

Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) thông qua *Agrobacterium rhizogenes* K599

Phí Thị Cẩm Miện^{1*}, Nguyễn Minh Đức¹, Kim Anh Tuấn¹, Nguyễn Đức Bách¹, Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Lê Thị Vân Anh³, Dương Phương Thảo⁴

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Trường THPT chuyên Lê Hồng Phong, Nam Định

Ngày nhận bài 23/9/2019; ngày chuyển phản biện 26/9/2019; ngày nhận phản biện 28/10/2019; ngày chấp nhận đăng 31/10/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm cảm ứng tạo rễ tơ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* K599 và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng sinh khối rễ tơ. Ba loại vật liệu khác nhau là mô sẹo, lá mầm và rễ cây con *in vivo* được sử dụng làm nguồn lây nhiễm cảm ứng tạo rễ tơ. Kết quả cho thấy, rễ cây con *in vivo* là loại vật liệu thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ cây xáo tam phân. Mật độ vi khuẩn cho tỷ lệ mô rễ cảm ứng tạo rễ cao nhất (42,7%) tương ứng với giá trị mật độ quang OD₆₀₀=0,6 trong thời gian lây nhiễm là 30 phút. Các dòng rễ tơ có khả năng tăng trưởng nhanh, ổn định và hiệu quả hình thành rễ tơ cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường WPM/2 không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng ở điều kiện tối trong 6 ngày. Chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang ức chế sự hình thành rễ tơ giai đoạn ủ cảm ứng nhưng thúc đẩy quá trình này khi áp dụng ở bước loại bỏ vi khuẩn. Các dòng rễ tơ chuyển gen đã được kiểm chứng nhờ kỹ thuật PCR với cặp mồi chuyên rolC.

Từ khóa: *Agrobacterium rhizogenes*, nhân nhanh, phytohormon, rễ tơ.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) là một loài dược liệu quý ở Việt Nam, chứa hàm lượng hoạt chất sinh học chống ung thư cao như coumarin, otruthin, saponin. Những hợp chất này đã được chứng minh có tác dụng điều trị nhiều bệnh ung thư, đặc biệt là ung thư gan [1]. Ngoài tự nhiên, xáo tam phân phân bố chủ yếu ở bán đảo Hòn Hèo, thị xã Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa. Tuy nhiên, việc nhân giống và bảo tồn xáo tam phân còn nhiều hạn chế do đặc tính khó nhân giống của loài dược liệu này. Thêm vào đó, rễ xáo tam phân thường chỉ có giá trị dược liệu cao sau 5 năm trồng. Vì vậy, việc áp dụng công nghệ sinh học vào sản xuất nhằm tăng sinh khối rễ là cần thiết. Trên thế giới, biến nạp gen sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* chứa gen rol mã hóa auxin nội sinh [2] để thay đổi thông tin di truyền đã được ghi nhận là công cụ có tiềm năng cải thiện sản xuất những hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học [3]. Rễ tơ được tạo ra do sự chuyển gen từ hệ thống vector tự nhiên của tác nhân “gây bệnh” hay “cộng sinh” là *A. rhizogenes* vào tế bào thực vật [4]. Nuôi cấy rễ tơ có ưu điểm là sinh trưởng mạnh, không hướng đất, không phụ thuộc vào chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh, bền vững về mặt di truyền và có khả năng tổng hợp các hoạt chất thứ cấp với hàm lượng cao hơn hoặc bằng cây mẹ [4]. Do vậy, trong nghiên cứu này, các điều kiện cảm ứng tạo rễ được khảo sát nhằm góp phần hoàn thiện quy trình

thu nhận rễ tơ từ cây xáo tam phân để phục vụ cho nghiên cứu và sản xuất nguồn nguyên liệu thứ cấp, đáp ứng nhu cầu chữa bệnh hiện nay.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Hạt và cây con xáo tam phân được cung cấp bởi Công ty TNHH Bá Ninh, Ninh Hòa, Khánh Hòa, Việt Nam.

Dòng vi khuẩn *Agrobacterium* K599 dùng cho việc chuyển gen vào cây xáo tam phân được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Mồi được thiết kế theo trình tự gen rolC của vi khuẩn *A. rhizogenes* K599 vector Ri plasmid rolCF (5'- CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC-3') và rolCR (5'-TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA-3') (GenBank accession number is EF433766).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị vật liệu chuyển gen: vật liệu được sử dụng để chuyển gen là lá mầm, rễ cây con *in vitro* và *in vivo* xáo tam phân. Quả xáo tam phân được rửa sạch, lắc trong javel 7 phút, sau đó rửa sạch bằng nước lọc và ngâm cồn 70° trong 30 s rồi đưa vào buồng

* Tác giả liên hệ: Email: Mienbmtvat@gmail.com

Study on the transgenic technique to produce hairy roots of *Paramignya trimera* through *Agrobacterium rhizogenes* K599

Thi Cam Mien Phi^{*}, Minh Duc Nguyen¹,
Anh Tuan Kim¹, Duc Bach Nguyen¹, Bich Ngoc Pham²,
Hoang Ha Chu², Thi Van Anh Le³, Phuong Thao Duong⁴

¹Biotechnology Faculty, Vietnam National University of Agriculture
²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology
³University of Science and Technology of Hanoi,
Vietnam Academy of Science and Technology
⁴Le Hong Phong Specialized Upper Secondary School, Nam Dinh

Received 23 September 2019; accepted 31 October 2019

Abstract:

The study was conducted to induce the hairy roots of *Paramignya trimera* by using *Agrobacterium rhizogenes* K599 and investigate some factors affecting the growth of hairy roots. Three types of materials (calluses, cotyledons and *in vivo* roots) have been used as sources for hairy roots induction. The study results showed that, the *in vivo* roots was the most suitable material to induce the hairy roots. It was suggested that roots of the seedlings soaked in *A. rhizogenes* K599 suspension at the cell density of $OD_{600}=0.6$ for 30 minutes yielded the highest rate of root induction (42.7%). The hairy roots grew rapidly and stably when cultured in WPM/2 medium without phytohormones supplement in dark conditions for 6 days. Illumination with white fluorescent light was found to inhibit hairy root formation during co-cultivation period but promote it during the bacterial elimination step. The transgenic hairy root lines were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) using rolC specific primers.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, micropropagation, phytohormone.

Classification number: 4.6

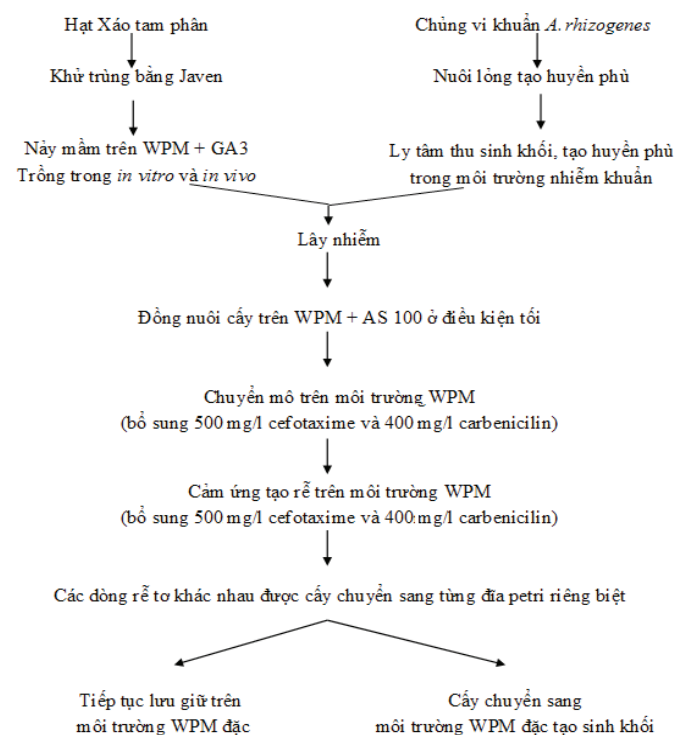
cây vô trùng. Hạt xáo tam phân được lấy ra khỏi quả và được lãc trong jonhson 0,5% 3 phút, cấy vào môi trường WPM, bổ sung Gibberellin (GA3) từ 0,1-0,6 mg/l, pH=5,7. Sau 2 tuần, các hạt bắt đầu nảy mầm, các lá mầm sẽ được cắt nhỏ và chuyển vào môi trường có bổ sung (IAA, 2,4D) với các nồng độ khác nhau để đánh giá khả năng tạo mô sẹo. Ba loại vật liệu lá mầm, mô sẹo và rễ cây con *in vivo* sẽ được nghiên cứu tiếp để tạo vật liệu chuyển gen tạo rễ tơ xáo tam phân.

Chuẩn bị vi khuẩn *A. rhizogenes*: chủng vi khuẩn K599 được chọn lọc và nuôi trong môi trường YMB, chỉnh pH đến 7,0 và khử

trùng môi trường ở 121°C trong 15 phút. Sau đó chia thành 2 ống, ống 20 ml chứa môi trường nuôi khuẩn đặc trên đĩa petri và ống 50 ml chứa môi trường nuôi khuẩn lỏng trong các ống falcon.

Chuẩn bị dung dịch để tạo huyền phù khuẩn: chủng vi khuẩn K599 được lấy từ ống giữ chủng, cấy vạch trên môi trường nuôi khuẩn đặc, đặt đĩa khuẩn trong tủ ổn nhiệt 28°C trong 48 h. Sau 48 h, lấy một đĩa khuẩn lãc cấy trên môi trường nuôi khuẩn lỏng. Bình nuôi lỏng được đặt trong máy lãc tốc độ 200 vòng/phút, nhiệt độ 28°C, nuôi lãc 18-24 h để nhân sinh khối vi khuẩn. Ly tâm 5000 vòng/phút trong thời gian 15 phút để thu tế bào khuẩn, hòa loãng sinh khối thu được trong 50 ml WPM lỏng để tạo huyền phù vi khuẩn và đo mật độ vi khuẩn ở bước sóng 600 nm để tiếp tục hòa loãng về mật độ $OD_{600}=0,2; 0,4; 0,6; 0,8$.

Phương pháp chuyển gen: khi dung dịch vi khuẩn *A. rhizogenes* phát triển đến giữa pha tăng trưởng thì được sử dụng để lây nhiễm [3]. Lấy 30 mẫu mô sẹo, lá mầm hoặc 30 mẫu cây con chứa rễ trong điều kiện *in vivo*, tiến hành gây tổn thương rễ cây con *in vivo*, mô sẹo và lá mầm, sau đó lãc chung với 30 ml dịch vi khuẩn trong khoảng thời gian 30 phút (mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần), trong thời gian này thỉnh thoảng lãc nhẹ. Sau đó mẫu được lấy ra, thấm khô bằng giấy lọc vô trùng rồi nuôi trên môi trường đồng nuôi cây WPM, có bổ sung thêm 100 μ M acetosyringone, đặt trong buồng tối từ 72 đến 144 h ở nhiệt độ 25°C. Các mẫu sau đó được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo rễ tơ, khử khuẩn và tái sinh (WPM/2 + 30 g sucrose + 8 g agar + 500 mg/l cefotaxime và 400 mg/l carbenicilin, pH=5,8), các mẫu được đặt trong tối, ở nhiệt độ phòng 26 $\pm$ 2°C. Định kỳ 7-10 ngày cấy chuyển một lần, quan sát mẫu và sự xuất hiện rễ cũng như tốc độ sinh trưởng của



Hình 1. Quy trình tóm tắt tạo rễ tơ cây xáo tam phân.

nó để quyết định thời gian tách rễ và cấy chuyển. Mẫu đối chứng là những mảnh cắt được nuôi cấy không lây nhiễm với vi khuẩn cũng được nuôi cấy trên các môi trường tương tự. Sau một thời gian khử khuẩn và nuôi cấy, rễ tơ được sinh ra từ vết thương của mẫu lây nhiễm. Chi tiêu theo dõi là phần trăm số mẫu cảm ứng tạo rễ tơ và số rễ tơ tạo ra trên mỗi mẫu sau 5-7 tuần. Mẫu đối chứng là các mảnh mẫu được nuôi cấy không cho lây nhiễm với vi khuẩn, cũng được nuôi cấy trên các môi trường tương tự. Quy trình tạo rễ tơ của cây xáo tam phân được thể hiện trên hình 1.

Kiểm tra sự chuyển gen: PCR với các cặp mồi đặc hiệu của gen *rolC* được sử dụng để kiểm tra sự chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào thực vật [5]. ADN của rễ xáo tam phân và tế bào vi khuẩn được tách chiết theo quy trình của QIAGEN. Cặp mồi khuếch đại đoạn gen *rolC* là Ri plasmid *rolCF* (5'-CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC-3') và *rolCR* (5'-TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA-3') (GenBank accession number is EF433766). Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích hỗn hợp là 25 μ l gồm 1 μ l ADN bộ gen (hay Ri plasmid), 2 μ l dNTPs 2 mM, 1,25 μ l DreamTaq DNA polymerase (1 unit/ μ l), 10 pmol với mỗi mồi, 1,5 μ l DreamTaq buffer và bổ sung nước siêu sạch để đủ thể tích. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *rolC* là biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (95°C trong 30 s, 54°C trong 30 s và 72°C trong 60 s) 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 ngâm với dung dịch nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV.

Phân tích số liệu

Các số liệu được phân tích bằng Microsoft Excel 2007 và thống kê bằng phần mềm SPSS 16.0, phân hạng theo phương pháp Duncan với độ tin cậy $p=0,05$.

Kết quả và thảo luận

Tạo vật liệu chuyển gen

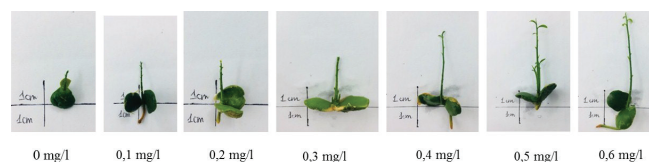
Ảnh hưởng của GA3 đến khả năng phát sinh chồi từ hạt xáo tam phân: các hạt sạch bệnh sau khử trùng được chuyển sang môi trường có bổ sung GA3 ở các nồng độ khác nhau để đánh giá khả năng nảy mầm.

Bảng 1. Ảnh hưởng của GA3 đến khả năng phát sinh chồi từ hạt xáo tam phân.

Nồng độ GA3 (mg/l)	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (%)	Hình thái chồi
0	36,67 $\pm$ 3,34 ^d	Chồi nhỏ, ngắn
0,1	47,78 $\pm$ 1,92 ^c	Chồi nhỏ, ngắn
0,2	74,44 $\pm$ 1,93 ^b	Chồi mập, ngắn
0,3	76,22 $\pm$ 1,92 ^b	Chồi dài, nhỏ
0,4	92,22 $\pm$ 1,92 ^a	Chồi dài, mập
0,5	96,7 $\pm$ 1,73 ^a	Chồi dài, mập
0,6	94,1 $\pm$ 1,98 ^a	Chồi dài, gầy

GA3 có ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng phát sinh chồi và hình thái chồi từ hạt xáo tam phân sau 2 tuần nuôi cấy (bảng 1). Khi bổ sung GA3 với nồng độ 0,5 mg/l các mẫu hạt

phát sinh chồi đạt tỷ lệ cao nhất là 96,7%, chồi bật lên mập, khỏe, có sức sống cao. Tuy nhiên, khi giảm nồng độ GA3 xuống còn 0,3; 0,2 và 0,1 mg/l thì tỷ lệ bật phát sinh chồi giảm mạnh lần lượt là 76,22; 74,44 và 47,78%. Khi không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng GA3 thì tỷ lệ mẫu phát sinh chồi cũng giảm mạnh chỉ là 36,67% (bảng 1, hình 2).



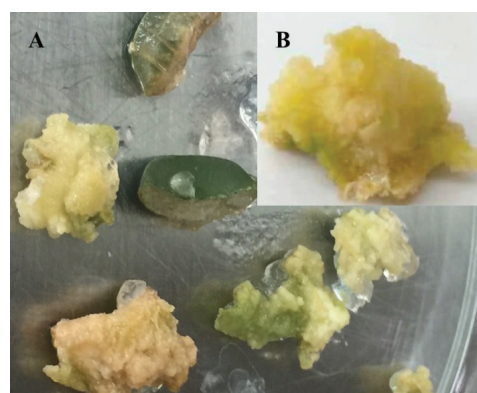
Hình 2. Chồi xáo tam phân phát sinh từ hạt trong môi trường có bổ sung GA3 sau 2 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của IAA, 2,4D tới khả năng tạo mô sẹo làm vật liệu chuyển gen tạo rễ tơ xáo tam phân: lá mầm (nội nhũ) được tách từ các chồi in vitro phát sinh từ hạt, có rễ hoàn chỉnh được cắt nhỏ và cấy vào các môi trường có bổ sung auxin (IAA, 2,4D) để tạo mô sẹo.

* Ảnh hưởng của IAA tới việc hình thành mô sẹo từ lá mầm *in vitro*: mô lá mầm được cắt nhỏ và cấy vào MTN (WPM + 30 g/l saccarozơ + 8,0 g/l agar + 0,3 mg/l GA3) có bổ sung IAA (0-2,0 mg/l). Sau 6 tuần nuôi cấy, các mô sẹo được hình thành, trong đó môi trường MTN bổ sung 2,0 mg/l IAA cho tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất với 68,89% (bảng 2). Mô sẹo xuất hiện có màu trắng xanh, xốp đặc được hình thành trên các vết cắt tạo ra trong quá trình nuôi cấy (hình 3).

Bảng 2. Ảnh hưởng của IAA tới việc hình thành mô sẹo từ lá mầm *in vitro*.

Nồng độ IAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)
0	63,70 $\pm$ 2,57 ^b	25,93 $\pm$ 2,22 ^c
0,5	68,89 $\pm$ 2,22 ^c	48,15 $\pm$ 2,34 ^a
1,0	75,56 $\pm$ 2,23 ^c	53,33 $\pm$ 3,4 ^b
1,5	83,70 $\pm$ 3,4 ^a	63,70 $\pm$ 3,51 ^b
2,0	88,89 $\pm$ 3,51 ^a	68,89 $\pm$ 3,7 ^a

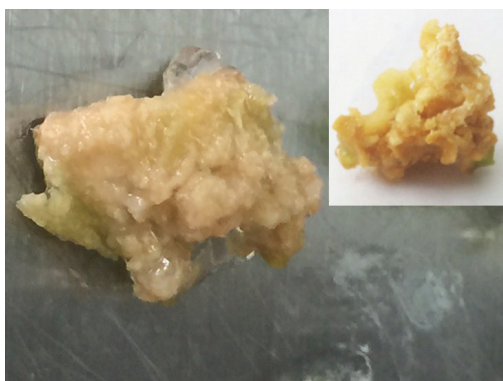


Hình 3. Mô sẹo lá mầm *in vitro* xáo tam phân trong môi trường MTN có bổ sung 2,0 mg/l IAA sau 6 tuần nuôi cấy. A: đĩa mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy; B: hình ảnh chi tiết một mô sẹo xáo tam phân.

* Ảnh hưởng của 2,4D tới việc hình thành mô sẹo từ lá mầm *in vitro*: mô lá mầm sạch được cắt nhỏ và cấy vào MTN có bổ sung 2,4D với nồng độ từ 0-2,0 mg/l. Sau 6 tuần nuôi cấy, các mẫu xuất hiện mô sẹo trên vết cắt. Ở nồng độ 2,0 mg/l 2,4D cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất (90,37%), tỷ lệ mẫu sống thấp nhất là 73,33% ở nồng độ 0,5 mg/l 2,4D. Trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l 2,4D cho tỷ lệ mô sẹo đạt cao nhất 70,74% (bảng 3). Mẫu mô sẹo tạo ra có màu vàng nhạt, dạng hạt nhỏ, xốp mềm, nằm ở rìa các vết cắt, sau đó phủ trên toàn bộ mẫu (hình 4).

Bảng 3. Ảnh hưởng của 2,4D tới việc hình thành mô sẹo từ lá mầm *in vitro*.

Nồng độ 2,4D (mg/l)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)
0	69,63±2,25 ^d	0
0,5	73,33±3,39 ^c	28,52±3,85 ^c
1,0	79,26±3,39 ^c	46,66±3,39 ^c
1,5	84,44±3,85 ^b	61,85±4,62 ^b
2,0	90,37±4,62 ^a	70,74±5,59 ^a



Hình 4. Mô sẹo lá mầm *in vitro* xáo tam phân trong môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l 2,4D sau 6 tuần nuôi cấy.

Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ xáo tam phân

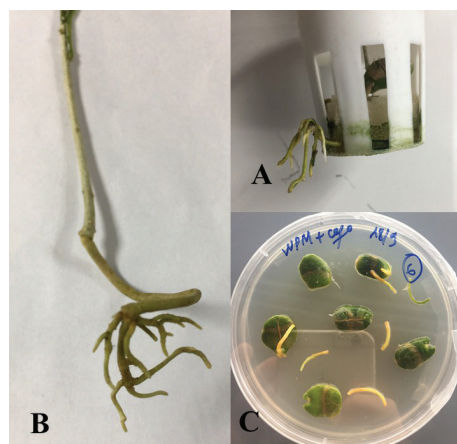
Ảnh hưởng của vật liệu nuôi cấy tới khả năng kích tạo rễ tơ xáo tam phân: nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng nguồn vật liệu dùng cho lây nhiễm với vi khuẩn có khả năng cảm ứng chuyển gen khác nhau [6]. Ba loại mẫu là lá mầm, mô sẹo và rễ cây con *in vivo* được lây nhiễm trong thời gian 30 phút, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ, số rễ tơ tạo ra trên mỗi mẫu cấy được ghi nhận sau 5 và 6 tuần nuôi cấy (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của loại mô lây nhiễm đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ xáo tam phân.

Bộ phận lây nhiễm	Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ (%)	Số rễ tơ tạo ra (rễ/mẫu)
Mô sẹo	0 ^b	0 ^b
Lá mầm	11,2±0,4 ^a	2,8±0,3 ^a
Rễ cây con <i>in vivo</i>	13,2±0,6 ^a	2,1±0,3 ^a

Kết quả nghiên cứu sau 6 tuần cho thấy, chỉ có lá mầm, rễ cây con *in vitro* có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ ở vi khuẩn K599. Đối với mô sẹo hoàn toàn không hình thành rễ tơ. Tỷ lệ cảm ứng

tạo rễ tơ và số rễ từ lá mầm và rễ cây con *in vivo* lần lượt là 11,2; 13,2% và 2,8; 2,1 rễ/mẫu (bảng 4, hình 5). Kim (2008) đã chứng minh rằng chủng *A. rhizogenes* K599 cho tỷ lệ phần trăm số mẫu cảm ứng tạo rễ tơ trên lá lạc là 36,8% và số rễ tơ tạo ra từ vị trí bị thương là 2,3 rễ [7]. Còn trên mẫu từ trụ hạ diệp thì tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ là 75,9% và 6,7 rễ. Trong thí nghiệm này, thời gian cảm ứng của mẫu rễ là 3-4 tuần. Qua kết quả thí nghiệm, có thể nhận xét rằng hiệu suất biến nạp gen phụ thuộc vào loại mô, cơ quan hay vị trí xâm nhiễm, nhận xét này phù hợp với nhận xét của Rahimi và cộng sự (2008) [8]. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ và số rễ tơ tạo ra trên mỗi mẫu đối với xáo tam phân còn thấp hơn nhiều so với một số loài thực vật khác.



Hình 5. Hình ảnh rễ tơ được cảm ứng từ mô rễ *in vivo*. A: mẫu rễ tơ sau chuyển gen 4 tuần trong điều kiện *in vivo* từ rễ *in vivo*; B: mẫu cây con *in vivo* sau chuyển gen được tách ra khỏi bình nuôi cấy; C: mẫu rễ tơ chuyển gen từ lá mầm.

Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn tới khả năng tạo rễ tơ từ mô rễ xáo tam phân: mặc dù lá mầm có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ, nhưng khả năng tăng sinh và sống sót của rễ tơ còn phản ứng chậm. Do đó, trong các thí nghiệm tiếp theo, vật liệu được sử dụng cho nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ là rễ cây con *in vivo*. Mật độ vi khuẩn *A. Rhizogenes* là yếu tố có ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ của thực vật. Kiana và Pirian (2012) khảo sát khả năng cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá cây *Portulaca oleracea* tại bốn mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes* K599 tương ứng với giá trị $OD_{600}=0,2; 0,4; 0,6; 0,8$ và nhận thấy mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600}=0,8$ cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ đạt cao nhất (70%), trong khi mật độ vi khuẩn ở giá trị OD_{600} cao hoặc thấp hơn 0,8 cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ chỉ đạt 30-50% [9].

Nghiên cứu cũng cho thấy sự khác nhau về tỷ lệ mẫu tạo rễ và số rễ/mẫu khi lây nhiễm rễ cây con *in vivo* cây xáo tam phân với vi khuẩn ở các mật độ khác nhau tương ứng với các giá trị $OD_{600}=0,2; 0,4; 0,6$ và 0,8 (bảng 5). Tỷ lệ mô rễ cảm ứng tạo rễ (56,25%) và số rễ/mẫu (6,56 rễ) đạt cao nhất khi mật độ vi khuẩn ở giá trị $OD_{600}=0,6$. Ở mật độ vi khuẩn thấp hơn ($OD_{600}=0,8$) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ và số rễ/mẫu thấp hơn. Do vậy, mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600}=0,6$ là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ xáo tam phân.

Bảng 5. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes* đến khả năng tạo rễ tơ.

Giá trị OD	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ/mẫu (rễ)
0,2	16,17±1,8 ^c	0,21±0,02 ^d
0,4	26,51±2,1 ^b	0,88±0,05 ^c
0,6	56,25±3,2 ^a	6,56±0,16 ^a
0,8	23,12±1,8 ^b	2,37±0,06 ^b

Ghi chú: các giá 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 $p=0,05$.

Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm tới khả năng kích tạo rễ tơ xáo tam phân: xáo tam phân là loài thực vật thân gỗ nên việc chuyển gen còn gặp nhiều khó khăn do thân mầm hóa gỗ nhanh. Do vậy, ngoài mật độ tế bào trong huyền phù *A. rhizogenes* K599 thì nghiên cứu tối ưu hóa thời gian gây nhiễm mẫu thực vật với huyền phù vi khuẩn cũng như thời gian ủ cảm ứng sau đó cũng là những yếu tố có ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ [2]. Thời gian gây nhiễm là thời gian cần thiết để vi khuẩn có thể tiếp xúc với tế bào thực vật chủ ở vị trí bị tổn thương. Trong nghiên cứu này, mẫu rễ cây con *in vivo* cây xáo tam phân sau khi được tạo vết thương được gây nhiễm bằng cách ngâm trong huyền phù *A. rhizogenes* K599 có OD₆₀₀ mật độ 0,6 với thời gian khác nhau. Kết quả thu được cho thấy, ảnh hưởng của thời gian gây nhiễm có sự tương đồng với ảnh hưởng của mật số tế bào lên sự cảm ứng tạo rễ tơ. Theo đó, khi tăng thời gian gây nhiễm từ 5 đến 30 phút, tỷ lệ mẫu đáp ứng cũng tăng theo. Tuy nhiên, thời gian gây nhiễm hơn 30 phút sẽ gây ra hiện tượng mẫu chết do sự phát triển quá mức của vi khuẩn sau đó (bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian ngâm mẫu với huyền phù chủng *A. rhizogenes* K599 lên tỷ lệ mẫu hình thành rễ.

Thời gian lây nhiễm (phút)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
5	22,6±1,8 ^c
10	26,2±2,0 ^c
15	30,4±2,6 ^b
30	42,7±3,2 ^a
45	36,6±3,0 ^b
60	23,8±2,1 ^c

Ghi chú: các giá 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 $p=0,05$.

Thời gian gây nhiễm thích hợp phụ thuộc vào chủng vi khuẩn cũng như loài thực vật. Cùng cảm ứng rễ tơ với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834, thời gian gây nhiễm thích hợp trên cây đậu phộng là 5 phút nhưng thời gian gây nhiễm trên cây rau sam là 20 phút [9] hay trên cây *Holostemma adakodien* K. Schum là 30 phút [10]. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy, thời gian gây nhiễm thích hợp cho cây xáo tam phân với chủng *A. rhizogenes* K599 là 30 phút cho tỷ lệ mẫu chuyển gen đạt 42,7%.

Ảnh hưởng của thời gian ủ cảm ứng tới khả năng hình thành rễ tơ: thời gian ủ cảm ứng là giai đoạn cần thiết trong phương pháp gây nhiễm trực tiếp *A. rhizogene* lên mô thực vật chủ [11]. Trong thời gian này sẽ xảy ra quá trình chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào chủ như chuyển T-ADN vào tế bào chủ và chèn T-ADN vào bộ gen tế bào chủ. Mỗi chủng vi khuẩn và mỗi loài thực vật chủ khác nhau sẽ có thời gian ủ cảm ứng cần thiết khác nhau. Với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834, thời gian ủ cảm ứng thích hợp để thu nhận rễ tơ trên cây lạc và cây *Duboisia myoporoides* là 2 ngày [12], trong khi trên cây giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) thì thời gian này là 2 tuần [13].

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian ủ cảm ứng đến tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ ở cây xáo tam phân.

Thời gian ủ cảm ứng (ngày)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
1	15,1±1,2 ^d
2	18,7±2,0 ^c
3	20,8±2,1 ^c
4	25,2±2,2 ^b
5	29,6±3,0 ^b
6	37,8±3,2 ^a
7	32,1±3,0 ^a

Ghi chú: các giá 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 $p=0,05$.

Để xác định thời gian ủ cảm ứng thích hợp tạo rễ tơ chuyển gen từ rễ cây con *in vivo* cây xáo tam phân bằng chủng *A. rhizogenes* K599, thí nghiệm được tiến hành thay đổi thời gian ủ cảm ứng từ 1 đến 7 ngày (bảng 7). Nhìn chung, kết quả thu được cho thấy tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ tăng theo thời gian ủ cảm ứng từ 1 đến 6 ngày. Thời gian ủ cảm ứng dài hơn 6 ngày không những không làm tăng tỷ lệ mẫu hình thành rễ mà mẫu còn có biểu hiện chết do sự phát triển quá mức của vi khuẩn, tương tự như báo cáo của Ho [14]. Ngoài ra, kết quả quan sát cũng cho thấy, một số mẫu rễ tơ cũng trở nên yếu hoặc chết khi kéo dài giai đoạn này. Như vậy, thời gian ủ cảm ứng thích hợp cho việc cảm ứng rễ tơ từ rễ cây con *in vivo* cây xáo tam phân là 6 ngày.

Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng trong giai đoạn ủ cảm ứng: nhiều nghiên cứu cho thấy ánh sáng có ảnh hưởng đến sự hình thành rễ tơ thực vật với chủng *A. rhizogenes*. Với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834, sự cảm ứng rễ tơ thích hợp trên cây dưa cạn là khi được ủ trong tối 24 giờ trước khi chiếu sáng 16 giờ/ngày trong 2 ngày [15]. Trong khi đó, chiếu sáng nhẹ lại là điều kiện thích hợp để thu nhận rễ chuyển gen từ mô thân cây dưa bở (*Cucumis melo* L.) bằng chủng *A. rhizogenes* ATCC8196. Qua đó cho thấy, cường độ chiếu sáng thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ có thể thay đổi đối với mỗi loài thực vật chủ và chủng vi khuẩn. Trong thí nghiệm này, cường độ chiếu sáng ở các bước sóng từ 500-2000 lux được bố trí để kích thích sự chuyển gen kích tạo rễ tơ với vi khuẩn *A. rhizogenes* K599.

Bảng 8. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng trong thời gian ủ cảm ứng đến tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ.

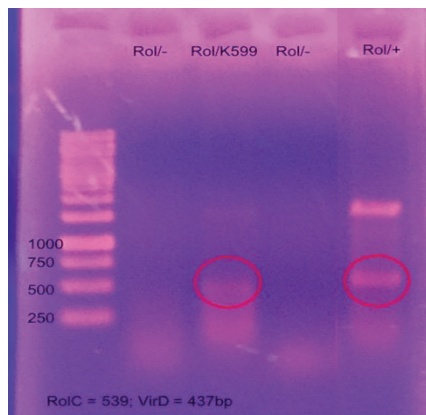
Cường độ chiếu sáng (lux)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
0	36,6±3,8 ^a
500	24,2±2,6 ^b
1000	16,6±1,8 ^c
1500	14,6±1,2 ^c
2000	7,6±0,8 ^d

Ghi chú: các giá 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 $p=0,05$.

Mẫu sau khi gây nhiễm được chiếu sáng ở các cường độ khác nhau với thời gian 16 giờ/ngày trong suốt giai đoạn ủ cảm ứng. Kết quả cho thấy, tỷ lệ mẫu hình thành rễ đã bị giảm xuống ở tất cả các chế độ chiếu sáng từ 500 đến 2000 lux (bảng 8) so với khi được ủ cảm ứng trong tối. Cường độ ánh sáng càng cao thì tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ càng giảm, tỷ lệ tạo rễ tơ giảm từ 36,6 xuống 7,6% khi tăng cường độ ánh sáng từ 0-2000 lux.

Xác nhận rễ tơ bằng phương pháp PCR

Qua phân tích sản phẩm bằng kỹ thuật PCR (hình 6) cho thấy, các dòng rễ tơ được kiểm tra đều có chứa gen *rolC* tương ứng với đoạn ADN được khuếch đại với kích thước 539 bp.



Hình 6. Kết quả PCR xác nhận rễ chuyển gen của rễ xáo tam phân với chủng *A. rhizogenes* K599 xác nhận sự hiện diện của gen *rolC*. Giếng 1: thang chuẩn; giếng 2, 4: đối chứng âm; giếng 3: đối chứng dương; giếng 5: rễ cây chuyển gen.

Kết luận

Quá trình chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Gibberellin ở nồng độ 0,5 mg/l cho tỷ lệ mẫu nảy chồi cao nhất đạt 96,7%. Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo từ lá mầm *in vitro* xáo tam phân đạt 68,89% trong môi trường có bổ sung 2,0 mg/l IAA, mô sẹo có chất lượng tốt, xanh đậm và khỏe. Sự cảm ứng tạo rễ tơ cây xáo tam phân bằng chủng *A. rhizogenes* K599 chịu ảnh hưởng của các yếu tố: mật độ tế bào trong huyền phù vi khuẩn ($OD_{600\text{ nm}}$), thời gian gây nhiễm, thời gian ủ cảm ứng, chế độ chiếu sáng và môi trường nuôi cấy. Điều kiện gây nhiễm

thích hợp để thu nhận rễ tơ từ cây xáo tam phân bằng chủng *A. rhizogenes* K599 là $OD_{600}=0,6$ với thời gian ngâm mẫu là 30 phút. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ đạt cao nhất khi mẫu được ủ cảm ứng 6 ngày trong tối và loại nhiễm vi khuẩn ở điều kiện tối.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn Công ty Monsanto đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài “Nghiên cứu chuyển gen tạo sinh khối rễ tơ xáo tam phân (*paramignya trimera*) thông qua *Agrobacterium rhizogenes* làm vật liệu cho nuôi cấy Bioreactor”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B.H. McCown, G. Lloyd (1981), “A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species”, *HortScience*, **16**, pp.453.
- [2] L. Brijwal, S. Tamta (2015), “*Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC”, *SpringerPlus*, **4**(443), pp.1-10.
- [3] G.S.H. AL-Yozbaki, J.H. Rasheed, S.M. Salih (2015), “Transformation of soybean (*Glycine Max* L.) via GUS-labeled *Agrobacterium rhizogenes* R1000”, *International Journal of Science and Technology*, **4**(6), pp.267-272.
- [4] M. Chang (2005), “RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex”, *EMBO J.*, **24**(11), pp.2024-2033.
- [5] K. Yoshimatsu, H. Sudo, H. Kamada, F. Kiuchi, Y. Kikuchi, J. Sawada, and K. Shimomura (2004), “Tropane alkaloid production and shoot regeneration in hairy and adventitious root cultures of *Duboisia myoporoides*-D. leichhardtii hybrid”, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(8), pp.1261-1265.
- [6] Y.R. Danesh, G.E. Mohammadi, A. Alizadeh, S.M. Modarres (2006), “Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran”, *Journal of Biological Sciences*, **6**(10), pp.87-91.
- [7] J. Kim, B. Campbell, N. Mahoney, K. Chan, R. Molyneux, G. May (2008), “Chemosensitization prevents tolerance of *Aspergillus fumigatus* to antimycotic drugs”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **372**(1), pp.266-271.
- [8] M. Rahimi, A. Riazzi, S. Saif (2008), “Root canal configuration and the prevalence of C-shaped canals in mandibular second molars”, *Canadian Journal of Applied Linguistics*, **11**, pp.31-60.
- [9] Kiana, Pirian (2012), “Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline’s production”, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, **3**(3), pp.642-649.
- [10] S.H. Karmarkar, R. Keshavachandran (2001), “Genetic transformation and hairy root induction in *Holostemma adakodien* K. Schum - a vulnerable medicinal plant”, *Indian Journal of Experimental Biology*, **39**, pp.1263-1267.
- [11] K. Wang (2006), *Agrobacterium protocols*, **1**, p.474, Humana Press.
- [12] A. Karthikeyan, S. Palanivel, S. Parvathy, R.R. Bhakya (2007), “Hairy root induction from hypocotyl segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.)”, *African Journal of Biotechnology*, **6**(15), pp.1817-1820.
- [13] C.K. Chang, Y.C. Lin, S.Y. Liu, C.Y. Chen (2005), “Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* Thunb. Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins”, *Biotechnology Letters*, **27**, pp.1165-1169.
- [14] C.H. Ho (1994), *Metabolic studies of Catharanthus roseus hairy root cultures by phosphorus-31 and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Doctoral thesis Rice University, Houston, Texas.
- [15] E.H. Hughes (2003), *Metabolic engineering of Catharanthus roseus hairy roots using an inducible promoter system*, Doctoral thesis Rice University, Houston, Texas.