

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN SỰ CẢM ỨNG RỄ TƠ CÂY ĐỪA CẠN (*Catharanthus roseus*) CỦA CHỦNG *Agrobacterium rhizogenes* C26

Nguyễn Như Nhứt¹ và Bùi Văn Lê²

¹Bộ môn Sinh hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh

²Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh

Thông tin chung:

Ngày nhận: 01/12/2015

Ngày chấp nhận: 25/07/2016

Title:

Effects of some factors on *Agrobacterium rhizogenes* C26-mediated hairy root induction in *Catharanthus roseus*

Từ khóa:

Agrobacterium rhizogenes, cảm ứng, đừa cạn, rễ tơ, sự gây nhiễm

Keywords:

Agrobacterium rhizogenes, *Catharanthus roseus*, hairy root, induction, infection

ABSTRACT

Regeneration of whole viable plants from hairy root cultures, which were established from transformation with *Agrobacterium rhizogenes*, has been reported in a number of plant species. Such transgenic plants frequently show a very characteristic phenotype, different from their normal counterparts. Therefore, scientists have been studying on production of transformed roots for creating transgenic ornament plants. In this study, several factors affecting *A. rhizogenes* C26 mediated genetic transformation in *Catharanthus roseus* VIN077, i.e. cell density of *Agrobacterium rhizogenes* C26 suspension, infection time, co-cultivation time, illumination conditions and culture media, were investigated. The results indicated that cell density of bacterial suspension, infection time, co-cultivation time, and culture media were important factors that had positive effects on the formation of hairy root at appropriate conditions. It was suggested that leaves of *C. roseus* VIN077 soaked in *A. rhizogenes* C26 suspension at cell density of 0.2 (OD_{600 nm}) for 10 minutes and co-cultivated on 1/2 White medium in the dark condition for 6 days resulted in the most effective hairy root formation. Illumination with fluorescent white light was found to inhibit hairy root formation in co-cultivation period but able to induce this process during the bacterial elimination step. The transgenic hairy root lines were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) using *rolB* specific primers.

TÓM TẮT

Tái sinh cây từ nuôi cấy rễ tơ qua quá trình biến nạp bằng *Agrobacterium rhizogenes* đã được thực hiện trên nhiều giống cây trồng. Những cây trồng chuyển gen này thường mang các kiểu hình đặc trưng khác biệt với các cây bình thường khác. Vì vậy, các nhà khoa học đã nghiên cứu sản xuất rễ cây chuyển gen nhằm tạo ra các giống cây hoa cảnh mới. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của một số yếu tố như mật số tế bào trong huyền phù vi khuẩn, thời gian gây nhiễm, thời gian ủ cảm ứng, cường độ chiếu sáng và môi trường nuôi cấy lên quá trình biến nạp di truyền nhờ vi khuẩn *A. rhizogenes* C26 trên cây đừa cạn *Catharanthus roseus* VIN077 đã được khảo sát. Kết quả đã cho thấy mật số tế bào, thời gian gây nhiễm, thời gian ủ cảm ứng và môi trường nuôi cấy là các yếu tố quan trọng có thể kích thích sự hình thành rễ tơ ở các điều kiện thích hợp. Lá đừa cạn ngâm trong huyền phù vi khuẩn có chỉ số OD_{600 nm} 0,2 trong 10 phút và ủ cảm ứng trên môi trường 1/2 White ở điều kiện tối trong 6 ngày cho hiệu quả hình thành rễ tơ cao nhất. Việc chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang có tác động ức chế sự hình thành rễ tơ ở giai đoạn ủ cảm ứng nhưng lại có thể 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 *rolB*.

Trích dẫn: Nguyễn Như Nhứt và Bùi Văn Lê, 2016. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự cảm ứng rễ tơ cây đừa cạn (*Catharanthus roseus*) của chủng *Agrobacterium rhizogenes* C26. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 44b: 96-103.

1 GIỚI THIỆU

Agrobacterium rhizogenes là loài vi khuẩn có khả năng chuyển gen bởi plasmid Ri của nó vào tế bào thực vật. Tế bào thực vật sau khi được chuyển gen sẽ phát sinh thành rễ tơ với nhiều đặc điểm nổi bật như tăng trưởng nhanh, ổn định về mặt di truyền và sinh hóa... nên được chú ý nhiều trong các lĩnh vực nghiên cứu cơ bản và ứng dụng của rễ, nhất là trong các nghiên cứu thu nhận hợp chất thứ cấp (Tzfira and Citovsky, 2008; Wang, 2006). Ngày nay, rễ chuyển gen bằng *A. rhizogenes* còn được ứng dụng trong lĩnh vực tạo giống cây trồng mới, bao gồm nhiều loài cây có giá trị cao. Cây được tái sinh có kiểu hình thay đổi tùy theo từng dòng rễ tơ khác nhau (Suza *et al.*, 2008). Đặc điểm này đã được các nhà nghiên cứu đặc biệt chú trọng trong tạo giống cây hoa cảnh nhằm tạo ra những giống cây có đặc điểm mới và lạ đáp ứng cho nhu cầu xã hội và góp phần phát triển nông nghiệp đô thị (Góraj-Koniarska *et al.*, 2015).

Quá trình chuyển gen của *A. rhizogenes* vào tế bào thực vật là một quá trình ngẫu nhiên. Đặc điểm của rễ tơ cũng như cây tái sinh từ rễ tơ phụ thuộc vào vị trí cũng như số lượng bản sao của gen được chèn vào bộ gen thực vật chủ (Chandra *et al.*, 2013). Chính vì vậy, việc thu nhận được nhiều dòng rễ tơ từ các loài hoa cảnh khác nhau bằng những chủng *A. rhizogenes* khác nhau luôn là bước đầu tiên được các nhà nghiên cứu quan tâm. Tuy nhiên, theo các báo cáo trước đây đã cho thấy hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ của *A. rhizogenes* chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau như mật số tế bào vi khuẩn trong huyền phù khi gây nhiễm, thời gian gây nhiễm, thời gian ủ cảm ứng, chế độ chiếu sáng, môi trường nuôi cấy... (Çiftçi, 2012). Sự ảnh hưởng của các yếu tố này còn tùy vào sự đa dạng của chủng *A. rhizogenes* và loài thực vật chủ (Tzfira and Citovsky, 2008; Wang, 2006).

Cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) là một trong những cây hoa cảnh đa dạng về màu sắc và hình thái. Chúng có thể được trồng rộng rãi ở nhiều điều kiện khác nhau, dễ chăm sóc và thời gian cho hoa dài nên rất được ưa chuộng dùng trong trang hoàng nhà cửa và các công trình công cộng (Mujib *et al.*, 2012). Xu hướng tạo giống cây hoa cảnh mới, bao gồm cả cây dừa cạn, thông qua rễ tơ đang được xem là hướng nghiên cứu tiềm năng mang lại giá trị kinh tế cao. Do đó, 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 dừa cạn để phục vụ cho nghiên cứu tạo giống cây dừa cạn mới sau này.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chủng vi khuẩn và mẫu thực vật *in vitro*

Chủng *A. rhizogenes* C26 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm của Bộ môn Công nghệ sinh học (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh). Chủng vi khuẩn này được phân lập từ đất vùng rễ của cây họ đậu ở Việt Nam. Chủng *A. rhizogenes* C26 được nuôi cấy và bảo quản trên môi trường thạch Yeast Mannitol Broth (YMB) (Danesh *et al.*, 2006). Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường YMB trong 48 giờ ở điều kiện 25°C và lắc 180 vòng/phút. Dung dịch vi khuẩn sau khi nuôi cấy có OD_{600nm} khoảng 1,7-1,8 được pha loãng để dùng làm huyền phù vi khuẩn để gây nhiễm.

Hạt giống dừa cạn VIN077 được cung cấp bởi Công ty hạt giống hoa Việt Nam FVN (thành phố Hồ Chí Minh). Cây dừa cạn *in vitro* được chuẩn bị bằng cách khử trùng bề mặt hạt theo Zargar *et al.* (2010) như sau: rửa hạt dưới vòi nước sạch rồi ngâm hạt trong dung dịch NaOCl 5% trong 30 phút, sau đó rửa hạt bằng nước cất vô trùng trong 4-5 lần. Ủ hạt trên môi trường Murashige & Skoog (Wang, 2006) bán đậm đặc (1/2MS) ở nhiệt độ 25°C trong điều kiện tối. Sau 5 ngày ủ, chuyển cây mầm 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 sẽ được dùng để làm nguyên liệu gây nhiễm.



Hình 1: Cây dừa cạn VIN077 *in vitro* 8 tuần tuổi

2.2 Gây nhiễm cảm ứng tạo rễ tơ

Quy trình gây nhiễm được thực hiện theo Yoshimatsu *et al.* (2004), Wang (2006) và AL-Yozbaki *et al.* (2015). 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 vi khuẩn có bổ sung acetosyringone 50 µM và ngâm trong 5 phút. Làm khô mẫu bằng giấy thấm rồi ủ cảm ứng trên môi trường 1/2MS

trong tối trong 7 ngày ở 25°C. Tiến hành loại nhiễm vi khuẩn bằng cách chuyển mẫu sang môi trường 1/2MS có bổ sung cefotaxime 500mg/lít và ủ trong tối trong 7 ngày ở 25°C. Sau 7 ngày, chuyển mẫu sang môi trường 1/2MS và tiếp tục ủ trong tối trong 7 ngày ở 25°C. Rễ tơ được hình thành sau 2-3 tuần gây nhiễm. Mỗi nghiệm thức gồm 100 mẫu lá và được lặp lại 3 lần. Ghi nhận số mẫu hình thành rễ sau 3 tuần gây nhiễm. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ (%) là số mẫu hình thành rễ tơ/số mẫu gây nhiễm.

2.3 Xác nhận rẽ chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Cắt lấy rễ tơ để ly trích DNA theo phương pháp cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Porebski *et al.*, 1997) 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 mồi chuyên biệt được thiết kế từ vùng gen *rolB* có sản phẩm khuếch đại là 430 bp có trình tự 5'-GCTCTTGACAGTGCTAGATTT-3' và 5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3' (Skala *et al.*, 2015). Sử dụng cặp mồi gen *virC* có sản phẩm khuếch đại là 730 bp (cũng có nguồn gốc từ trên plasmid Ri của vi khuẩn nhưng gen này không được chèn vào tế bào thực vật) trình tự 5'-ATC ATT TGT AGC GAC T-3' và 5'-AGC TCA AAC CTG CTT C-3' (Chang *et al.*, 2005) để dò sự hiện diện của *A. rhizogenes* nhiễm trong rễ tơ. Với *rolB*, 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. Phản ứng PCR với gen *virC* cũng được thực hiện tương tự nhưng nhiệt độ bắt cặp là 40°C. Sản phẩm PCR sẽ được nhận diện bằng cách điện di trên gel agarose 1% với đệm TAE 1X. 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 gen từ các cây *in vitro*, DNA plasmid Ri làm đối chứng dương dựa trên thang DNA chuẩn (Shakeran *et al.*, 2015; Tzfira and Citovsky, 2008; Wang, 2006).

2.4 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.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của mật số tế bào huyền phù chủng *A. rhizogenes* C26

Mật độ tế bào vi khuẩn trong huyền phù dùng để gây nhiễm là một trong những yếu tố có tác động lên sự cảm ứng rễ tơ của *A. rhizogenes* (Yoshimatsu *et al.*, 2004; Georgiev *et al.*, 2007). Trên cây dứa cạn, trước đây, với các chủng vi khuẩn khác nhau và giống dứa cạn khác nhau, các tác giả đã sử dụng huyền phù vi khuẩn có OD_{600 nm} không giống nhau, thay đổi từ OD_{600 nm} 0,5 (Peebles, 2008) và 0,5-0,7 (Hughes, 2003) với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 cho đến OD_{600 nm} 0,7 với chủng *A. rhizogenes* C58C1 (Liu *et al.*, 2011). Điều này cho thấy ứng với mỗi giống thực vật chủ, huyền phù có OD_{600 nm} thích hợp để gây nhiễm không giống nhau giữa các chủng vi khuẩn khác.

Trong nghiên cứu này, kết quả thu được khi gây nhiễm lên mô lá thật từ giống dứa cạn VIN077 bằng dịch huyền phù chủng *A. rhizogenes* C26 cho thấy khi OD_{600 nm} của huyền phù vi khuẩn ở mức 0,2 thì tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ tăng lên có ý nghĩa (Bảng 1). Tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ ở OD_{600 nm} = 0,4 có tăng hơn so với ở OD_{600 nm} = 0,2, nhưng sự khác biệt này là không có ý nghĩa về mặt thống kê. Khi OD_{600 nm} lên đến 0,6-1 thì tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ có xu hướng giảm dần. Báo cáo gần đây của Petrova *et al.* (2013) khi cảm ứng rễ tơ trên cây kim sa (*Arnica montana* L.) bằng chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 cho thấy kết quả cũng tương tự, khi tăng OD_{600 nm} lên đến 0,8 thì hiệu quả cảm ứng rễ tơ cũng tăng theo, tuy nhiên, khi tiếp tục tăng lên 0,9 thì không có sự khác biệt có ý nghĩa so với OD_{600 nm} = 0,8. Cũng sử dụng chủng *A. rhizogenes* ATCC15834, sự cảm ứng rễ tơ từ cây rau sam (*Portulaca oleracea*) tăng theo OD_{600 nm} 0,2-0,6 nhưng sau đó giảm xuống khi tiếp tục tăng OD_{600 nm} lên 0,8 (Piriant *et al.*, 2012). Ngoài ra, kết quả quan sát cho thấy khi OD_{600 nm} > 0,2 đã xảy ra hiện tượng phát triển quá mức của vi khuẩn khi ủ cảm ứng gây ra thối úng mẫu hàng loạt và cuối cùng là làm giảm tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ. Khi OD_{600 nm} càng cao không những không làm tăng tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ mà còn làm cho các mẫu rễ tơ thu được cũng khó loại nhiễm hết vi khuẩn dù sử dụng kháng sinh cefotaxime ở nồng độ cao (900 mg/l). Điều này trước đây từng được Petrova *et al.* (2013) ghi nhận.

Bảng 1 : Ảnh hưởng của mật độ tế bào chủng *Agrobacterium rhizogenes* C26 lên tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ

OD _{600nm}	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
0,1	1,7f
0,2	33,3abcd
0,4	35,3ab
0,6	32,3bcd
0,8	30,3cde
1,0	30,7cde

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 $p=0,05$

Kết quả này đã cho thấy mật số tế bào của huyền phù chủng *A. rhizogenes* C26 thích hợp để gây nhiễm lên giống dưa cạn VIN077 là OD_{600nm}= 0,2. Mật số của huyền phù này thấp hơn so với kết quả của chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 (Peebles, 2008; Hughes, 2003) và chủng *A. rhizogenes* C58C1 (Liu *et al.*, 2011) dùng cảm ứng rễ tơ trên cây dưa cạn hay của chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 dùng cảm ứng rễ tơ trên cây kim sa (Petrova *et al.*, 2013). Theo Bivadi *et al.* (2014), sự khác nhau này có thể là do tính nhạy của thực vật chủ với chủng vi khuẩn xâm nhiễm. Theo đó, có thể giống dưa cạn VIN077 nhạy với chủng *A. rhizogenes* C26 đã dẫn đến mật số vi khuẩn cần thiết để gây nhiễm thấp.

3.2 Ảnh hưởng của thời gian gây nhiễm

Ngoài mật số tế bào trong huyền phù *A. rhizogenes*, 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 (Brijwal and Tamta, 2015; Karmarkar and Keshavachandran, 2001). 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 mô lá cây dưa cạn VIN077 sau khi được tạo vết thương được gây nhiễm bằng cách ngâm trong huyền phù *A. rhizogenes* C26 có OD_{600 nm} 0,2 với thời gian khác nhau (Bảng 2). 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 1 đến 10 phút thì tỷ lệ mẫu đáp ứng cũng tăng theo. Tuy nhiên, thời gian gây nhiễm kéo dài hơn 10 phút sẽ gây ra hiện tượng mẫu chết do sự phát triển quá mức của vi khuẩn sau đó.

Bảng 2: Ảnh hưởng của thời gian ngâm mẫu với huyền phù chủng *Agrobacterium rhizogenes* C26 lên tỷ lệ mẫu hình thành rễ

Thời gian gây nhiễm (phút)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
1	32,0bcd
5	33,7bd
10	37,0a
15	29,7cdef
30	28,0def
45	27,3def
60	21,9g

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 $p=0,05$

Trước đây, nhiều báo cáo đã cho thấy thời gian gây nhiễm thích hợp tùy thuộc vào chủng vi khuẩn cũng như loài thực vật. Cùng cảm ứng rễ tơ trên cây hoàng liên gai Ấn Độ (*Berberis aristata* DC.), thời gian gây nhiễm thích hợp là 4 giờ với chủng *A. rhizogenes* MTCC532 trong khi với chủng *A. rhizogenes* MTCC2364 là 3 giờ (Brijwal and Tamta, 2015). Theo báo cáo của Karthikeyan *et al.* (2007) 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 (Pirian *et al.*, 2012) hay trên cây *Holostemma adakodien* K. Schum là 30 phút (Karmarkar and Keshavachandran, 2001). Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy thời gian gây nhiễm thích hợp cho giống dưa cạn VIN077 với chủng *A. rhizogenes* C26 là 10 phút.

3.3 Ảnh hưởng của thời gian ủ cảm ứng

Thời gian ủ cảm ứng là giai đoạn cần thiết trong phương pháp gây nhiễm trực tiếp *A. rhizogenes* lên mô thực vật chủ (Wang, 2006). Trong thời gian này sẽ xảy ra quá trình chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào chủ như chuyển T-DNA vào tế bào chủ và chèn T-DNA 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 đậu phộng (Karthikeyan *et al.*, 2007) và cây *Duboisia myoporoides* (Yoshimatsu *et al.*, 2004) là 2 ngày trong khi trên cây giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) (Chang *et al.*, 2005) thì thời gian này là 2 tuần. Thời gian thích hợp để

cảm ứng tạo rễ chuyển gen bằng chủng *A. rhizogenes* MTCC532 từ cây bạch hoa xà (*Plumbago zeylanica* L.) là 3 ngày (Sivanesan and Jeong, 2009) trong khi với cây hoàng liên gai Ấn Độ là 2 ngày (Brijwal and Tamta, 2015).

Bảng 3: Ảnh hưởng của thời gian ủ cảm ứng lên tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ (%)

Thời gian ủ cảm ứng (ngày)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
1	17,7g
2	21,0ef
3	24,7def
4	27,0cde
5	30,3cd
6	36,0ab
7	36,7ab

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 $p=0,05$

Để xác định thời gian ủ cảm ứng thích hợp tạo rễ tơ chuyển gen từ mô lá dừa cạn VIN077 bằng chủng *A. rhizogenes* C26, trong thí nghiệm này đã tiến hành thay đổi thời gian ủ cảm ứng từ 1 đến 7 ngày (Bảng 3). 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 (1994). 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. Theo kết quả này thì thời gian ủ cảm ứng thích hợp cho việc cảm ứng rễ tơ từ mô lá của giống dừa cạn VIN077 là 6 ngày. Thời gian này dài hơn so với cảm ứng rễ tơ từ mô sẹo cây dừa cạn bằng chủng *A. rhizogenes* R1000 (Zargar *et al.*, 2010) và từ mô lá cây dừa cạn bằng chủng *A. rhizogenes* C58C1 (Liu *et al.*, 2011). Hiện tượng này xảy ra có thể do tế bào mô lá từ giống dừa cạn VIN077 khó được chuyển gen hơn so với các giống dừa cạn của các nhóm tác giả trên đã sử dụng để nghiên cứu. Ngoài ra, khả năng chuyển gen của *A. rhizogenes* vào mô sẹo xảy ra dễ dàng hơn với mô lá (Zargar *et al.*, 2010).

3.4 Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng trong giai đoạn ủ cảm ứng

Vài báo cáo trước đây cho thấy ánh sáng có thể ảnh hưởng lên sự hình thành rễ tơ bởi *A. rhizogenes* trên cây dừa cạn và cây cà rốt. Với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834, sự cảm ứng rễ

tơ thích hợp trên cây dừa cạn khi được ủ trong tối 24 giờ trước khi chiếu sáng 16 giờ/ngày trong 2 ngày (Peebles, 2008; Hughes, 2003). Khả năng cảm ứng tạo rễ tơ của các chủng *A. rhizogenes* A4s, A4v, AG1 và Arif cao nhất trên lát cắt củ cà rốt khi giai đoạn cảm ứng được ủ trong tối (Danesh *et al.*, 2006). Theo Karmarkar and Keshavachandran (2001), khi được gây nhiễm trực tiếp với các chủng *A. rhizogenes* PcA4, ATCC15834 và A4 rồi ủ cảm ứng trong tối, không có sự đáp ứng tạo rễ trên các mẫu mô từ cây *Holostemma adakodien* K. Schum. Trong khi đó, sự chiếu sáng nhẹ lại là điều kiện thích hợp để thu nhận rễ chuyển gen từ mô thân cây dưa bờ (*Cucumis melo* L.) bằng chủng *A. rhizogenes* ATCC8196 (Mohiuddin *et al.*, 2011). Qua đó cho thấy cường độ chiếu sáng thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ có thể sẽ thay đổi tùy theo loài thực vật chủ và chủng vi khuẩn.

Bảng 4: Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng trong thời gian ủ cảm ứng lên tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ

Cường độ sáng (lux)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
0	36,7a
500	24,7bc
1000	20,0bcd
1500	14,7cde
2000	8,7de

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 nghiên cứu này, 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. Các kết quả thu được cho thấy tỷ lệ mẫu hình thành rễ đã bị giảm xuống có ý nghĩa ở tất cả các chế độ chiếu sáng từ 500 đến 2000 lux (Bảng 4) 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. Tuy nhiên, kết quả này cho thấy ánh sáng chỉ ức chế một phần khả năng cảm ứng rễ tơ của chủng *A. rhizogenes* C26 trên lá cây dừa cạn trong khi sự chiếu sáng trong giai đoạn ủ cảm ứng đã ức chế hoàn toàn khả năng cảm ứng rễ tơ của chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 trên giống cây *Lens culinaris* Medik (Dogan *et al.*, 2005). Ngoài ra, so với báo cáo của Peebles (2008) và Hughes (2003), để tạo rễ tơ từ mô lá cây dừa cạn có thể cần phải có giai đoạn ủ cảm ứng trong tối hoàn toàn trước khi tiếp tục ủ cảm ứng ở chế độ chiếu sáng 16 giờ/ngày.

3.5 Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng trong giai đoạn loại nhiễm *Agrobacterium rhizogenes*

So với giai đoạn ủ cảm ứng, sự chiếu sáng trong giai đoạn loại nhiễm vi khuẩn *A. rhizogenes* có ảnh hưởng tích cực hơn. Tuy nhiên, chế độ chiếu sáng cũng tùy thuộc vào loài thực vật khác nhau. Với vài loài thực vật, việc ủ mẫu trong tối để loại nhiễm vi khuẩn lại là điều kiện thích hợp để thu nhận rễ chuyển gen. Với chủng *A. rhizogenes* C26, sự chiếu sáng nhẹ trong giai đoạn này đã làm tăng tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ tăng từ 37,0% khi được ủ trong điều kiện tối lên 42,3% khi được ủ trong điều kiện sáng 1000 lux với 16 giờ/ngày (Bảng 5). Thêm vào đó khi được chiếu sáng ở cường độ cao hơn, tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ tuy có xu hướng giảm hơn so với cường độ chiếu sáng 1000 lux nhưng sự khác biệt này là không có ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả gây nhiễm trên lát cắt cà rốt bằng bốn chủng *A. rhizogenes* A4s, A4v, AG1 và Arif của Danesh *et al.* (2006) cũng cho thấy ở điều kiện chiếu sáng nhẹ khi loại nhiễm thì số mẫu hình thành rễ cao hơn so với ở điều kiện tối. Từ kết quả này cho thấy điều kiện được chiếu sáng 1000 lux là thích hợp nhất trong giai đoạn loại nhiễm vi khuẩn.

Bảng 5: Ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng trong thời gian loại nhiễm *Agrobacterium rhizogenes* C26 lên tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ

Cường độ sáng (lux)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
0	36,7cde
500	38,0cde
1000	42,3ab
1500	41,3abcd
2000	39,3abcde

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 $p=0,05$

3.6 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Các báo cáo trước đây đã cho thấy mỗi giống thực vật và mỗi chủng vi khuẩn khác nhau có môi trường thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ khác nhau. Sự khác nhau này có thể là do đặc trưng sinh lý và biến dưỡng của từng chủng vi khuẩn và mô thực vật chủ (Çiftçi, 2012). Trong đa số các báo cáo, môi trường được sử dụng là môi trường MS hoặc B5 hoặc White ở nồng độ các thành phần đậm đặc hoặc bán đậm đặc. Chẳng hạn như, môi trường MS bán đậm đặc được dùng để thu nhận rễ tơ từ cây

dừa cạn bằng chủng *A. rhizogenes* C58C1 (Liu *et al.*, 2011) trong khi môi trường MS đậm đặc thích hợp hơn khi gây nhiễm với chủng *A. rhizogenes* R1000 (Zargar *et al.*, 2010). Trước đó, Hughes (2003) đã sử dụng môi trường B5 để chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 cảm ứng rễ tơ trên mô lá cây dừa cạn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ tơ của chủng *A. rhizogenes* C26 trên bốn loại môi trường khác nhau (B5, MS, SH và White) ở mức nồng độ các thành phần trong môi trường đậm đặc và bán đậm đặc. Các số liệu thu được cho thấy ở tất cả các môi trường có nồng độ bán đậm đặc đều cho tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ cao hơn có ý nghĩa so với môi trường có nồng độ đậm đặc (Bảng 6). Trong đó, cao nhất là ở môi trường White bán đậm đặc. Ở nồng độ đậm đặc, môi trường White cũng cho tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ cao hơn so với các môi trường đậm đặc còn lại (đạt 50,7%) nhưng vẫn thấp hơn nhiều so với ở môi trường White bán đậm đặc (đạt 60,7%). Kết quả thu được đã cho thấy môi trường White bán đậm đặc là môi trường thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá cây dừa cạn bằng chủng *A. rhizogenes* C26. Kết quả này cũng một lần nữa cho thấy môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong quá trình cảm ứng tạo rễ của *A. rhizogenes*.

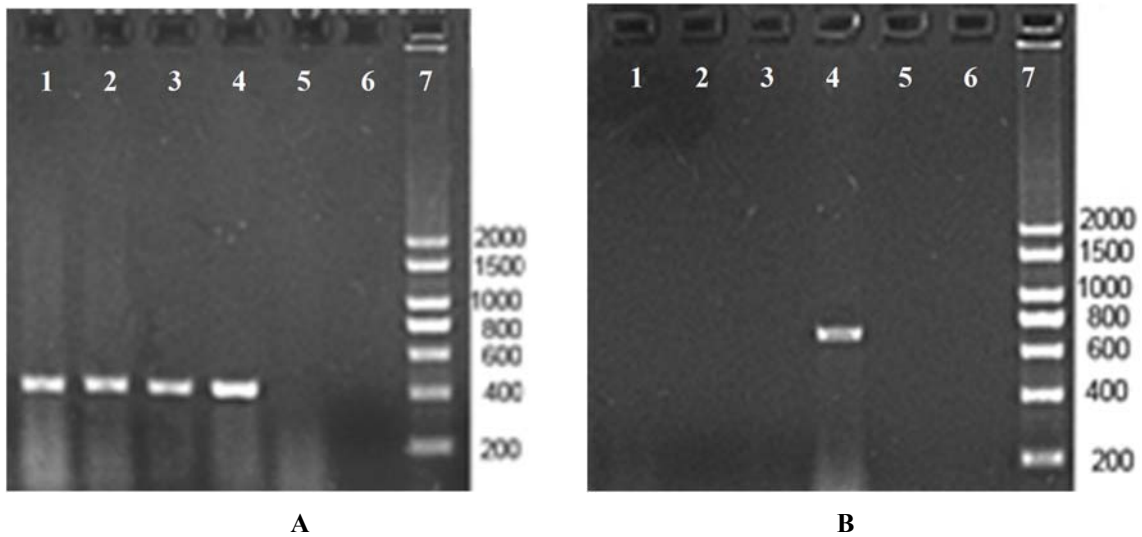
Bảng 6: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ

Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
B5	17,7gh
1/2B5	53,7bcd
MS	19,3gh
1/2MS	43,7e
SH	30,7f
1/2SH	53,3bcd
W	50,7bcd
1/2W	60,7a

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 $p=0,05$

3.7 Xác nhận rễ tơ chuyển gen bằng PCR

Qua phân tích sản phẩm PCR (Hình 2) đã cho thấy các dòng rễ tơ được kiểm tra đều có chứa gen *rolB* tương ứng với đoạn DNA được khuếch đại với kích thước 430 bp. Trong khi đó sản phẩm PCR của gen *virC* có kích thước 730 bp chỉ được phát hiện ở mẫu DNA của vi khuẩn *A. rhizogenes* nhưng không tìm thấy ở các mẫu rễ tơ. Kết quả này chứng tỏ các dòng rễ tơ này đã được chuyển gen và không bị nhiễm bởi vi khuẩn *A. rhizogenes*.



Hình 2: Kết quả phân tích PCR xác nhận rễ chuyển gen từ giống dưa cạn VIN077 với chủng *Agrobacterium rhizogenes* C26. A: Xác nhận sự hiện diện gen *rolB*; giếng 1, 2 và 3: rễ tơ được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* C26; giếng 4: đối chứng dương *rolB*; giếng 5: rễ cây không chuyển gen; giếng 6: nước và giếng 7: thang chuẩn; B: Xác nhận sự hiện diện gen *virC*; giếng 1, 2 và 3: rễ tơ được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* C26; giếng 4: đối chứng dương *virC*; giếng 5: rễ cây không chuyển gen; giếng 6: nước và giếng 7: thang chuẩn

4 KẾT LUẬN

Quá trình chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ từ cây dưa cạn cũng chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau. Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự cảm ứng tạo rễ tơ từ giống dưa cạn VIN077 bằng chủng *A. rhizogenes* C26 chịu ảnh hưởng của 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 giống dưa cạn VIN077 bằng chủng *A. rhizogenes* C26 là $OD_{600\text{ nm}}$ 0,2 với thời gian ngâm mẫu là 10 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 chiếu sáng 1000 lux trên môi trường White bán đậm đặc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

AL-Yozbaki, G.S.H., Rasheed, J.H., and Salih, S.M., 2015. Transformation of soybean (*Glycine Max* L.) via GUS-labeled *Agrobacterium rhizogenes* R1000. *International Journal of Science and Technology*. 4(6): 267-272.

Bivadi, V., Zakaria, R.A., Zare, N., and Yazdani, B., 2014. Effects of different tissue culture conditions in hairy roots induction in *Hypericum perforatum* L.

International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 7(9): 645-652.

Brijwal, L. and Tamta, S., 2015. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. *SpringerPlus*. 4(443): 1-10.

Chandra, S., Lata, H., and Varma, A., 2013. *Biotechnology for Medicinal Plants*. Springer. London. 464 pages.

Chang, C.K., Chang, K.S., Lin, Y.C., Liu, S.Y., and Chen, C.Y., 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: 1165-1169.

Çiftçi Y.Ö., 2012. Transgenic plants-advances and limitations. *InTech*. 478 pages.

Danesh, Y.R., Mohammadi, G.E., Alizadeh, A., and Modarres, S.M., 2006. Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran. *Journal of Biological Sciences*. 6(10): 87-91.

Dogan, D., Khawar, K.M., and Ozcan, S. 2005. *Agrobacterium* mediated tumor and hairy root formation from different explants of lentils derived from young seedlings. *International Journal of Agriculture and Biology*. 7(6): 1019-1025.

- Georgiev, M.I., Pavlov, A.I., and Bley, T., 2007. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74(6):1175-1185.
- Góraj-Koniarska, J., Stochmal, A., Oleszek, W., Mołdoch, J., and Saniewski, M., 2015. Elicitation of anthocyanin production in roots of *Kalanchoe blossfeldiana* by methyl jasmonate. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica.* 57(1): 141-148.
- Ho, C.H., 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.
- Hughes, E.H., 2003. Metabolic engineering of *Catharanthus roseus* hairy roots using an inducible promoter system. Doctoral thesis. Rice University. Houston, Texas.
- Karmarkar, S.H. and Keshavachandran, R., 2001. Genetic transformation and hairy root induction in *Holostemma adakodien* K. Schum – a vulnerable medicinal plant. *Indian Journal of Experimental Biology.* 39: 1263-1267.
- Karthikeyan, A., Palanivel, S., Parvathy, S., and Bhakya, R.R., 2007. Hairy root induction from hypocotyl segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *African Journal of Biotechnology.*
- Liu, D.H., Ren, W.W., Cui, L.J., Zhang, L.D., Sun, X.F., and Tang, K.X., 2011. Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2. *Afr J Biotechnol.* 10: 3260–3268.
- Mohiuddin, A.K.M., Abdullah, Z.C., Chowdhury, K., Harikrishna, K., and Napis, S., 2011. Enhanced virulence gene activity of *Agrobacterium* in muskmelon (*Cucumis melo* L.) cv. 'Birdie'. *Not. Sci. Biol.* 3(2): 71-79.
- Mujib, A., Ilah, A., Aslam, J., Fatima, S., Siddiqui, Z.H., and Maqsood, M., 2012. *Catharanthus roseus* alkaloids: Application of biotechnology for improving yield. *Plant Growth Regulation.* 68: 111-127.
- Peebles, C.A.M., 2008. Metabolic engineering of the terpenoid indole alkaloid pathway of *Catharanthus roseus* hairy roots. Doctoral thesis. Rice University. Houston, Texas.
- Petrova, M., Zayova, E., and Vlahova, M., 2013. Induction of hairy roots in *Arnica montana* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Central Europ. J. Biol.* 8(5): 470–479.
- Pirian, K., Piri, K., and Ghiyasvand, T., 2012. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to noradrenaline's production. *Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci.* 3: 642-649.
- Porebski, S., Bailey, G. L., and Baum, B. R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 8–15.
- Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Asghari, G., and Ghanadian, M., 2015. Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. *Turk J Biol.* 39: 111–118.
- Sivanesan, I., and Jeong, B.R., 2009. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. *African Journal of Biotechnology.* 8(20): 5294-5300.
- Skala, E., Kicel, A., Olszewska, M.A., Kiss, A.K., and Wysokinska, H., 2015. Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *BioMedical Research International.* 1-11.
- Suza, W., Harris, R.S., and Lorence, A., 2008. Hairy roots: from high-value metabolite production to phytoremediation. *Electronic Journal of Integrative Bioscience.* 3(1): 57–65.
- Tzfira, T. and Citovsky, V., 2008. *Agrobacterium: from biology to biotechnology.* Springer. 750 pages.
- Wang, K., 2006. *Agrobacterium protocols.* Vol. 1. Humana Press. 474 pages.
- Yoshimatsu, K., Sudo, H., Kamada, H., Kiuchi, F., Kikuchi, Y., Sawada, J., and Shimomura, K., 2004. 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.
- Zargar, M., Farahani, F., Nabavi, T., 2010. Hairy roots production of transgenic *Catharanthus roseus* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* under in vitro conditions. *J. Med. Plants Res.* 4(21): 2199-2203.