

ESTABLISHMENT OF HAIRY ROOT LINES IN VIETNAMESE***Ficus simplicissima* Lour.**

Vu Thi Thu Thuy, Vu Manh Cuong, Tran Thi Hong, Chu Hoang Mau, Nguyen Thi Thu Nga*

TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 23/9/2022	<i>Ficus simplicissima</i> Lour. contains flavonoids and saponins with strong antioxidant capacity, used to treat a number of diseases such as inflammation, allergies, stomach ulcers... However, the content of natural synthetic flavonoids very low in <i>Ficus simplicissima</i> Lour. (about 0.897 mg/g fresh leaves). Therefore, a method has been proposed to enhance the flavonoid content in <i>Ficus simplicissima</i> Lour. plant is the application of tissue culture techniques to create hairy root lines to increase biomass. This study presents the results of the induction and culture of hairy root lines through <i>A. rhizogenes</i> in <i>Ficus simplicissima</i> Lour. Of the two materials infecting with <i>A. rhizogenes</i> (stem segment, leaf tissue), leaf tissue is the suitable material for hairy root formation. Bacterial density corresponds to $OD_{600} = 0.8$; AS concentration 150 $\mu\text{mol/l}$; infection time 10 minutes; co-cultivation time 2 days; The concentration of cefotaxime 550 mg/l were suitable conditions for induction of hairy root formation from leaf tissue. MS medium in liquid state, without adding growth regulators, cultured in shaking condition is the suitable medium for hairy root growth. The results of checking the presence of <i>rolC</i> gene by PCR method and the absence of <i>virD2</i> gene confirmed that 5 hairy root lines were created from <i>Ficus simplicissima</i> Lour. plant.
Revised: 19/10/2022	
Published: 26/10/2022	

KEYWORDS

Agrobacterium rhizogenes
Leaf tissue
Biomass
Ficus simplicissima Lour
Hairy roots

NGHIÊN CỨU CẢM ỨNG VÀ NUÔI CÂY TẠO RỄ TƠ CÂY VÚ BÒ (*Ficus simplicissima* Lour.)

Vũ Thị Thu Thủy, Vũ Mạnh Cường, Trần Thị Hồng, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Thu Nga*

Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 23/9/2022	Cây Vú bò (<i>Ficus simplicissima</i> Lour.) chứa flavonoid và saponin có khả năng chống oxy hóa mạnh, được dùng để điều trị một số bệnh như viêm nhiễm, dị ứng, loét dạ dày... Tuy nhiên, hàm lượng flavonoid tổng hợp tự nhiên trong cây Vú bò rất thấp (khoảng 0,897 mg/g lá tươi). Do đó, một phương pháp đã được đề xuất để tăng cường hàm lượng flavonoid trong cây Vú bò là ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tạo dòng rễ tơ tăng sinh khối. Nghiên cứu này trình bày kết quả quá trình cảm ứng và nuôi cấy tạo dòng rễ tơ thông qua <i>A. rhizogenes</i> ở cây Vú bò. Trong 2 loại vật liệu lây nhiễm với <i>A. rhizogenes</i> (đoạn thân, mô lá) thì mô lá là vật liệu thích hợp cho tạo rễ tơ. Mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 0,8$; nồng độ AS 150 $\mu\text{mol/l}$; thời gian nhiễm khuẩn 10 phút; thời gian đồng nuôi cây 2 ngày; nồng độ cefotaxime 550 mg/l là những điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá. Môi trường MS ở trạng thái lỏng, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nuôi trong điều kiện lắc là môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng rễ tơ. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen <i>rolC</i> bằng phương pháp PCR và sự vắng mặt của gen <i>virD2</i> đã khẳng định 5 dòng rễ tơ được tạo ra từ cây Vú bò.
Ngày hoàn thiện: 19/10/2022	
Ngày đăng: 26/10/2022	

TỪ KHÓA

Agrobacterium rhizogenes
Mô lá
Sinh khối
Vú bò
Rễ tơ

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6552>* Corresponding author. Email: ngantt.bio@mue.edu.vn

1. Giới thiệu

Cây Vú bò (*Ficus simplicissima* Lour.) là loại cây chưa được trồng phổ biến, mọc hoang dại trong rừng thứ sinh ở nước ta. Bộ phận dùng là rễ và vỏ rễ, thu hái quanh năm, được dùng thay thế hoàng kỳ nên có tên gọi khác là thổ hoàng kỳ. Trong vú bò có nhiều acid hữu cơ, các acid amin, các chất triterpen, alkaloid và coumarin. Cây được sử dụng làm thuốc bằng cách thu hái trong tự nhiên. Các bộ phận của cây Vú bò được sử dụng làm thuốc bao gồm rễ, nhựa, thân và lá. Các bài thuốc sử dụng nguyên liệu là Vú bò thường là bài thuốc bổ có tác dụng kiện tỳ, bổ phế, hành khí lợi thấp, tráng gân cốt. Một số bệnh có sử dụng Vú bò như chữa phong thấp tê bại, ho do lao phế quản, ra mồ hôi trộm, mệt mỏi chân tay, ăn ít bụng trướng, viêm gan, phụ nữ sau sinh không có sữa...

Theo Đái Duy Ban (2008), ở đa số các họ thực vật, rễ là nơi tổng hợp và tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp chính bao gồm triterpen, alkaloid và coumarin. Các chất này có hoạt tính sinh học mạnh, là đối tượng nghiên cứu của nhiều nhà khoa học. Chỉ tính riêng coumarin, ít nhất cũng có 1300 coumarin khác nhau đã được xác định. Coumarin có các hoạt động chống huyết khối, chống viêm và giãn mạch. Coumarins cũng có thể có tác dụng kháng virus và rất độc đối với loài gặm nhấm. Một số hợp chất coumarin có thể sử dụng để chữa bệnh nấm *Candida* âm đạo. Ngoài ra, coumarin có thể tạo ra các đại thực bào, tác động tiêu cực đến nhiễm trùng do vi khuẩn [1]... Theo Sivanesan và cộng sự (2009), những hợp chất thứ cấp tổng hợp ở rễ cây có thể được tổng hợp theo cách tương tự trong rễ tơ [2].

Agrobacterium rhizogenes, còn được gọi là *Rhizobium rhizogenes*, là vi khuẩn đất Gram âm và là mầm gây bệnh thực vật. *A. rhizogenes* lây nhiễm qua vết thương và gây bệnh rễ tơ trên nhiều loài thực vật có hoa bằng cách chuyển một số gen cảm ứng rễ (root-inducing plasmid, Ri plasmid) vào hệ gen thực vật. Sự biểu hiện Ri plasmid ở thực vật dẫn đến tăng sinh tổng hợp hormone thực vật auxin, ảnh hưởng đến sự phát triển của rễ và thúc đẩy sự ra rễ bên [3]. Khả năng tạo ra hệ thống rễ phát triển vô hạn này đã được nghiên cứu, từ đó tìm hiểu về khả năng sản xuất các dược chất ở thực vật và protein tái tổ hợp [4]. Dòng *A. rhizogenes* ATCC 15834 được sử dụng cho việc nuôi cấy rễ tơ đầu tiên trên cà chua làm cây mô hình [5]. Ở Việt Nam, ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào để tạo dòng rễ tơ tăng sinh khối cũng đã thành công trên nhiều cây dược liệu như Cây Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum* Gaertn.), Đan Sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), Đẳng Sâm (*Codonopsis javanica*)... [6]-[8]. Với mục đích bước đầu nghiên cứu tạo sinh khối rễ tơ để khai thác các chất có hoạt tính sinh học từ cây dược liệu, bài báo này báo cáo kết quả nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng cảm ứng và tạo sinh khối rễ tơ cây Vú bò.

2. Phương pháp nghiên cứu

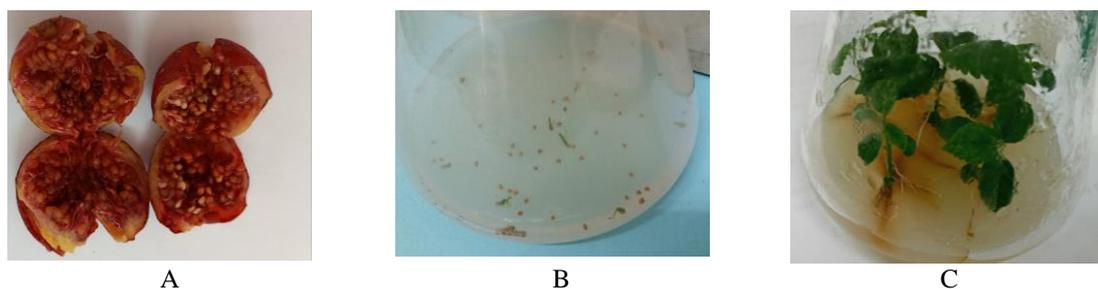
2.1. Vật liệu

Mẫu thực vật

Quả Vú bò thu tại xã Mỹ Yên, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên được sử dụng cho nuôi cấy *in vitro*. Mẫu nghiên cứu được định danh bởi PGS.TS Sỹ Danh Thường, trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên. Chọn quả Vú bò chín đỏ thẫm, không bị sâu bệnh (Hình 1A). Loại bỏ lớp thịt quả, thu hạt và rửa hạt bằng nước sạch nhiều lần. Hạt được lắc trong ethanol 70% trong khoảng thời gian 1 phút. Tráng hạt 5 lần bằng nước cất khử trùng. Tiếp tục lắc hạt trong dung dịch javen 60%, lắc đều trong khoảng thời gian 15 phút. Sau đó rửa sạch hạt bằng nước cất khử trùng 5 lần, rồi cấy lên môi trường MS cơ bản (Hình 1B). Số mẫu hạt gieo vào mỗi bình có thể tích 250 ml khoảng 50 - 60 hạt. Nuôi cấy tại phòng sinh trưởng với điều kiện chiếu sáng theo quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, nhiệt độ phòng $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ chiếu sáng 2000 lux. Lá và thân cây Vú bò *in vitro* khoảng 6-8 tuần tuổi được sử dụng làm vật liệu khảo sát tạo rễ tơ (Hình 1C).

Chủng vi khuẩn

Chủng *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) ATCC 15834 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 1. Tạo vật liệu khảo sát tạo rễ tơ cây Vú bò

A. Quả Vú bò thu thập tại Thái Nguyên 10/2020; B. Hạt làm sạch và gieo trên môi trường MS sau 4 tuần; C. Cây Vú bò *in vitro* 8 tuần tuổi

2.2. Phương pháp

Cây Vú bò *in vitro* ở giai đoạn 8 tuần tuổi có chiều cao thân chính khoảng 5 – 7 cm, cuống lá 0,2 - 0,3 cm, phiến lá $1,5 \times 2,0$ cm được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy.

Phiến lá bánh tẻ được cắt thành các mảnh có kích thước khoảng $0,5 \times 0,5$ cm.

Thân không mang mắt chồi bên, được cắt thành đoạn có kích thước 0,5 - 1,0 cm.

Sự phát sinh và sinh trưởng của rễ tơ từ các vật liệu được đánh giá bằng tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau 10 tuần.

a. *Nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn A. rhizogenes đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ thân và mô lá cây Vú bò*

Chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 bảo quản ở -20°C được hoạt hóa và nuôi phục hồi trên môi trường LB (Luria Bertani) theo hai bước: (1) nuôi hoạt hóa bằng cách cấy trải trên môi trường LB đặc, điều kiện tối, ở 28°C trong 48 giờ. (2) lấy một khuẩn lạc riêng rẽ nuôi phục hồi trong 20 ml môi trường LB lỏng, nuôi lắc 110 vòng/phút ở 28°C trong 14 - 16 giờ.

Lấy 5 ml dịch khuẩn nuôi phục hồi ở bước 2 bổ sung vào 45 ml LB lỏng, nuôi lắc 110 vòng/phút ở 28°C từ 2 đến 4 giờ. Xác định mật độ vi khuẩn bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm (OD_{600}). Mật độ vi khuẩn ở các ngưỡng 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 được sử dụng trong nghiên cứu. Dịch khuẩn được ly tâm 5000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C . Loại bỏ dịch, thu sinh khối tế bào vi khuẩn. Cặn khuẩn được hòa tan trong 50 ml môi trường $\frac{1}{2}$ MS lỏng và sử dụng cho quá trình biến nạp.

b. *Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ acetosyringone, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ thân và mô lá cây Vú bò*

Dịch huyền phù vi khuẩn ở trên được tiếp tục bổ sung acetosyringone (AS) với các nồng độ 50 $\mu\text{mol/l}$; 100 $\mu\text{mol/l}$; 150 $\mu\text{mol/l}$; 200 $\mu\text{mol/l}$ để thăm dò ngưỡng thích hợp cho quá trình chuyển gen.

Mẫu cây (thân và mô lá) sau khi được cắt tạo tổn thương, đem ngâm vào đĩa chứa dịch khuẩn trong khoảng thời gian 5 phút, 10 phút, 15 phút và 20 phút. Sau đó chuyển mẫu cây lên giấy thấm đã khử trùng, thấm khô và cấy lên môi trường MS cơ bản, để trong tối (đồng nuôi cấy) với thời gian 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày và 4 ngày.

c. *Nghiên cứu xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime*

Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu thực vật được rửa khuẩn ngoại vi trước khi chuyển sang môi trường tạo đa chồi. Môi trường diệt khuẩn chứa $\frac{1}{2}$ MS ở dạng lỏng có bổ sung kháng sinh cefotaxime 400 mg/l trong 15 phút. Đặt mẫu chuyển gen lên giấy thấm đã khử trùng để thấm khô mẫu cây.

Nuôi cấy đa chồi mẫu chuyển gen trên môi trường MS cơ bản có bổ sung kháng sinh cefotaxime với nồng độ 450 mg/l; 500 mg/l; 550 mg/l; 600 mg/l; 650 mg/l. Xác định ngưỡng diệt khuẩn được đánh giá bằng các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu cây không bị nhiễm, tỷ lệ mẫu sống sót và tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau 10 tuần nuôi cấy.

d. *Nghiên cứu trạng thái môi trường tối ưu để nhân nuôi rễ tơ*

Sau khi xác định được dòng rễ tơ chuyển gen nhờ kỹ thuật PCR, lựa chọn dòng rễ tơ sinh trưởng, phát triển tốt nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản với các trạng thái môi trường khác nhau (đặc, bán lỏng, lỏng) để khảo sát khả năng tăng trưởng của rễ tơ Vú bò. Môi trường đặc là môi trường có chứa agar 8g/l, môi trường bán lỏng chứa agar 4g/l và môi trường lỏng không chứa agar nuôi cấy 90 vòng/phút ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Chỉ tiêu theo dõi là khối lượng rễ tươi và khối lượng rễ khô sau 4 tuần nuôi cấy (khối lượng rễ khô được xác định bằng cách rễ tơ sau khi thu sinh khối được sấy ở nhiệt độ 45°C đến khối lượng không đổi [9]).

e. Xác định dòng rễ tơ chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen *rolC* (root locus C) nhằm kiểm tra sự chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào thực vật và sự vắng mặt của gen *VirD2* trong rễ tơ để khẳng định tế bào thực vật đã chuyển gen không bị nhiễm vi khuẩn trên bề mặt tế bào [10], [11].

DNA của rễ tơ được tách chiết bằng phương pháp CTAB theo Shanghai Maroof và cộng sự (1984) [12], điện di kiểm tra DNA tổng số trên gel agarose 0,8% và đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm.

Cặp mồi khuếch đại đoạn gen *rolC* [13]:

rolCF (5' - ATGGCTGAAGACGACCTGTGT-3')

rolCR (5' - TTAGCCGATTGCAAACCTTGCA-3')

Cặp mồi cho gen *virD2* [13]:

virDF (5' - ATGCCCGATCGAGCTCAAG-3')

virDR (5' - GACCCAAACATCTCGGCTG-3')

Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích hỗn hợp 25 μl (1 μl DNA tổng số, 2 μl dNTPs 2 mM, 1,25 μl DreamTaq DNA polymerase, 1 μl với mỗi mồi (10 pmol), 1,5 μl DreamTaq buffer, bổ sung nước cất vô trùng đủ thể tích).

Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *rolC*: 95°C trong 3 phút, 30 chu kỳ (95°C - 30 giây, 55°C - 45 giây và 72°C - 60 giây), 72°C - 10 phút, giữ ở 4°C [14].

Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *virD2*: 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ (94°C - 60 giây, 62°C - 30 giây và 72°C - 60 giây), 72°C - 10 phút, giữ ở 4°C [14].

Sản phẩm PCR được phân tích và kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Nhuộm bản gel với ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV.

f. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí nhắc lại 3 lần ở mỗi công thức, mỗi lần thí nghiệm 30 mẫu. Các chỉ tiêu được theo dõi và đo đếm sau 10 tuần.

Các số liệu được xử lý trên máy vi tính bằng phần mềm Excel với trị số $X \pm S_x$ [15].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes*, nồng độ AS, thời gian lây nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ mô lá Vú bò

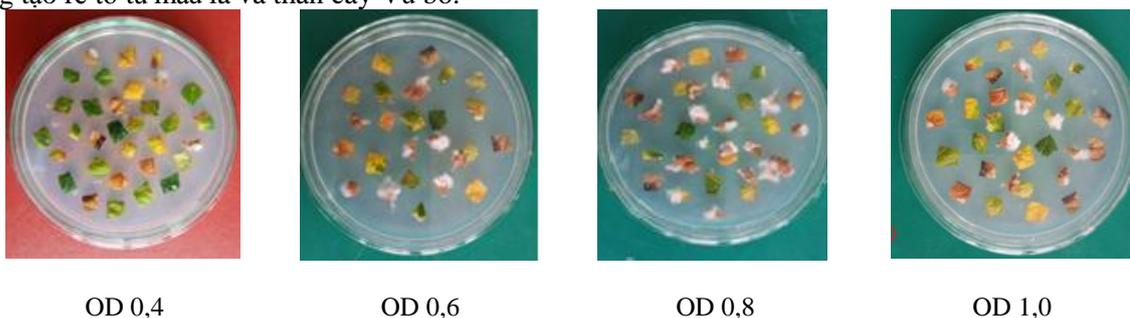
Bảng 1. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn, nồng độ AS đến khả năng tạo rễ tơ của cây Vú bò (sau 10 tuần nuôi cấy)

Yếu tố ảnh hưởng	Tỷ lệ mẫu lá tạo rễ tơ (%)	Tỷ lệ mẫu thân tạo rễ tơ (%)	
OD ₆₀₀	0,4	1,67 \pm 0,67	1,33 \pm 0,33
	0,6	1,67 \pm 0,33	1,67 \pm 0,33
	0,8	26,00 \pm 0,58	19,00 \pm 3,61
	1,0	2,67 \pm 0,33	2,00 \pm 0,58
AS ($\mu\text{M/l}$)	50	1,67 \pm 0,33	1,33 \pm 0,33
	100	2,33 \pm 0,33	17,33 \pm 1,45
	150	21,67 \pm 2,96	1,33 \pm 0,33
	200	1,67 \pm 0,33	1,67 \pm 0,33

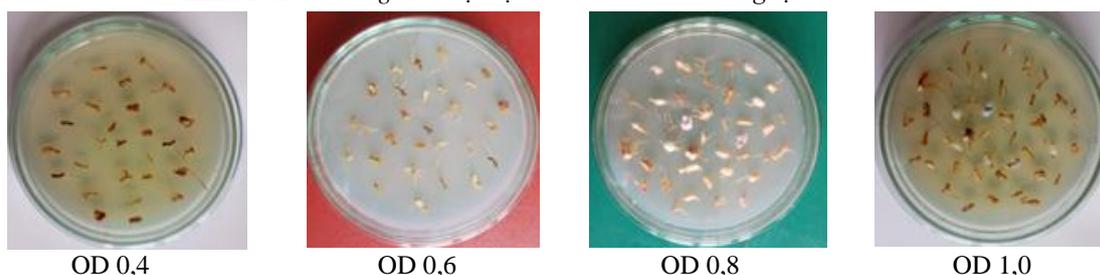
Mật độ *A. rhizogenes* là một trong những yếu tố có ảnh hưởng đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ trong chuyển gen ở thực vật. Để xác định ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả biến nạp

vào mẫu lá và thân cây Vú bò sau 10 tuần nuôi cấy *in vitro*, tiến hành nhiễm khuẩn mẫu trong 10 phút, bổ sung AS 100 $\mu\text{mol/l}$ ở các nồng độ vi khuẩn khác nhau để xác định mật độ khuẩn tối ưu. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 1 và hình 2, 3.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, sự khác nhau về tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau khi mẫu Vú bò được nhiễm *A. rhizogenes* tương ứng với các giá trị OD_{600} là 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0. Tỷ lệ mẫu lá cảm ứng tạo rễ tơ đạt cao nhất khi mật độ vi khuẩn ở giá trị $\text{OD}_{600}=0,8$ (26,00%). Với mẫu thân, hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ đạt cao nhất cũng ở mật độ vi khuẩn với giá trị $\text{OD}_{600}=0,8$ (19,00%). Ở mật độ vi khuẩn thấp hơn ($\text{OD}_{600}=0,4; 0,6$) hay cao hơn ($\text{OD}_{600}=1,0$) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ thấp hơn. Do vậy, mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $\text{OD}_{600}=0,8$ là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ từ mẫu lá và thân cây Vú bò.

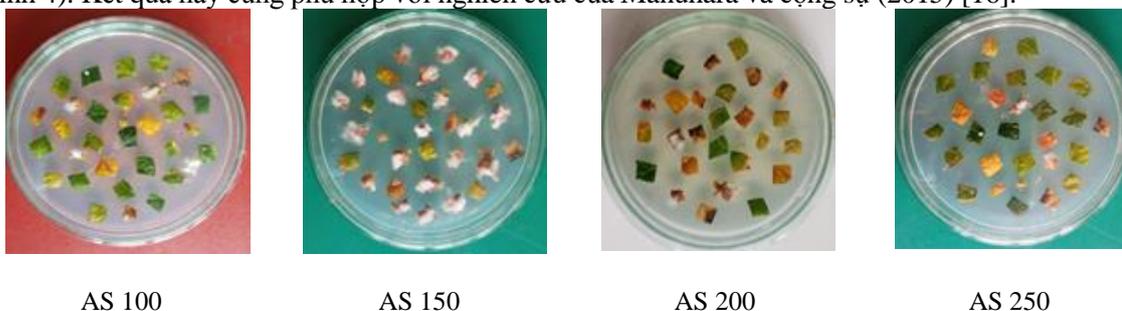


Hình 2. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến khả năng tạo rễ tơ từ mảnh lá



Hình 3. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến khả năng tạo rễ tơ từ mẫu thân cây

Acetosyringone (AS) là một loại phenol có tác dụng dẫn dụ vi khuẩn *Agrobacterium* xâm nhập vào cơ thể thực vật tại nơi bị tổn thương. Trong các thí nghiệm chuyển gen, AS luôn được nghiên cứu bổ sung vào môi trường lây nhiễm để nâng cao hiệu quả chuyển gen. Kết quả nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy, bổ sung AS với các nồng độ khác nhau thì ảnh hưởng khác nhau đến tỷ lệ tạo rễ tơ ở mẫu cây Vú bò. Tỷ lệ mẫu lá cảm ứng tạo rễ tơ đạt cao nhất (21,67 %) khi nồng độ AS đạt 150 $\mu\text{mol/l}$. Ở nồng độ AS thấp hơn (50 $\mu\text{mol/l}$; 100 $\mu\text{mol/l}$) hay cao hơn (200 $\mu\text{mol/l}$) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ thấp hơn. Do vậy, nồng độ AS 150 $\mu\text{mol/l}$ là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá Vú bò. Đối với mẫu thân, hiệu quả tạo rễ tơ có tỷ lệ tốt nhất (17,33) trên môi trường có bổ sung nồng độ AS đạt 100 $\mu\text{mol/l}$. Với các nồng độ AS còn lại, hiệu quả tạo rễ tơ đều đạt thấp hơn (Hình 4). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Manuhara và cộng sự (2015) [16].



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ AS đến khả năng tạo rễ tơ của mảnh lá

Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm *A. rhizogenes* đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Vú bò đã được nghiên cứu. Kết quả bảng 2 cho thấy, ở các khoảng thời gian nhiễm khuẩn khác nhau, tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là khác nhau. Thời gian nhiễm khuẩn 10 phút thu được tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ cao nhất (35,09%). Ở thời gian lây nhiễm thấp hơn (5 phút) hay cao hơn (15-20-25 phút) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ thấp hơn, thời gian lây nhiễm càng cao thì tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ càng thấp, có thể do thời gian lây nhiễm lâu làm cho mẫu lá bị nát và phá hủy tế bào.

Đồng nuôi cấy là khoảng thời gian vi khuẩn xâm nhiễm vào mẫu mô, có điều kiện tăng sinh số lượng trên môi trường rắn. Sự chuyển đoạn T-DNA vào hệ gen thực vật cũng xảy ra vào giai đoạn này. Số liệu ở bảng 2 cho thấy, ở các khoảng thời gian đồng nuôi cấy khác nhau, tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là khác nhau. Thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày thu được tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ cao nhất (40,33%). Ở thời gian đồng nuôi cấy thấp hơn (1 ngày) hay cao hơn (3, 4, 5 ngày) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ thấp hơn, có thể là do khi thời gian đồng nuôi cấy ngắn vi khuẩn xâm nhập vào ít nên quá trình biến nạp có thể không hoàn toàn, nhưng nếu thời gian đồng nuôi cấy dài, hiệu quả chuyển gen sẽ giảm do lượng vi khuẩn tăng sinh lớn sẽ gây hại trực tiếp đến mô lá Vú bò.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm và thời gian đồng nuôi cấy đến khả năng tạo rễ tơ cây Vú bò (n=30, số liệu sau 10 tuần nuôi cấy)

Thời gian	Thời gian lây nhiễm (phút)		Ngày nuôi cấy	Thời gian đồng nuôi cấy (ngày)	
	Đoạn thân tạo rễ tơ	Mảnh lá tạo rễ tơ		Đoạn thân tạo rễ tơ	Mảnh lá tạo rễ tơ
5	2,67 ± 0,33	1,67 ± 0,33	1	1,33 ± 0,33	2,67 ± 0,67
10	4,00 ± 0,58	35,09 ± 1,90	2	2,33 ± 0,33	40,33 ± 1,41
15	24,33 ± 2,19	2,01 ± 0,58	3	23,67 ± 2,03	2,33 ± 0,58
20	2,67 ± 0,88	2,00 ± 0,34	4	3,67 ± 0,88	2,00 ± 0,33

3.2. Nghiên cứu xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime

Bổ sung kháng sinh vào môi trường nuôi cấy thường ít được sử dụng do kháng sinh có trong môi trường sẽ làm chậm quá trình sinh trưởng của mô và tế bào. Tuy nhiên, đối với thí nghiệm chuyển gen, sau bước lây nhiễm và đồng nuôi cấy cần loại bỏ hoàn toàn vi khuẩn ra khỏi mẫu cấy để không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của các mẫu trong giai đoạn thí nghiệm tiếp theo. Trong nghiên cứu này, cefotaxime được sử dụng để diệt khuẩn. Cefotaxime là kháng sinh phổ rộng được sử dụng phổ biến, chi phí rẻ, có tác dụng loại trừ chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ra khỏi môi trường và mô nuôi cấy sau khi biến nạp. Kết quả xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ cefotaxime đến khả năng diệt khuẩn từ mẫu cây Vú bò sau 10 tuần nuôi cấy (n=30)

Nồng độ cefotaxime (mg/l)	Lá		Thân	
	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm tạo rễ tơ (%)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm tạo rễ tơ (%)
450	3,33 ± 0,67	1,33 ± 0,33	1,67 ± 0,88	1,00 ± 0,58
500	10,00 ± 2,89	7,33 ± 3,93	2,00 ± 0,58	1,67 ± 0,33
550	32,67 ± 3,93	31,17 ± 3,33	2,67 ± 03,33	2,00 ± 0,00
600	18,00 ± 1,00	6,33 ± 0,33	28,36 ± 0,33	25,28 ± 0,33
650	7,67 ± 2,33	4,33 ± 1,67	25,33 ± 0,67	20,33 ± 0,67

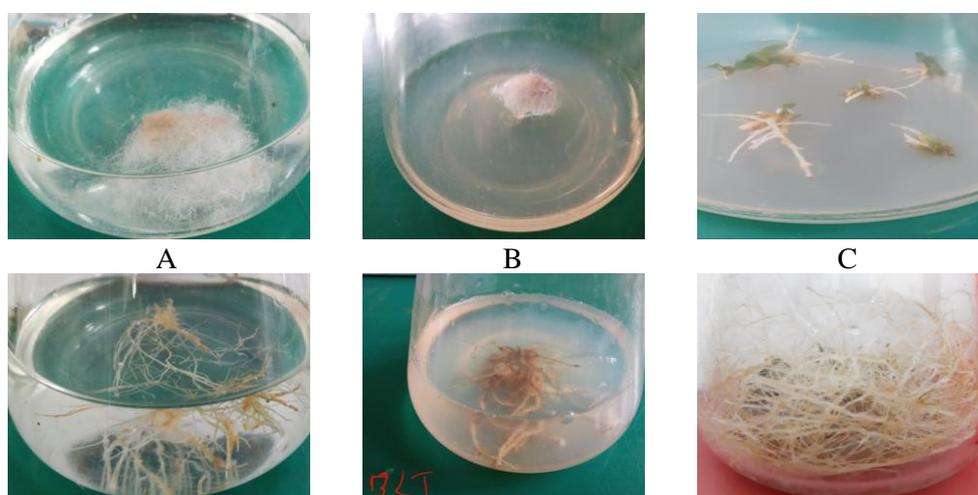
Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy, tăng nồng độ cefotaxime đến một ngưỡng nhất định sẽ làm giảm khả năng bị nhiễm của mẫu biến nạp, cao nhất ở nồng độ 550 mg/l cho tỷ lệ mẫu lá không bị nhiễm là 32,67% và tỷ lệ mẫu không nhiễm tạo rễ tơ đạt 31,17%. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ lại tỷ lệ nghịch với nồng độ cefotaxime. Khi nồng độ cefotaxime càng cao thì tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ càng thấp. Đối với mẫu cây từ thân, ở nồng độ 600 mg/l cho tỷ lệ mẫu thân không bị nhiễm là 28,36% và tỷ lệ mẫu không nhiễm tạo rễ tơ đạt 25,28%. Như vậy, nồng độ cefotaxime

tối ưu diệt khuẩn trong phạm vi thí nghiệm này là 550 mg/l đối với mẫu lá và 600 mg/l đối với mẫu thân (Hình 5). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Manuhara và cộng sự (2015) [16].



Mẫu lá (550 mg/l) Mẫu thân (600 mg/l) Mẫu lá (600 mg/l)
Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ cefotaxime đến khả năng tạo rễ tơ của mẫu lá và mẫu thân sau 10 tuần nuôi cấy

3.3. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ cây Vú bò



Hình 6. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ cây Vú bò sau 10 tuần
 A- rễ tơ cảm ứng trên môi trường lỏng nuôi lắ; B - nuôi cấy rễ tơ trên môi trường bán lỏng; C- nuôi rễ tơ trong môi trường đặc

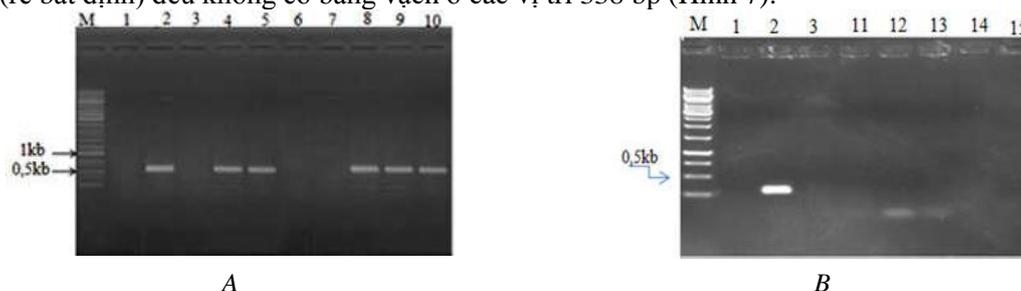
Trong ba trạng thái môi trường thử nghiệm gồm đặc, bán lỏng và lỏng thì mẫu rễ tơ trên môi trường lỏng nuôi lắ cho tốc độ tăng trưởng cao nhất, tiếp sau là môi trường bán lỏng và cuối cùng là môi trường đặc với khối lượng rễ tăng lần lượt là 29,72; 17,33 và 19,00 lần so với khối lượng rễ ban đầu sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 4). Như vậy, môi trường lỏng nuôi lắ giúp rễ tơ Vú bò tăng trưởng tốt nhất. Hình 6 thể hiện kết quả nuôi cấy tạo rễ tơ dưới ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ cây Vú bò.

Bảng 4. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ từ mẫu lá cây Vú bò (Sau 10 tuần nuôi cấy)

Chỉ tiêu theo dõi	Trạng thái môi trường		
	Lỏng nuôi lắ	Bán lỏng	Đặc
Khối lượng rễ ban đầu (g)	0,09 ± 0,03	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,02
Khối lượng rễ tươi (g)	1,66 ± 0,07	1,04 ± 0,07	1,33 ± 0,05
Khối lượng rễ tăng (lần)	29,72 ± 1,90	17,33 ± 2,94	19,00 ± 2,03
Khối lượng rễ khô (g)	0,55 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,02

3.4. Xác định dòng rễ tơ chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Sau khi tách chiết DNA của hệ gen rễ tơ cây Vú bò, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi *rolCF/rolCR* để khuếch đại vùng đặc hiệu 520 bp của gen *rolC* và cặp mồi gen *virDF/virDR* để khuếch đại đặc hiệu một trình tự 338 bp của gen *virD2*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của hai cặp mồi nhân gen *rolC* và gen *VirD2* cho thấy đoạn gen *rolC* có chiều dài 520 bp và đoạn gen *VirD2* có kích thước 338 bp được khuếch đại ở giếng đối chứng dương (pRi plasmid 15834); các giếng chạy sản phẩm PCR của rễ tơ đều có sự hiện diện của một băng DNA duy nhất sáng rõ nét và ở vị trí 520bp (cùng vị trí với đối chứng dương gen *rolC*) và không có băng DNA ở vị trí 338 bp của gen *VirD2*; ngược lại, các giếng đối chứng âm và đối chứng rễ không chuyển gen (rễ bất định) đều không có băng vạch ở các vị trí 338 bp (Hình 7).



Hình 7. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn gen *rolC* (A) và đoạn gen *virD2* (B)
M: Thang chuẩn 1kb; A - 1. Đối chứng âm - nước; 2. Đối chứng dương - sản phẩm PCR của Ri plasmid; 3. Rễ không chuyển gen; Các giếng từ 4 đến 10: sản phẩm PCR của 7 dòng rễ tơ Vú bò; B - Các giếng từ 11 đến 15: các dòng rễ tơ không mang gen *virD2*.

4. Kết luận

Hai loại vật liệu được nhiễm với *A. rhizogenes* (đoạn thân, mô lá) thì mô lá là vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây Vú bò. Các điều kiện nuôi cấy phù hợp bao gồm: mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 0,8$; nồng độ AS 150 $\mu\text{mol/l}$; thời gian nhiễm khuẩn 10 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày; nồng độ cefotaxime 550 mg/l là những điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá cây Vú bò. Môi trường MS ở trạng thái lỏng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nuôi trong điều kiện lác là thích hợp cho sự tăng trưởng rễ tơ ở cây Vú bò. Kết quả kiểm tra sự có mặt gen *rolC* bằng phương pháp PCR và sự vắng mặt của gen *virD2* đã khẳng định 5 dòng rễ tơ được tạo ra từ cây Vú bò.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Cơ sở có mã số CS.2021.19 do trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên cấp và sử dụng trang thiết bị của phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên; Phòng DNA ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. B. Dai, *Natural compounds with biological activity against a number of diseases for humans and animals*. Publisher Natural Science and Technology, 2008.
- [2] I. Sivanesan and B. R. Jeong, "Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L.," *Af J. Biotec.*, vol. 8, pp. 5294-5300, 2009.
- [3] I. Casimiro, A. Marchant, R. P. Bhalerao, and T. Beeckman, "Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation," *Plant Cell*, vol. 13, pp. 843-852, 2001.
- [4] N. N. Ono and L. Tian, "The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities," *Plant Sci.*, vol. 180, pp. 439-446, 2011.
- [5] M. Kajala, G. Pauluzzi, D. Wang, M. A. Reynoso, K. Zumstein, J. Garcha, S. Winte, and H. Masson, "Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model," *Plant Physiol.*, vol. 166, pp. 455-469, 2014.

- [6] T. N. T. Vu and H. M. Chu, "Establishment of Hairy Root Lines in Vietnam (*Talinum paniculatum*)," *VNU Science Journal: Natural Science and Technology*, vol. 33, no. 2S, pp. 233-241, 2017.
- [7] T. T. Ninh, T. V. Le, H. A. La, T. T. Nguyen, and T. P. T. Nguyen, "Research on induction and culture of hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge," *Journal of Science and Development*, vol. 13, no. 2, pp. 251-258, 2015.
- [8] T. H. Nguyen and V. V. Nguyen, "Research on rapid in vitro multiplication of hairy root biomass of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f.," *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 10, pp. 34-40, 2017.
- [9] S. Mehrotra, A. K. Kukreja, S. P. S. Khanuja, and B. N. Mishra, "Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor," *Elec J Biotechnol*, vol. 11, no. 2, pp. 1-7, 2008.
- [10] S. Majumdar, S. Garai, and 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*, vol. 30, no. 5, pp. 941-954, 2011.
- [11] V. Veena and C. G. Taylor, "Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications," *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, vol. 43, pp. 383-403, 2007.
- [12] M. A. Shaghai-Marouf, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, and R. W. Allard, "Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics," *Proc Natl Acad Sci*, vol. 81, pp. 8014-8019, 1984.
- [13] V. P. Sinkar, F. F. White, and M. P. Gordon, "Molecular biology of Ri-plasmid," *J. Biosci. - Indian Acad.Sci.*, vol. 11, pp. 47-57, 1987.
- [14] K. Lièvre, A. Hehn, T. L. M. Tran, A. Gravot, B. Thomasset, F. Bourgaud, and E. Gontier, "Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta graveolens* L. by an *Agrobacterium tumefaciens* - mediated method," *Plant Sci.*, vol. 168, pp. 883-888, 2005.
- [15] H. M. Chu, *Modern methods of genetic analysis in plant breeding*. Thai Nguyen University Publishing House, 2008.
- [16] Y. S. W. Manuhara, A. N. Kristanti, E. S. W. Utami, and A. Yachya, "Effect of Aeration and Inoculum Density on Biomass and Saponin Content of *Talinum Paniculatum* Gaertn. Hairy Roots in Balloon-Type Bubble Bioreactor," *J. of Pharm. and Biom. Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 47-52, 2012.