

Khả năng cảm ứng hình thành rễ chuyển gene từ cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*) bằng các chủng *Agrobacterium rhizogenes* được phân lập ở Việt Nam

- Nguyễn Như Nhứt
- Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 11 năm 2015, nhận đăng ngày 06 tháng 05 năm 2016)

TÓM TẮT

Cây Dừa cạn được xem như một loài cây dược liệu nhờ nó có khả năng tổng hợp một số hợp chất alkaloid có khả năng giúp điều trị một số bệnh ung thư. Tuy nhiên, sản lượng của các hợp chất này trong cây rất thấp. Gần đây, rễ tơ từ cây Dừa cạn được cảm ứng bằng *Agrobacterium rhizogenes* được kỳ vọng như một công cụ có thể giúp nâng cao sản lượng những hợp chất có giá trị này. Bằng phương pháp gây nhiễm mô lá bị tổn thương của bốn giống Dừa cạn với huyền phù của mười ba chủng *A. rhizogenes*, rễ tơ thu được sau ba tuần gây nhiễm được phân tích sự hiện diện của các gene *rolB* trong rễ thu được bằng PCR. Kết quả thu được

Từ khóa: *Agrobacterium rhizogenes*, Dừa cạn, cảm ứng, rễ tơ

cho thấy cả mười ba chủng *A. rhizogenes* đều có khả năng chuyển gene cảm ứng tạo rễ tơ trên mô lá cây Dừa cạn. Trong đó, chủng *A. rhizogenes* C18 có khả năng cảm ứng tạo rễ chuyển gene cao nhất trên ba giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 với tỷ lệ mẫu hình thành rễ đạt 59,4 %, 50,3 % và 40,0 % tương ứng. Trong khi đó, với giống Dừa cạn VIN077, chủng *A. rhizogenes* C26 cho tỷ lệ mẫu hình thành rễ cao nhất là 26,7 %. Điều này đã phát hiện ra những công cụ chuyển gene tiềm năng giúp thu nhận được nhiều dòng rễ chuyển gene khác nhau từ cây Dừa cạn để phục vụ cho các nghiên cứu sau này.

MỞ ĐẦU

Agrobacterium gồm những loài vi khuẩn Gram âm và hiếu khí hiện diện khắp nơi trong đất [10, 11, 15]. Chúng có thể xâm nhiễm vào hầu hết cây hai lá mầm, vài cây một lá mầm và một số cây hạt trần. Hơn 90 họ thực vật hai lá mầm có thể bị xâm nhiễm bởi *Agrobacterium*, trong đó bao gồm nhiều loài có giá trị kinh tế cao như cây lương thực, cây ăn quả và cây hoa cảnh [15]. Vị trí phân loại của *Agrobacterium* hiện vẫn còn được tranh cãi do chúng có nhiều đặc điểm giống với *Rhizobium*. Một số tác giả phân chúng thuộc

giống *Rhizobium*. Trong khi đó, một số tác giả khác cho rằng chúng đủ khác biệt để tách thành giống riêng và được gọi là *Agrobacterium* [17].

Các loài trong giống *Agrobacterium* được phân biệt nhau và phân biệt với *Rhizobium* chủ yếu dựa trên đặc điểm gây bệnh của chúng trên thực vật [17]. Trong đó, *A. rhizogenes* là loài gây ra triệu chứng bệnh rễ tơ trên cây trồng tại vị trí xâm nhiễm. Hiện nay, khả năng xâm nhiễm của *A. rhizogenes* vào thực vật được các nhà nghiên cứu sinh học thực vật quan tâm nhiều do trong quá trình xâm nhiễm gây bệnh rễ tơ (hairy root),

chúng có khả năng chuyển gen vào tế bào thực vật [11, 17]. Khả năng này được các nhà nghiên cứu khai thác bằng cách sử dụng chúng như công cụ chuyển gen để thu nhận rễ tơ hay rễ chuyển gene (transgenic root) cho nhiều mục đích nghiên cứu khác nhau. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen của *A. rhizogenes* vào tế bào thực vật phụ thuộc rất nhiều yếu tố [11]. Trong đó, các chủng *A. rhizogenes* được phân lập từ các nguồn khác nhau có khả năng xâm nhiễm khác nhau vào thực vật [16]. Ngoài ra, trong vài trường hợp, tế bào chuyển gene không phát sinh thành rễ mà chuyển thành sẹo hoặc không biểu hiện nào khác so với tế bào bình thường [3].

Trong thời gian gần đây, cây Dừa cạn *Catharanthus roseus* được xem như một trong những cây mô hình cho các nghiên cứu khả năng chuyển gene của *A. rhizogenes* cũng như nhằm tạo được rễ chuyển gene cho các nghiên cứu chức năng của các gene liên quan đến các con đường biến dưỡng ở thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng cây Dừa cạn để tiến hành khảo sát khả năng chuyển gene của 13 chủng *A. rhizogenes* khác nhau. Kết quả của nghiên cứu

nhằm sàng lọc được những chủng *A. rhizogenes* có khả năng chuyển gene cảm ứng tạo rễ tơ và làm tiền đề cho các nghiên cứu trên rễ chuyển gene từ cây Dừa cạn sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn

Mười ba chủng *Agrobacterium rhizogenes* (C02, C04, C09, C10, C12, C15, C18, C20, C24, C26, C29, C32 và C34) được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ sinh học thực vật và chuyển hóa sinh học (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM). Các chủng vi khuẩn này được phân lập từ đất vùng rễ của nhiều loài thực vật khác nhau ở Việt Nam. Tất cả các chủng vi khuẩn được nuôi cấy và bảo quản trên môi trường thạch Yeast Mannitol Broth (YMB) [3]. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường YMB trong 48 giờ ở điều kiện 25 °C và lắc 180 vòng/phút. Canh trường thu được sau khi nuôi cấy có OD_{600nm} khoảng 1,7–1,8 được pha loãng thành huyền phù có OD_{600nm} 1,0 để dùng làm nguồn vi khuẩn để gây nhiễm.



Hình 1. Cây Dừa cạn in vitro 8 tuần tuổi. Từ trái sang phải: giống VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077.

Mẫu thực vật in vitro

Bốn giống Dừa cạn khác nhau (VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077) được cung cấp bởi Công ty FVN. Cây Dừa cạn *in vitro* được chuẩn bị bằng cách khử trùng bề mặt theo Mohsen Zargar và cộng sự (2010) [14]. Hạt Dừa cạn được rửa với xà phòng loãng trong 10 phút rồi được rửa lại dưới vòi nước máy trong 5 phút. Sau đó, hạt được xử lý với ethanol 80 % trong 1 phút

trước khi xử lý với dung dịch Javel:nước (4:1) trong 15 phút. Hạt được rửa lại với nước vô trùng 5 lần. Ủ hạt trên môi trường Murashige & Skoog bán đậm đặc (MS/2) ở điều kiện 25 °C trong tối. Hạt nảy mầm sau 5 ngày ủ. Chuyển cây sang chế độ chiếu sáng 1500 lux (16 giờ/ngày). Sau 8 tuần nuôi cấy, cây cao khoảng 5–7 cm và có được 4–5 cặp lá thật đã phát triển (Hình 1) được dùng để làm nguyên liệu gây nhiễm.

Phương pháp

Nhận diện chủng Agrobacterium rhizogenes có khả năng chuyển gene tạo rễ tơ trên cây Dừa cạn

Các mô lá thật từ cây Dừa cạn *in vitro* được tạo vết thương bằng dao mổ ngang qua gân chính của lá. Sau đó, mẫu được cho vào huyền phù các chủng *A. rhizogenes* khác nhau và ngâm trong 5 phút. Làm khô mẫu bằng giấy thấm rồi ủ cảm ứng trên môi trường MS/2 trong tối trong 7 ngày ở 25 °C. Tiến hành loại vi khuẩn bằng cách chuyển mẫu sang môi trường MS/2 có bổ sung cefotaxime 500 mg/lít và ủ trong tối trong 7 ngày ở 25 °C. Sau 7 ngày thì chuyển mẫu sang môi trường MS/2 và tiếp tục ủ trong tối trong 7 ngày ở 25 °C. Rễ tơ được hình thành sau 2–3 tuần gây nhiễm. Ghi nhận số mẫu sống sót, số mẫu hình thành rễ. Mỗi nghiệm thức gồm 100 mẫu lá và được lặp lại 3 lần. Tỷ lệ mẫu sống sót (%) là số mẫu sống sau 3 tuần thí nghiệm/số mẫu gây nhiễm. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%) là số mẫu hình thành rễ/số mẫu gây nhiễm. Tần số chuyển gene (%) là số mẫu hình thành rễ/số mẫu sống sót [7, 11, 12].

Nhận diện rễ chuyển gene

Cắt lấy rễ tơ để xác định sự hiện diện của gen *rolB* (có nguồn gốc từ trên plasmid Ri của vi khuẩn) bằng cách khuếch đại các trình tự với cặp mỗi gen *rolB* 430bp có trình tự 5'-GCTCTTGACGTGCTAGATTT-3' và 5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3' [6]. Sử dụng cặp mỗi gene *virC* 730bp có trình tự 5'-ATC ATT TGT AGC GAC T-3' và 5'-AGC TCA AAC CTG CTT C-3' [1] để dò sự hiện diện của *A. rhizogenes* nhiễm trong rễ. Chương trình

khuếch đại là biến tính DNA ban đầu trong 5 phút ở 95 °C; sau đó là 35 chu kỳ của biến tính trong 30 giây ở 94 °C, bắt cặp trong 30 giây ở 54 °C và kéo dài trong 1 phút ở 72 °C; kết thúc quá trình bằng cách 5 phút ở 72 °C. Sản phẩm sau khuếch đại có kích thước 430bp sẽ được nhận diện bằng cách điện di trên gel agarose 1 % với đệm TAE 0,5X. Phát hiện gen trên gel bằng cách ngâm trong dung dịch ethidium bromide rồi xem dưới đèn UV. Kết quả điện di được so sánh giữa DNA rễ tơ, DNA của rễ không chuyển gene từ các cây *in vitro*, DNA plasmid Ri làm chứng dương dựa trên thang DNA chuẩn [17, 19].

Xử lý số liệu

Số liệu thu được từ kết quả các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2007, SAS 9.1 và được trình bày dưới dạng số trung bình.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cây Dừa cạn đã được xem như một loại cây sử dụng làm mô hình trong các nghiên cứu cơ chế sinh tổng hợp các hợp chất alkaloid. Rễ chuyển gene từ cây Dừa cạn bằng *Agrobacterium rhizogenes* cũng đã được nghiên cứu từ những năm 1980. Các dòng rễ chuyển gene bằng những chủng vi khuẩn khác nhau không giống nhau về mặt hình thái và khả năng sinh tổng hợp alkaloid. Sự đa dạng trong đặc điểm sinh tổng hợp alkaloid này của rễ chuyển gene từ cây Dừa cạn là một trong những đặc điểm thu hút các nhà nghiên cứu. Do đó, các nghiên cứu thu nhận những dòng rễ chuyển gene mới từ cây Dừa cạn không ngừng được báo cáo.

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%) trên bốn giống Dừa cạn bằng các chủng *Agrobacterium rhizogenes*

Chủng <i>A. rhizogenes</i>	Giống Dừa cạn			
	VIN002	VIN005	VIN072	VIN077
C02	39,6d	11,0m	18,0d	4,6ghij
C04	26,7e	39,3fg	8,1ghi	17,5ef
C09	16,3f	40,0fg	15,7def	21,1bcd
C10	38,1d	28,9hij	13,6efg	17,5ef
C12	47,7c	23,2kl	10,2fghi	14,2ef
C15	17,8f	22,2kl	0j	3,3ghij
C18	59,4a	50,3a	40,0a	20,2bcd
C20	0g	31,4hij	23,5c	0k
C24	40,7d	47,5bcd	14,4ef	7,2ghij
C26	38,1d	43,2de	10,6fghi	26,7a
C29	24,8e	46,4bcd	0,8j	3,8ghij
C32	55,0b	45,6bcde	0j	0k
C34	45,8c	29,3hij	31,5b	21,4bcd

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 $p=0,05$.

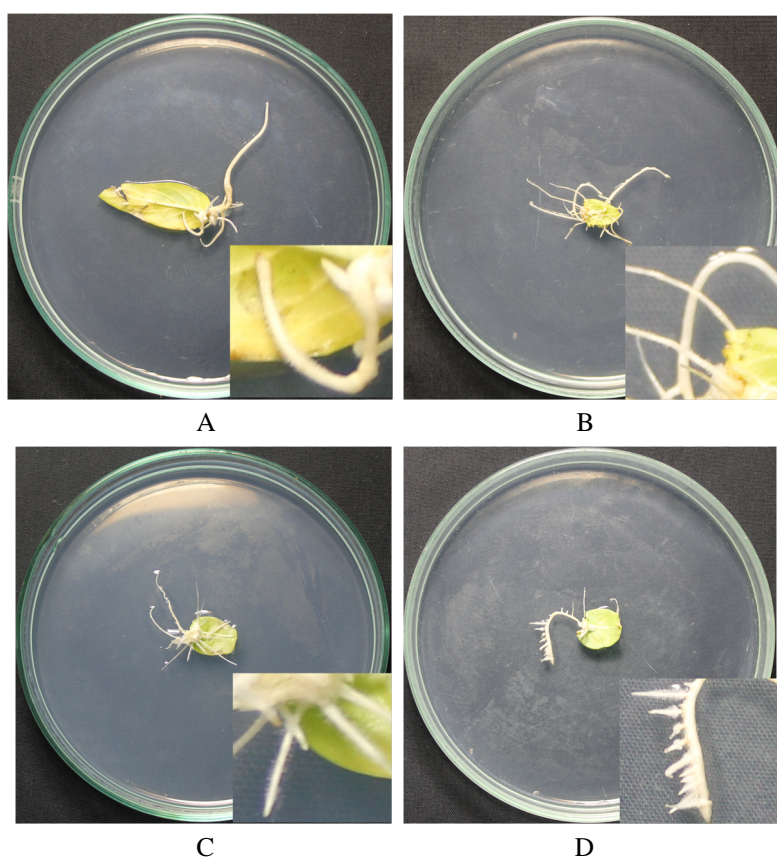
Bằng cách gây nhiễm trên mô lá *in vitro*, kết quả đã cho thấy tất cả 13 chủng đều có khả năng cảm ứng hình thành rễ trên cây Dừa cạn. Tuy nhiên, mỗi chủng vi khuẩn có khả năng cảm ứng hình thành rễ khác nhau trên từng giống Dừa cạn khác nhau. Với giống Dừa cạn VIN005 thì cả 13 chủng *A. rhizogenes* đều có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ (Bảng 1). Trong khi đó, chủng *A. rhizogenes* C20 không có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên giống Dừa cạn VIN002 và VIN077; chủng C15 không thể cảm ứng tạo rễ tơ trên giống Dừa cạn VIN072 và chủng C32 không tạo được rễ tơ trên hai giống VIN072 và VIN077. Kết quả này cho thấy khả năng cảm ứng tạo rễ tơ tùy thuộc vào từng giống Dừa cạn khác nhau. Trước đây, khi nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ trên củ cà rốt bằng bảy chủng *A. rhizogenes* khác nhau, Y.R. Danesh và cộng sự (2006) cũng nhận thấy rằng mỗi chủng vi khuẩn đều có khả năng cảm ứng hình thành rễ nhưng tỷ lệ thu được cũng không giống nhau giữa các chủng [3]. Gần đây, E. Marwani và cộng sự (2015) cũng có kết luận tương tự khi kết quả nghiên cứu cho thấy ba chủng *A. rhizogenes* R1000, A4 và ATCC15834

cho tỷ lệ hình thành rễ khác nhau trên cây xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*) [5]. Cây Dừa cạn cũng đã được cảm ứng tạo rễ tơ bằng nhiều chủng vi khuẩn khác nhau và kết quả cho thấy tỷ lệ hình thành rễ cũng không giống nhau giữa các chủng. Chủng *A. rhizogenes* C58C1 có khả năng cảm ứng tạo rễ với tỷ lệ hình thành rễ đạt 70 % [4], trong khi tỷ lệ này là 85,26 % với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 (16). Sự khác nhau trong kết quả thu được có thể là do nhiều yếu tố gây ra, trong đó, hai yếu tố quan trọng quyết định là do sự khác nhau về chủng vi khuẩn và khác nhau về giống thực vật chủ [18]. Nhìn chung, chủng *A. rhizogenes* C18 có khả năng cao ứng rễ cao trên 3 giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 (với tỷ lệ mẫu hình thành rễ đạt 59,4; 50,3 và 40,0 % tương ứng). Trong khi đó, trên giống Dừa cạn VIN077, chủng *A. rhizogenes* C26 có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất với tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ là 26,7 %.

Tỷ lệ mẫu hình thành rễ phụ thuộc nhiều vào khả năng sống sót của mẫu sau thời gian gây nhiễm. Trong khi đó, tỷ lệ mẫu sống sót thay đổi tùy theo giống Dừa cạn và chủng *A. rhizogenes*

nhất định (Bảng 2). Nhìn chung, giống Dừa cạn VIN002 có tỷ lệ mẫu sống sau khi gây nhiễm cao và ổn định hơn (50,6–86,7 %) so với 3 giống Dừa cạn còn lại. Tỷ lệ mẫu sống sót của giống Dừa cạn VIN005 và VIN077 thay đổi lớn khi được gây nhiễm với các chủng *A. rhizogenes* khác nhau (27,6–97,3 % và 5,6–67,8 % tương ứng). Giống Dừa cạn VIN072 có tỷ lệ mẫu sống sót thay đổi (36,7–89,5 %) ít hơn so với VIN005 và VIN077. Các kết quả thu cũng đã được cho thấy trong đa số các trường hợp thì tỷ lệ mẫu sống sót cao sẽ cho cơ hội cảm ứng được mẫu tạo rễ tơ cao kéo theo tỷ lệ mẫu hình thành rễ cao. Tỷ lệ mẫu từ giống Dừa cạn VIN002 hình thành rễ đạt 16,3–59,4 %, cao hơn so với 3 giống Dừa cạn

còn lại (11,0–50,3 %; 0,8–40 % và 3,8–26,7 % tương ứng). Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu hình thành rễ không hoàn toàn tỷ lệ thuận với tỷ lệ mẫu sống sót. Các trường hợp mẫu chết một phần hoặc hoàn toàn đều có chung đặc điểm là mẫu hóa nâu ở trạng thái khô hoặc bị thối nhũn do sự phát triển quá mức của vi khuẩn. Hiện tượng này cũng được phát hiện trước đây khi gây nhiễm lá cây Dừa cạn với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 [2] và với lá cây Bạch hoa xà *Plumbago zeylanica* L. khi được gây nhiễm với chủng *A. rhizogenes* MTCC532 [8]. Theo James A. Birchler (2011), sự hoại tử mô như trên có thể là do mô bị oxy hóa [9].



Hình 2. Rễ tơ sau 3 tuần gây nhiễm. A, B và C: rễ tơ được cảm ứng từ giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 bằng chủng *A. rhizogenes* C18; D: rễ tơ được cảm ứng từ giống Dừa cạn VIN077 bằng chủng *A. rhizogenes* C26.

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu sống sót của bốn giống Dừa cạn sau khi gây nhiễm với *Agrobacterium rhizogenes*

Chủng <i>A. rhizogenes</i>	Giống Dừa cạn			
	VIN002	VIN005	VIN072	VIN077
C02	74,8fgh	27,6m	62,7ef	54,2de
C04	50,6ki	60,7f	43,1hijk	47,9fgh
C09	52,0ki	54,2g	89,5a	67,4ab
C10	83,7b	44,9j	66,9cde	56,1cde
C12	78,0cde	39,5k	67,1cde	46,4fgh
C15	74,4fgh	33,3l	22,3m	5,6m
C18	86,7a	69,6e	45,6hij	36,6ij
C20	6,7m	47,6hij	65,9cdef	19,3l
C24	80,2cde	82,4cd	72,5b	67,8ab
C26	68,3i	80,4cd	44,4hijk	44,4fgh
C29	59,7j	93,7b	42,5ijk	40,9hij
C32	77,0cdefgh	97,3a	36,7l	26,2k
C34	78,2cde	49,4hi	55,1g	57,8cd

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. Tần số chuyển gene của các chủng *Agrobacterium rhizogenes* trên bốn giống Dừa cạn

Chủng <i>A. rhizogenes</i>	Giống Dừa cạn			
	VIN002	VIN005	VIN072	VIN077
C02	53,0efgh	40,0m	28,7d	8,4ghi
C04	52,7fgh	64,9cdef	18,7fghij	36,5cd
C09	31,4k	73,8ab	17,6fghij	31,3ef
C10	45,6i	64,4cdef	20,3fg	31,3ef
C12	61,1cd	72,2ab	15,2hij	30,5ef
C15	23,9l	66,7cdef	0kl	60,0a
C18	68,6ab	58,8ghi	87,8a	55,2b
C20	0m	65,9cdef	35,6c	0j
C24	50,7fgh	57,6ghi	19,9fgh	10,7ghi
C26	55,7def	53,7jk	23,8e	60,0a
C29	41,6j	49,6jkl	2,0kl	9,3ghi
C32	71,5ab	46,9kl	0kl	0j
C34	58,5cde	59,2ghi	57,2b	37,0cd

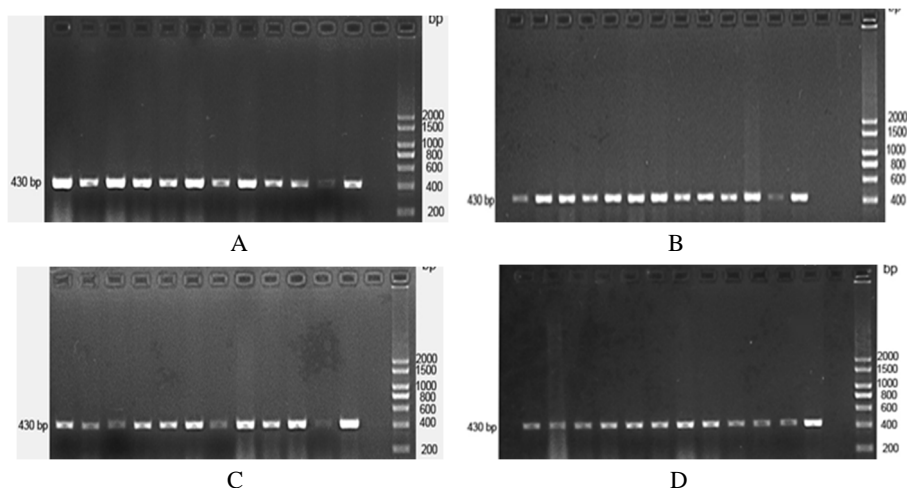
Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Trong trường hợp tỷ lệ mẫu sống sót là 100 %, tần số chuyển gene cũng chính là tỷ lệ mẫu hình thành rễ. Tỷ lệ mẫu sống sót càng cao thì tần số chuyển gene có giá trị càng gần với tỷ lệ mẫu sống sót [7, 11, 12]. Nhưng, do bản chất *A. rhizogenes* cũng chính là tác nhân gây bệnh cho thực vật, do đó tế bào thực vật cũng sẽ có những đáp ứng phòng thủ tương tự như khi nó tương tác

với những yếu tố bất lợi khác [17, 18]. Nếu không đáp ứng phòng thủ được, hậu quả là *A. rhizogenes* sẽ gây chết tế bào. Vì vậy, tần số chuyển gene thông thường sẽ cao hơn tỷ lệ mẫu hình thành rễ (Bảng 3). Với bốn giống Dừa cạn VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077, các chủng *A. rhizogenes* có tần số chuyển gene cao nhất tương ứng là C32, C09, C18 và C26. Tuy

nhiên, tỷ lệ hình thành rễ là một trong những yếu tố quan trọng quyết định hiệu suất thu nhận rễ [11]. Tỷ lệ hình thành rễ càng cao thì số dòng rễ thu được càng nhiều. Chỉ tiêu này rất quan trọng nhằm giúp thu được nhiều dòng rễ tơ khác nhau để phục vụ cho các nghiên cứu sau đó. Do đó, trong những trường hợp tỷ lệ mẫu sống sót thấp

hoặc có thay đổi lớn sau khi gây nhiễm với *A. rhizogenes* như mô lá cây Dừa cạn trong nghiên cứu này thì chỉ tiêu tỷ lệ hình thành rễ là rất quan trọng giúp sàng lọc được những chủng *A. rhizogenes* thích hợp cho các nghiên cứu thu nhận rễ tơ sau này.



Hình 3. Sự hiện diện của gene *rolB* được chuyển từ *Agrobacterium rhizogenes* và rễ tơ. A: các giếng từ trái sang phải tương ứng với rễ chuyển gene từ giống VIN002 bởi các chủng *A. rhizogenes* C02, C04, C09, C10, C12, C15, C18, C24, C26, C29, C32, C34 và rễ VIN002 không chuyển gene; B: các giếng từ trái sang phải tương ứng với rễ chuyển gene từ giống VIN005 bởi các chủng *A. rhizogenes* C02, C04, C09, C10, C12, C15, C18, C20, C24, C26, C29, C32, C34, rễ VIN005 không chuyển gene và nước; C: các giếng từ trái sang phải tương ứng với rễ chuyển gene từ giống VIN072 bởi các chủng *A. rhizogenes* C02, C04, C09, C10, C12, C18, C20, C24, C26, C29, C34, rễ VIN072 không chuyển gene và chứng dương; D: các giếng từ trái sang phải tương ứng với rễ chuyển gene từ giống VIN077 bởi các chủng *A. rhizogenes* C02, C04, C09, C10, C12, C15, C18, C24, C26, C29, C34, rễ VIN077 không chuyển gene và chứng dương.

Ngoài ra, trong một số trường hợp, sự cảm ứng hình thành rễ có thể xảy ra bằng dịch lọc từ canh trường nuôi cấy tăng sinh *A. rhizogenes* [13]. Trong khi đó, chỉ có rễ mang gene được chuyển từ *A. rhizogenes* vào trong bộ gene mới có thể mang những đặc điểm mong muốn. Do đó, tiêu chí chọn lọc quan trọng tiếp theo là sự hiện diện của các gene trên plasmid Ri của *A. rhizogenes* có trong DNA của tế bào mô rễ. Kết quả phân tích PCR của các dòng rễ được cảm ứng từ các chủng vi khuẩn khác nhau đều cho thấy có xuất hiện các băng tương ứng với gene *rolB* với kích thước 430bp (Hình 3) nhưng không với các dòng rễ không chuyển gene từ cây Dừa

cạn. Trong khi đó, kết quả phân tích PCR không thấy xuất hiện băng tương ứng gene *virC* ở bất cứ dòng rễ nào. Điều này chứng tỏ gene *rolB* trên plasmid Ri đã được chèn vào bộ gene của tế bào rễ cây Dừa cạn. Điều này cho thấy rằng có thể sử dụng tất cả 13 các chủng *A. rhizogenes* này để thu nhận rễ chuyển gene từ mô lá của các giống cây Dừa cạn. Tuy nhiên, để thu nhận được nhiều dòng rễ chuyển gene khác nhau từ các giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 thì chủng *A. rhizogenes* C18 là thích hợp để dùng cảm ứng trong khi với giống Dừa cạn VIN077 thì chủng *A. rhizogenes* C26 là thích hợp hơn so với những chủng còn lại.

KẾT LUẬN

Qua các kết quả thu được đã giúp phát hiện thêm công cụ chuyển gen mới là mười ba chủng *Agrobacterium rhizogenes* được phân lập từ đất vùng rễ của một số loài thực vật ở Việt Nam. Khả năng chuyển gene của các chủng *A. rhizogenes* này trên mô lá cây Dừa cạn *Catharanthus roseus*

không giống nhau. Chủng *A. rhizogenes* C18 cho hiệu suất thu nhận rễ chuyển gene cao nhất trên ba giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072. Trong khi đó, chủng *A. rhizogenes* C26 cho hiệu suất thu nhận rễ chuyển gene cao nhất trên giống Dừa cạn VIN077.

Hairy root induction in *Catharanthus roseus* by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* isolated in Vietnam

- **Nguyen Nhu Nhut**

- **Bui Van Le**

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Catharanthus roseus is a well known medicinal plant. It produces several phytochemicals and many of which show anticancerous properties. However the yields of these compounds are very low. Recently, induction of *C. roseus* hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*, is interested as a promising tool for the enhanced production of these metabolites. In this research, wounded leaves from four strains of *C. roseus* were infected with various strains of *A. rhizogenes* isolated in Vietnam to provide more information about the induction efficiency of hairy roots. In

this experiment, after 3 weeks of infection, the presence of *rolB* gene in hairy roots were analysed by polymerase chain reaction. All of 13 *A. rhizogenes* strains could induce the formation of hairy root in *C. roseus*. The *A. rhizogenes* C18 strain had the highest induction percentage in *C. roseus* VIN002, VIN005, and VIN072 with 59.4 %, 50.3 %, and 40.0 % respectively. And the same result was obtained at 26.7% by *A. Rhizogenes* C26 for *C. roseus* VIN077 *rhizogenes* strains. This result identified two *A. rhizogenes* strains C18 and C26 as potential transformation tools for hairy root production from *C. roseus*.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, *Catharanthus roseus*, hairy root induction

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C.K. Chang, K.S. Chang, Y.C. Lin, S.Y. Liu, C.Y. Chen, 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, 1165–1169 (2005).
- [2]. C.H. Ho, Metabolic studies of *Catharanthus roseus* hairy root cultures by

³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy, Thesis for the doctor degree of philosophy, Rice University, Houston, Texas (1994).

- [3]. Y.R. Danesh, M.E. Goltapeh, A. Alizadeh, S.M. Modarres, Optimizing Carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran,

- Journy of Biologycal Sciences*, 6, 10, 87–91 (2006).
- [4]. D.H. Liu, W.W. Ren, L.J. Cui, L.D. Zhang, X.F. Sun, K.X. Tang, Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2, *African Journal of Biotechnology*, 10, 17, 3260-3268 (2011).
- [5]. E. Marwani, D. Pratiwi, K. Wardhani, R. Esyanti, Development of hairy root culture of *Andrographis paniculata* for *in vitro* adrographollide production, *Journal of Medical and Bioengineering*, 4, 6, 446-450 (2015).
- [6]. E. SkaBa, A. Kicel, M.A. Olszewska, A.K. Kiss, H. Wysokińska, Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives, *BioMed Research International*, 2015, 1-11 (2015).
- [7]. G.S.H. AL-Yozbaki, J.H. Rasheed, S.M. Salih, Transformation of Soybean (*Glycine max* L.) Via GUS–Labeled *Agrobacterium Rhizogenes* R1000, *International Journal of Science and Technology*, 4, 6, 267-272 (2015).
- [8]. I. Sivanesan, B.R. Jeong, Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L., *African Journal of Biotechnology*, 8, 20, 5294-5300 (2009).
- [9]. J.A. Birchler, Plant chromosome engineering: methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, 701 (2011).
- [10]. J.C. Jimenez-Lopez, Biochemical testing, *Intech.*, (2012).
- [11]. K. Wang, *Agrobacterium* protocols, *Humana Press*, 1 (2006).
- [12]. K. Yoshimatsu, H. Sudo, H. Kamada, F. Kiuchi, Y. Kikuchi, J. Sawada, K. Shimomura, Tropane alkaloid production and shoot regeneration in hairy and adventitious root cultures of *Duboisia myoporoides*–*D. leichhardtii* hybrid, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 8, 1261-1265 (2004).
- [13]. M.M. Altamura, *Agrobacterium rhizogenes* rolB and rolD genes: regulation and involvement in plant development, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 89-101 (2004).
- [14]. M. Zargar, F. Farahani, T. Nabavi, Hairy roots production of transgenic *Catharanthus roseus* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* under *in vitro* conditions, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 21, 2199-2203 (2010).
- [15]. 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).
- [16]. 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).
- [17]. T. Tzfira, V. Citovsky, *Agrobacterium* – From biology to biotechnology, *Springer*, (2008).
- [18]. Y.Ö. Çiftçi, Transgenic Plants - Advances and Limitations, *InTech.*, (2012).
- [19]. Z. Shakeran, M. Keyhanfar, G. Asghari, M. Ghanadian, Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*, *Turkish Journal of Biology*, 39, 111-118 (2015).