏng và lắc trong tối ở 25 °C, hai dòng rễ tơ VIN002-12 và VIN005-07 tăng trưởng tốt trên môi trường Gamborg'B5 bán đậm đặc trong khi hai dòng VIN072-15 và VIN077-09 phát triển tốt hơn trên môi trường White bán đậm đặc. Cả bốn dòng rễ tơ phát triển tốt trong dãy pH ban đầu của môi trường 5,7–6,5 và sử dụng sucrose 2–5% làm nguồn carbon để tăng trưởng. Ở các điều kiện chọn lọc, các dòng rễ VIN002-12 và VIN077-09 có pha tăng trưởng kết thúc vào ngày 35 sau khi cấy, hai dòng rễ tơ VIN005-07 và VIN072-15 kết thúc pha tăng trưởng vào ngày 28 sau khi cấy. Các kết quả bước đầu này hoàn toàn có thể ứng dụng để sản xuất sinh khối của bốn dòng rễ tơ đáp ứng cho nhiều nghiên cứu sau này.

Từ khóa – *Agrobacterium rhizogenes*, *Catharanthus roseus*, môi trường lỏng, rễ tơ

1 MỞ ĐẦU

Rễ tơ là sản phẩm được hình thành từ tế bào thực vật được chuyển gene từ plasmid Ri (root inducing plasmid) của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* [27]. Nuôi cấy rễ tơ hiện được xem như một trong những kỹ thuật quan trọng trong nghiên cứu thực vật [8]. Trong đó, rễ tơ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) đã và đang được xem như một trong những mô hình của nhiều nghiên cứu cơ bản quan trọng như làm sáng tỏ các

con đường sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp, các tương tác của rễ với môi trường ... và các nghiên cứu ứng dụng như sản xuất các alkaloid chữa trị ung thư, tạo giống cây mới... [10, 30].

Mặc dù rễ tơ dừa cạn được bắt đầu nghiên cứu từ những năm 1980 [26], các nghiên cứu về rễ tơ cây dừa cạn vẫn không ngừng được báo cáo. Một trong những nguyên nhân hấp dẫn các nhà nghiên cứu là mỗi dòng rễ tơ có đặc điểm tăng trưởng và biến dưỡng khác nhau [17]. Ngoài ra, cây dừa cạn tái sinh từ rễ tơ có nhiều đặc điểm mới lạ so với cây bố mẹ tùy theo từng dòng rễ tơ. Tuy nhiên, rễ tơ cây dừa cạn có tốc độ tăng trưởng thấp hơn so với rễ tơ từ nhiều loài thực vật khác [30] nên chúng vẫn chưa được ứng dụng vào sản xuất ở quy mô lớn. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là xác định một số điều kiện thích hợp để nuôi cấy tăng sinh khối rễ tơ cây dừa cạn làm nguồn nguyên liệu cho các ứng dụng sau đó.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các dòng rễ tơ

Ba dòng rễ tơ VIN002-12, VIN005-07 và VIN072-15 được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* C18 và dòng rễ tơ VIN077-09 được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* C26 từ cây dừa cạn do Bộ môn Công nghệ Sinh học và chuyển hóa hợp chất (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG- HCM) cung cấp. Hai dòng VIN002-12 và VIN005-07 được nuôi cấy bảo quản trên môi trường thạch Gamborg'B5 (B5) trong khi hai dòng VIN072-15 và VIN077-09 được nuôi cấy bảo quản trên môi trường thạch White (W).

Chuẩn bị nguồn rễ tơ

Cả bốn dòng rễ tơ được tăng sinh trên môi trường thạch bằng cách nuôi cấy nhánh rễ tơ có chiều dài 2–3 cm (có trọng lượng khoảng 0,1–0,2 g) trên môi trường thạch trong đĩa petri [4]. Hai dòng VIN002-12 và VIN005-07 được tăng sinh

Ngày nhận bản thảo: 06-05-2017, ngày chấp nhận đăng: 15-05-2018, ngày đăng: 10-08-2018

Tác giả: Nguyễn Như Nhứt, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM; Công ty TNHH Gia Tường (E-mail: nhunhutnguyen@yahoo.co.uk)

Bùi Văn Lệ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

trên môi trường thạch B5, hai dòng VIN072-15 và VIN077-09 được tăng sinh trên môi trường thạch W. Ủ đĩa ở nhiệt độ 25°C trong tối. Rễ được cấy chuyển sang đĩa petri chứa môi trường mới sau mỗi 3–4 tuần. Khi dòng rễ tơ phát triển đầy khắp đĩa thạch sẽ được cắt thành những nhánh rễ dài mới và được nuôi cấy tăng sinh ở điều kiện tương tự. Các nhánh rễ này được xem là cùng một dòng rễ ban đầu. Việc nuôi cấy tăng sinh được thực hiện liên tục cho đến khi đủ số lượng nghiên cứu cho mỗi dòng.

Nuôi cấy rễ tơ trên môi trường lỏng

Bốn môi trường B5, Murashige và Skoog (MS), Schenk và Hildebrandt (SH) và W và bốn môi trường có thành phần khoáng bán đậm đặc (1/2B5, 1/2MS, 1/2SH và 1/2W) được sử dụng để nuôi cấy các dòng rễ tơ. Các nhánh rễ được cắt với chiều dài tính từ vị trí cắt đến chóp rễ dài nhất khoảng 4–5 cm. Sau đó, một nhánh rễ sẽ được cấy vào bình có dung tích 300 mL chứa 50 mL môi trường để nuôi cấy. Mang bình đi lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong 3 tuần ở điều kiện tối và 25 °C. Mỗi 3 tuần tiến hành cấy chuyển toàn bộ lượng rễ sang môi trường tương tự [4].

Đánh giá khả năng tăng trưởng của rễ tơ

Sau khi nuôi cấy hai tháng trong môi trường lỏng ở các điều kiện khác nhau (môi trường cơ bản như B5, 1/2B5, MS, 1/2MS, SH, 1/2SH, W và 1/2W); pH ban đầu của môi trường thay đổi ở các mức 5; 5,7; 6; 6,5 và 7; nguồn carbon như fructose, glucose và sucrose; nồng độ nguồn carbon thay đổi trong dãy 1–5%), sinh khối được thu nhận để đánh giá khả năng tăng trưởng của bốn dòng rễ tơ. Trọng lượng tươi của rễ nguồn ban đầu được xác định bằng hiệu số trọng lượng chai môi trường lỏng sau và trước khi cấy rễ nguồn. Trọng lượng tươi của rễ sau khi nuôi cấy được xác định bằng cân trực tiếp sinh khối rễ thu được sau khi đã rửa với nước cất và thấm khô bằng giấy thấm. Trọng lượng khô của rễ sau khi nuôi cấy được xác định bằng cách sấy khô rễ ở 60 °C cho đến khi trọng lượng rễ còn lại không đổi [1]. Chỉ số tăng trưởng trọng lượng tươi (FGI, g/g rễ nguồn) được tính bằng trọng lượng sinh khối tươi cuối FW_t /trọng lượng sinh khối tươi ban đầu FW_i . Năng suất sinh khối khô (Y_{db} , g/g rễ nguồn) được tính bằng trọng lượng sinh khối khô cuối DW_t /trọng lượng sinh khối tươi ban đầu FW_i [3, 13, 16].

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.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự phát triển của rễ tơ trên môi trường cơ bản khác nhau

Các môi trường cơ bản B5, MS, SH và W có nồng độ đậm đặc và bán đậm đặc, dạng lỏng được sử dụng để nuôi cấy bốn dòng rễ tơ đã chọn lọc. Sau hai tháng nuôi cấy, một số trường hợp rễ không phát triển và/hoặc bị gãy vụn thành nhiều đoạn. Một vài trường hợp rễ không phát triển tạo rễ mới mà chuyển thành sẹo. Batra và cộng sự (2004) cho rằng tạo đặc điểm tạo sẹo là một trong những kiểu phát triển hình thái của các dòng rễ tơ cây dừa cạn *C. roseus* var. Prabal và được gọi là rễ sẹo [2]. Tuy nhiên, kết quả quan sát cho thấy với cùng một dòng rễ tơ ban đầu nhưng có nhánh rễ tạo sẹo trong khi nhánh rễ khác lại phát triển sinh khối rễ. Hiện tượng này chỉ có thể do tính không đồng nhất về mặt di truyền giữa các nhánh rễ nguồn của cùng một dòng rễ tơ [8] và/hoặc do môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, kết quả quan sát cũng phát hiện một trường hợp hình thành chồi tự phát ở dòng rễ VIN005-07 trong môi trường MS. Hiện tượng này cũng đã từng được phát hiện trên dòng rễ tơ số 8 từ cây dừa cạn sau 11 tuần cấy chuyển trong môi trường lỏng 1/2B5 [19].

Những rễ phát triển bình thường (không tạo sẹo hoặc chồi) được xác định chỉ số tăng trưởng trọng lượng tươi FGI và năng suất sinh khối khô Y_{db} . Kết quả cho thấy bốn dòng rễ có FGI không giống nhau khi được nuôi cấy trên các môi trường lỏng khác nhau. Chỉ số này cũng thay đổi đáng kể theo môi trường nuôi cấy. Trước đây, báo cáo chọn lọc môi trường nuôi cấy của nhóm tác giả Tisserant và cộng sự (2016) cho thấy rễ tơ cây *Vitis vinifera* phát triển tốt nhất trên môi trường 1/2SH [25]. Trong khi đó, rễ tơ cây *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz phát triển tốt hơn trên môi trường MS [5]. Nhìn chung, kết quả nghiên cứu này cho thấy cả bốn dòng rễ chọn lọc phát triển tốt hơn với FGI cao hơn đáng kể trong môi trường có thành phần bán đậm đặc so với môi trường đậm đặc (Bảng 1). Hai dòng rễ VIN002-12 và VIN005-07 phát triển nhanh hơn trong môi trường 1/2B5 trong khi hai dòng rễ VIN072-15 và VIN077-09 phát triển nhanh hơn trong môi trường 1/2W. Nghiên cứu cũng đã cho thấy năng suất sinh khối khô Y_{db} của rễ ở các môi trường có thành phần bán đậm đặc cũng cao hơn các môi trường đậm đặc tương ứng. Năng suất sinh khối khô của rễ đạt cao nhất ở môi trường có FGI cao nhất. Kết quả này đã cho thấy môi trường 1/2B5 thích hợp để nuôi cấy tăng sinh hai dòng rễ tơ VIN002-12 và VIN005-07 trong khi môi trường 1/2W thích hợp hơn cho hai dòng rễ tơ VIN072-15 và VIN077-09. Biết rằng hầu hết các

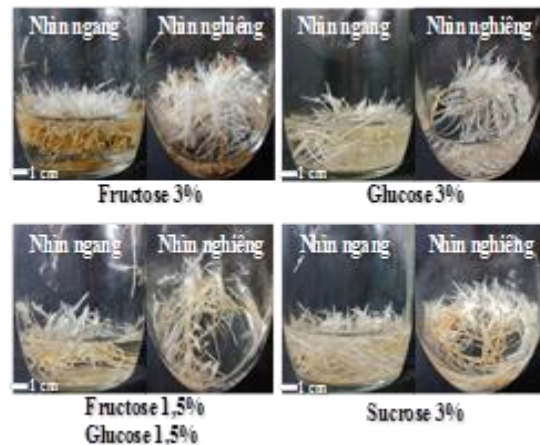
báo cáo trước đây thường sử dụng môi trường B5, 1/2B5 và 1/2MS để nuôi cấy tăng sinh rễ tơ cây dừa cạn tùy theo giống cây và chủng vi khuẩn cảm ứng. Kết quả này cho thấy, ngoài ba môi trường trên, còn có thể sử dụng môi trường 1/2W để nuôi cấy tăng sinh khối rễ tơ cây dừa cạn.

Sự phát triển của rễ tơ ở môi trường có pH ban đầu khác nhau

Nhìn chung, khoảng pH 5,7–6,5 không ảnh hưởng đáng kể lên chỉ số tăng trưởng FGI và năng suất sinh khối khô Y_{db} (Bảng 2) của các dòng rễ chọn lọc. Chỉ riêng dòng rễ VIN077-09 có trọng lượng tươi đạt cao nhất ở pH 6,0, tuy nhiên, năng suất sinh khối khô cũng không bị ảnh hưởng ở pH 5,7–6,5. Ở pH 7,0, dòng rễ này chuyển màu sẫm hơn sau khi nuôi cấy (Hình 1). Trước đây, các nghiên cứu trên dòng rễ 14-P từ cây *Picrorhiza kurroa* được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* LBA 9402 không bị ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường 1/2B5 trong dãy pH 5,0–7,0 [30]. Trong khi đó, pH 5,0 cho sinh khối khô của rễ tơ cây *Silybum marianum* cao hơn so với các pH 5,7; 6,0 và 7,0 [20]. Rễ tơ từ cây *Anisodus acutangulus* và *Plumbago indica* tăng trưởng tốt hơn trên môi trường có pH tương ứng là 6,5 [12] và 4,6 [6]. Với dòng rễ tơ LBE 6-1 từ cây dừa cạn, việc giữ ổn định pH môi trường nuôi cấy bằng các dung dịch đệm không gây ảnh hưởng lên sự phát triển [14]. Tuy nhiên, dòng rễ này tăng trưởng mạnh khi được nuôi cấy trong môi trường không được đệm và có pH ban đầu là 6,5 [7]. Qua đó cho thấy pH (ban đầu của môi trường) có ảnh hưởng khác nhau lên sự tăng trưởng của các dòng rễ từ các loài thực vật khác nhau. Giống như các kiểu nuôi cấy mô khác ở thực vật, pH ban đầu của môi trường khi nuôi cấy rễ tơ cần phải được kiểm soát. pH thường tác động trực tiếp lên tính thấm của màng tế bào [20]. Đặc biệt, pH làm thay đổi tính thấm của các ion vào trong tế bào, trong đó đáng kể nhất là ion H^+ có liên quan đến hoạt động của các enzyme quan trọng cho sự phát triển của tế bào [22]. pH quá thấp hoặc quá cao đều gây ra sự ức chế tăng trưởng cũng như tích lũy hợp chất thứ cấp ở dòng rễ tơ từ cây *Podophyllum hexandrum* [21]. pH quá thấp làm tế bào bị ngộ độc do ion H^+ trong khi pH quá cao làm cho các nguyên tố vi lượng có thể liên kết với nhau tạo thành dạng khó hấp thu [20]. Từ những kết quả thu được trên cho thấy pH ban đầu của môi trường trước khi khử trùng nên được kiểm soát trong khoảng 6,0–6,5 để nuôi cấy bốn dòng rễ tơ đã chọn lọc.

Sự phát triển của rễ tơ ở môi trường có nguồn carbon khác nhau

Trong nuôi cấy rễ tơ ở hầu hết các loài thực vật nói chung, sucrose được sử dụng như nguồn carbon thích hợp nhất để thu nhận sinh khối. Thí dụ như dòng rễ tơ T4 từ cây *Arnica montana* L. cho lượng sinh khối tươi cao nhất trên môi trường có sucrose [18]. Tuy nhiên, trong vài trường hợp, các loại đường khác cũng cho chỉ số tăng trưởng tương đương với sucrose như dòng rễ tơ 14-P từ cây *Picrorhiza kurroa* [30]. Các kết quả thu được trong nghiên cứu này cũng đã cho thấy cả bốn dòng rễ tơ chọn lọc từ cây dừa cạn cũng sử dụng sucrose như rễ tơ từ nhiều loài thực vật khác làm nguồn carbon thích hợp nhất để tăng trưởng. Chỉ số tăng trưởng FGI và năng suất sinh khối khô Y_{db} trong môi trường có nguồn carbon là sucrose ở cả bốn dòng rễ đều cao hơn đáng kể so với các nguồn carbon là glucose, fructose và kết hợp glucose với fructose (Bảng 3).



Hình 2. Minh họa sự phát triển của dòng rễ tơ VIN002-12 sau 8 tuần được nuôi cấy trong môi trường 1/2B5 có nguồn carbon khác nhau

Trước đây, với rễ tơ từ cây dừa cạn, trong kỹ thuật nuôi cấy hai giai đoạn, sucrose là nguồn carbon tốt hơn so với fructose để rễ tơ tăng trưởng sinh khối [9]. Dòng rễ tơ R/J1 từ cây dừa cạn cũng tăng trưởng tốt hơn trong môi trường 1/2B5 có bổ sung nguồn carbon là sucrose [29]. Qua đó có thể thấy sucrose là nguồn carbon thích hợp nhất để nuôi cấy hầu hết các dòng rễ tơ từ những giống cây dừa cạn khác nhau. Ngoài ra, ở cả bốn dòng rễ chọn lọc, sau sucrose, năng suất sinh khối khô ở môi trường có glucose cao hơn glucose kết hợp với fructose và thấp nhất là fructose. Đường đóng vai trò là nguồn carbon đồng thời cũng điều hòa áp suất thẩm thấu của môi trường [15]. Khả năng hấp thu cũng như thích nghi với áp suất thẩm thấu khác nhau tùy theo tế bào thực vật. Ngoài ra, tế bào từ một số loài thực vật có thể bị gây độc do vài nguồn carbon nhất định [23]. Kết quả quan sát cho thấy nguồn carbon còn có thể làm thay đổi hình dạng

của rễ. Sucrose và glucose không làm thay đổi hình dạng dòng rễ trong khi fructose làm nhánh rễ trở nên ngắn hơn và rễ phân nhánh nhiều hơn (Hình 2). Đồng thời, fructose làm rễ mọc hướng về khoảng không khí trên bề mặt môi trường nhiều hơn, phần rễ chìm trong môi trường chuyển màu sẫm hơn. Hiện tượng này xảy ra ở cả bốn dòng rễ tơ.

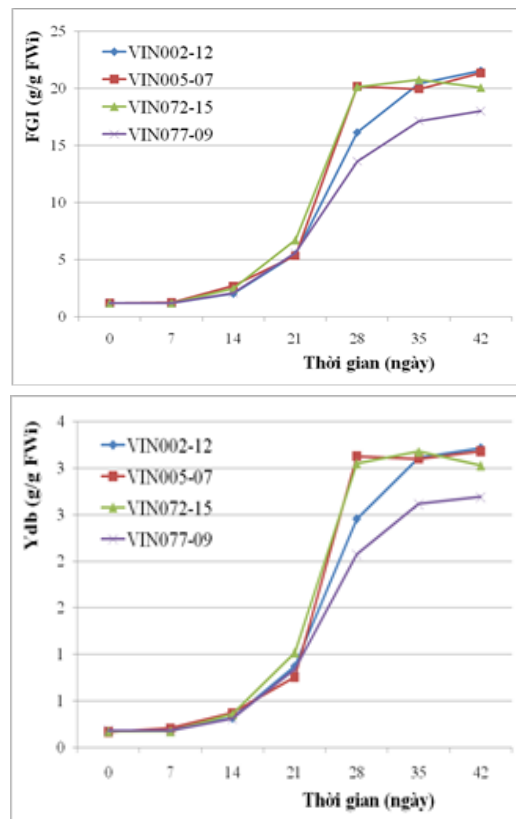
Sự phát triển của rễ tơ ở môi trường có nồng độ sucrose khác nhau

Sự thay đổi nồng độ sucrose trong môi trường nuôi cấy từ 2% đến 5% không gây ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của cả bốn dòng rễ tơ chọn lọc. Cả chỉ số FGI và Y_{db} đều không thay đổi đáng kể trong dãy nồng độ này của sucrose (Bảng 4). Tuy nhiên, ở nồng độ sucrose 1%, sự tăng trưởng sinh khối của cả bốn dòng rễ đều bị giảm đáng kể (khoảng 40% so với các nồng độ còn lại). Các nghiên cứu trước đây trên rễ tơ cho thấy nồng độ sucrose thích hợp thay đổi tùy theo dòng rễ. Thí dụ như rễ tơ cây *Vitis vinifera* tăng trưởng tốt ở môi trường sucrose với nồng độ 2% [25]. Trong khi đó, sucrose 3% giúp rễ tơ cây *Pueraria phaseoloides* tăng trưởng nhanh hơn 2, 4 và 5% [11]. Trên môi trường 1/2SH, rễ tơ cây *Angelica gigas* Nakai có thể tạo sinh khối tốt nhất ở sucrose 4% [31]. Rễ tơ cây *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz cũng phát triển tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 4% sucrose [6]. Một dòng rễ tơ cây dừa cạn lại có nồng độ sucrose thích hợp để tăng trưởng là 1,6% trên môi trường 1/2B5 [24]. Tuy nhiên, có những dòng rễ tơ có thể phát triển tốt trong một dãy nồng độ sucrose khác nhau. Thí dụ như dòng rễ tơ T4 cây *Arnica montana* L. tăng trưởng cao nhất ở môi trường có sucrose 3–5% [18] hay như sự phát triển của dòng rễ tơ số 8 từ cây dừa cạn cũng không có sự khác biệt đáng kể giữa trong dãy nồng độ sucrose này [26]. Qua đó có thể thấy nồng độ sucrose có ảnh hưởng khác nhau tùy từng dòng rễ tơ và không phụ thuộc vào loài thực vật.

Sự tăng trưởng sinh khối theo thời gian

Ở các điều kiện nuôi cấy chọn lọc (hai dòng rễ tơ VIN002-12 và VIN005-07 được nuôi cấy trong môi trường 1/2B5 với sucrose 2% và pH 5,7; hai dòng rễ tơ VIN072-15 và VIN077-09 được nuôi cấy trong môi trường 1/2W với sucrose 2% và pH 5,7), trọng lượng tươi và trọng lượng khô của sinh khối rễ được ghi nhận sau mỗi 7 ngày cho đến ngày thứ 42 sau khi cấy. Cả bốn dòng rễ chọn lọc đều có đường cong tăng trưởng sinh khối tương tự nhau (Hình 3) với thời gian thích nghi kéo dài hơn 14 ngày. Tuy nhiên, thời gian kết thúc pha tăng trưởng của hai dòng VIN002-12 và VIN077-09

xảy ra ở ngày thứ 28 trong khi với hai dòng rễ VIN005-07 và VIN072-15 là vào ngày thứ 35 sau khi cấy. Trước đây, nghiên cứu trên dòng rễ tơ LBE-6-1 được cảm ứng từ giống dừa cạn Light bright eye bằng chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 cho pha tăng trưởng kết thúc vào ngày thứ 21 sau khi cấy [4]. Tuy nhiên, nghiên cứu sâu hơn cho thấy dòng rễ tơ này có pha tăng trưởng bắt đầu từ ngày thứ 15 và kết thúc tùy theo điều kiện nuôi cấy trong bình tam giác hay bioreactor và những điều kiện dinh dưỡng cũng như vật lý đi kèm [28]. Dòng rễ tơ CP51 từ cây dừa cạn có thời gian kết thúc pha tăng trưởng là ngày thứ 30 trong khi các dòng rễ CP6, CP21 và CP33 cũng từ cùng một giống dừa cạn nhưng có thời gian kết thúc pha tăng trưởng sau 35 ngày [2]. Cũng ở điều kiện nuôi cấy trong bình tam giác, dòng rễ tơ L54 (thu được từ giống dừa cạn Cooler lilac) và hai dòng rễ tơ LP10 và LP21 (thu được từ giống dừa cạn Cooler blush) có thời gian kết thúc pha tăng trưởng vào ngày thứ 32, 29 và 35 tương ứng sau khi cấy [3]. Qua đó đã cho thấy các dòng rễ tơ từ cùng một giống dừa cạn hoặc khác giống với nhau có thể sẽ có thời gian tăng trưởng không giống nhau.



Hình 3. Đồ thị minh họa đường cong tăng trưởng của các dòng rễ tơ dừa cạn theo chỉ số tăng trưởng trọng lượng tươi (trái) và năng suất sinh khối khô (phải)

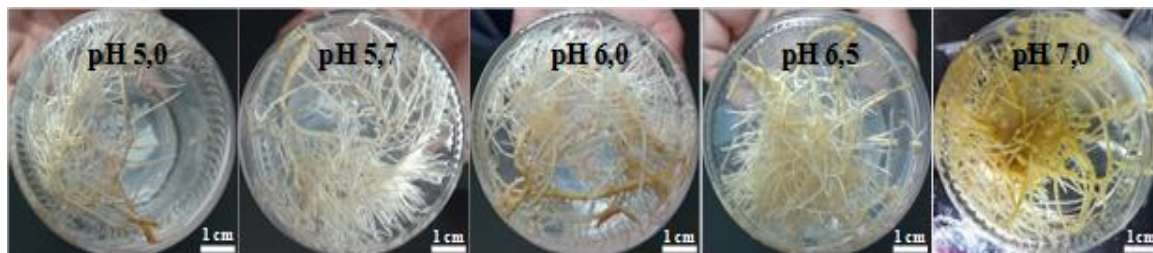
4 KẾT LUẬN

Sự tăng trưởng của rễ tơ cây dừa cạn trong môi trường lỏng chịu ảnh hưởng của các yếu tố như môi trường khoáng cơ bản, pH ban đầu của môi trường cũng như nguồn và nồng độ của nguồn carbon. Trong đó, môi trường khoáng và nguồn carbon không thích hợp có thể làm thay đổi hình thái của rễ tơ như phát triển thành sẹo hay chồi tự phát hoặc nhánh rễ trở nên ngắn hơn. Sucrose là nguồn carbon thích hợp để nuôi cấy hầu hết các dòng rễ tơ dừa cạn. pH ban đầu của môi trường nuôi cấy tăng sinh rễ tơ từ các giống dừa cạn khác nhau cần được kiểm soát trong dãy 5,7–6,5. Ở điều kiện chọn lọc, pha tăng trưởng thay đổi tùy theo từng dòng rễ tơ dừa cạn khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. Abdul, R. Gopi, C.X. Zhao, M.M. Azooz, R. Panneerselvam, "Plant growth regulators and fungicides alters growth characteristics in *Catharanthus roseus* - Comparative study", *Global Journal of Molecular Sciences*, vol.3, no. 2, pp 93–99, 2008.
- [2]. J. Batra, A. Dutta, D. Singh, S. Kumar, J. Sen, "Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration", *Plant Cell Rep.*, vol. 23, no. 3, pp. 148–154, 2004.
- [3]. R. Benyammi, P. Cédric, K.S. Majda, Z. Djamila, B. Ouarda, B. Nouara, M.A. Myassa, H. Boualem, M. Sonia, M. Abdullah, D. Stéphane, K. Lakhdar, "Screening and kinetic studies of catharanthine and ajmalicine accumulation and their correlation with growth biomass in *Catharanthus roseus* hairy roots", *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, no. 10, pp. 2033–2043, 2016.
- [4]. R. Bhadra, Establishment, cultivation and optimization of hairy roots of *Catharanthus roseus* for the synthesis of indole alkaloids, *Thesis for the doctor degree of philosophy*, Rice University, Houston, Texas, 1994.
- [5]. M.K. Cheruvathur, J. Beena, T. D. Thomas, "Rhinacanthin production from hairy root cultures of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz", *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, vol. 51, no. 4, pp. 420–427, 2015.
- [6]. M. Gangopadhyay, D. Sircar, A. Mitra, S. Bhattacharya, "Hairy root culture of *Plumbago indica* as a potential source for plumbagin", *Biologia Plantarum*, vol. 52, no. 3, pp. 533–537, 2008.
- [7]. C.H. Ho, "Effects of initial medium pH on growth and metabolism of *Catharanthus roseus* hairy root cultures—A study with ³¹P and ¹³C NMR spectroscopy", *Biotechnology Letters*, vol. 14, no.10, pp. 959–964 1992.
- [8]. Z. Bi Hu, M. Du, "Hairy root and its application in plant genetic engineering", *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 48, no. 2, pp. 121–127, 2006.
- [9]. K.H.K. Jung, S.S. Kim, S.W. Lee, H. Choi, C.Y. Liu, "Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source", *Biotechnology Letters*, vol. 14, no. 8, pp. 695–700, 1992.
- [10]. R.N. Kulkarni, K. Baskaran, T. Jhang, "Breeding medicinal plant, periwinkle (*Catharanthus roseus* (L) G. Don): a review", *Evolving trends in plant based drug discovery*, vol. 14, no. 4, pp. 283–302, 2016.
- [11]. P. Liang, H.P. Shi, Y. Qi, "Effect of sucrose concentration on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots", *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, vol. 37, no. 5, pp. 84–90, 2004.
- [12]. Q. Liu, L. Cui, Y. Guo, X. Ni, Y. Zhang, G. Kai, "Optimization of nutritive factors in culture media for growth and tropane alkaloid production from *Anisodus acutangulus* hairy roots", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 3, no. 1, pp. 001–004, 2013.
- [13]. A. Mohagheghzadeha, G. Azra, H. Shiva, D. Shadab, "Bag culture: A method for root-root co-culture", *Z. Naturforsch.*, vol. 63c, pp. 157–160, 2008.
- [14]. J.A. Morgan, C.S. Barney, A.H. Penn, J.V. Shanks, "Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 53, no. 3, pp. 262–265, 2000.
- [15]. V. B. de P. Neto, W.C. Otoni, "Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter", *Scientia Horticulturae*, vol. 97, pp. 193–202, 2003.
- [16]. N. Patra, A.K. Srivastava, "Mass scale artemisinin production in a stirred tank bioreactor using hairy roots of *Artemisia annua*", *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, vol. 4, no. 6, pp. 467–474, 2014.
- [17]. C.A.M. Peebles, Metabolic engineering of the terpenoid indole alkaloid pathway of *Catharanthus roseus* hairy roots, *Thesis for the doctor degree of philosophy*, Rice University, Houston, Texas, 2008. pp.
- [18]. M. Petrova, E. Zayova, M. Vlahova, "Induction of hairy roots in *Arnica montana* L. by *Agrobacterium rhizogenes*", *Central Europ. J. Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 470–479, 2013.
- [19]. Pietrosiuk, M. Furmanowa, "Preliminary results of indole alkaloids production in different roots of *Catharanthus roseus* cultured in vitro", *Acta Soc. Bot. Pol.*, vol. 70, pp. 261–265, 2001.
- [20]. S. Rahimi, T. Hasanloo, "The effect of temperature and pH on biomass and bioactive compounds production in *Silybum marianum* hairy root cultures", *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*, vol. 3, no. 2, pp. 53–59, 2016.
- [21]. M. Rajesh, S. Ganeshan, A. Muthukrishnan, V. Venkatachalam, T. Jeevaraj, G. Shanmugam, M.

- Markandan, S. Natesan, G. Andy, "Factors influencing podophyllotoxin production in adventitious root culture of *Podophyllum hexandrum* Royle", *Acta Physiol Plant*, vol. 36, pp. 1009–1021, 2014.
- [22]. G. Sivakumar, K.W. Yu, E.J. Hahn, K.Y. Paek, "Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors", *Current Science*, vol. 89, no. 4, pp. 641–649, 2005.
- [23]. H. Slesak, S. Andrzej, P. Leslaw, "Exogenous carbohydrate utilisation by explants of *Brassica napus* cultured *in vitro*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 79, pp. 45–51, 2004.
- [24]. D. Thakore, A.K. Srivastava, A.K. Sinha, "Yield enhancement strategies for enhancement of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*", *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, vol. 4, no. 3, pp. 153–156, 2013.
- [25]. L.P. Tisserant, A. Aziz, J. Nathalie, J. Philippe, C. Christophe, C. Eric, B.C. Michèle, "Enhanced stilbene production and excretion in *Vitis vinifera* cv Pinot Noir hairy root cultures", *Molecules*, vol. 21, pp. 1–17, 2016.
- [26]. L. Toivonen, M. Ojala, V. Kauppinen, Studies on the optimization of growth and indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*, *Biotechnol. Bioeng*, 37, 7, 673–680 (1991).
- [27]. T. Tzfira, V. Citovsky, "Agrobacterium—From biology to biotechnology", Springer, 2008.
- [28]. S.N. Vani, "Bioreactor design for scaleup of *Catharanthus roseus* hairy root cultures for production of indole alkaloid, Thesis for the doctor degree of philosophy, Rice University, Houston, Texas, 1996, pp. .
- [29]. F. Vázquez-Flota, O. Moreno-Valenzuela, M. L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, V. M. Loyola-Vargas, "Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures, *Plant cell*", *Tissue and Organ culture*, vol. 38, pp. 273–279, 1994.
- [30]. P. Verma, A.K. Mathur, K. Shanker, "Growth alkaloid production, rol genes integration, bioreactor up-scaling and plant regeneration studies in hairy root lines of *Catharanthus roseus*", *Plant Biosystems*, vol. 146, no. 1, pp. 27–40, 2012.
- [31]. H. Xu, H.P. Jee, Y.K. Kim, N. I. Park, S.Y. Lee, S.U. Park, "Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas* Nakai", *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 3, no. 1, pp. 978–981, 2009.



Hình 1. Minh họa sự phát triển của dòng rễ tơ VIN077-09 sau 8 tuần được nuôi cấy trong môi trường 1/2W có pH ban đầu khác nhau

Bảng 1. Sự tăng trưởng của các dòng rễ tơ dưa cạn sau 8 tuần được nuôi cấy trong các môi trường lỏng khác nhau

Môi trường nuôi cấy lỏng	VIN002-12		VIN005-07		VIN072-15		VIN077-09	
	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)
B5	13,4 ^d	2,11 ^d	9,5 ^{de}	1,49 ^{de}	7,3 ^f	1,13 ^f	6,7 ^f	1,08 ^f
1/2B5	29,1 ^a	4,63 ^a	28,9 ^a	4,56 ^a	18,1 ^c	2,86 ^c	13,8 ^c	2,24 ^c
MS	9,5 ^e	1,49 ^e	8,3 ^e	1,35 ^e	7,4 ^f	1,14 ^f	8,4 ^e	1,33 ^e
1/2MS	21,3 ^b	3,36 ^b	22,0 ^c	3,46 ^{bc}	20,4 ^b	3,28 ^b	16,0 ^b	2,59 ^b
SH	6,7 ^f	1,05 ^f	6,9 ^f	1,08 ^f	3,5 ^g	0,55 ^g	4,9 ^g	0,79 ^g
1/2SH	17,8 ^c	2,85 ^c	21,6 ^c	3,33 ^c	13,5 ^d	2,11 ^d	12,1 ^d	1,92 ^d
W	12,5 ^d	1,96 ^d	10,4 ^d	1,63 ^d	11,1 ^e	1,79 ^e	11,2 ^d	1,82 ^d
1/2W	22,0 ^b	3,50 ^b	23,7 ^b	3,64 ^b	26,5 ^a	4,14 ^a	23,0 ^a	3,70 ^a

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Bảng 2. Sự tăng trưởng của các dòng rễ tơ dừa cạn sau 8 tuần được nuôi cấy trong môi trường có pH khác nhau

pH ban đầu của môi trường	VIN002-12		VIN005-07		VIN072-15		VIN077-09	
	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)
5,0	18,7 ^b	2,94 ^{cd}	19,4 ^b	3,09 ^{ab}	19,7 ^b	3,16 ^a	15,6 ^b	2,40 ^{bc}
5,7	20,7 ^a	3,16 ^{bc}	22,0 ^a	3,49 ^{ab}	20,5 ^{ab}	3,19 ^a	16,2 ^b	2,62 ^a
6,0	21,4 ^a	3,35 ^{ab}	21,7 ^a	3,45 ^a	21,3 ^a	3,37 ^a	17,8 ^a	2,82 ^a
6,5	21,7 ^a	3,42 ^a	22,4 ^a	3,49 ^a	19,9 ^b	3,07 ^a	15,9 ^b	2,61 ^{ab}
7,0	17,4 ^b	2,74 ^d	18,3 ^b	2,87 ^b	14,6 ^c	2,30 ^b	13,9 ^c	2,23 ^c

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Bảng 3. Sự tăng trưởng của các dòng rễ tơ dừa cạn sau 8 tuần được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung nguồn carbon khác nhau

Nguồn carbon	VIN002-12		VIN005-07		VIN072-15		VIN077-09	
	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)
Fructose	9,0 ^d	1,40 ^d	8,3 ^d	1,29 ^d	7,2 ^d	1,14 ^d	7,4 ^d	1,16 ^d
Glucose	17,7 ^b	2,75 ^b	15,0 ^b	2,37 ^b	16,6 ^b	2,63 ^b	12,0 ^b	1,88 ^b
Sucrose	21,2 ^a	3,35 ^a	21,9 ^a	3,45 ^a	20,4 ^a	3,20 ^a	16,4 ^a	2,59 ^a
Fructose+ Glucose	12,8 ^c	2,00 ^c	12,0 ^c	1,92 ^c	10,1 ^c	1,61 ^c	9,4 ^c	1,52 ^c

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Bảng 4. Sự tăng trưởng của các dòng rễ tơ dừa cạn sau 8 tuần được nuôi cấy trong môi trường có hàm lượng sucrose khác nhau

Nồng độ sucrose (%)	VIN002-12		VIN005-07		VIN072-15		VIN077-09	
	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)	FGI (g/g FW _i)	Y _{db} (g/g FW _i)
1	13,2 ^b	2,07 ^b	12,4 ^b	1,96 ^b	14,9 ^b	2,32 ^b	10,5 ^b	1,64 ^b
2	21,3 ^a	3,33 ^a	21,3 ^a	3,25 ^a	20,4 ^a	3,24 ^a	17,0 ^a	2,68 ^a
3	21,2 ^a	3,32 ^a	21,6 ^a	3,42 ^a	20,5 ^a	3,29 ^a	16,6 ^a	2,66 ^a
4	21,3 ^a	3,38 ^a	21,5 ^a	3,36 ^a	20,8 ^a	3,33 ^a	16,7 ^a	2,61 ^a
5	21,3 ^a	3,35 ^a	21,5 ^a	3,38 ^a	20,0 ^a	3,20 ^a	16,8 ^a	2,64 ^a

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Study on the growth of *Agrobacterium rhizogenes*-induced *Catharanthus roseus* hairy roots in liquid media

Nguyen Nhu Nhut^{1,2}, Bui Van Le¹

¹University of Science, VNU-HCM, ²Gia Tuong Company, Binh Duong Branch

Corresponding author: nhunhutnguyen@yahoo.co.uk

Received: 06-05-2017, Accepted: 15-05-2018, Published: 10-08-2018

Abstract – *Catharanthus roseus* hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* get potential to apply to many fields. The suitable conditions for culturing depend on each hairy root line. In shaken liquid media in dark at 25 °C, VIN002-12 and VIN005-07 hairy root lines had the best growth in hemi-concentrated Gamborg'B5 media while VIN072-15 and VIN077-09 lines showed the best growth in hemi-concentrated White media. The appropriate initial pH of medium for the lines was

in range of 5.7–6.5. The hairy root lines used 2–5% sucrose as an optimal source of carbon for their growth. In selected conditions, the growth kinetics curves showed the end of exponential phase at the 28th day of culture with VIN005-07 and VIN072-15 lines whereas at the 35th day with VIN002-12 and VIN077-09 lines. The initial results are quite possible to produce biomass for researches on four hairy root lines in the future.

Index Terms – *Agrobacterium rhizogenes*, *Catharanthus roseus*, hairy root, liquid media