

Nghiên cứu bước đầu nuôi cấy bảo quản các dòng rễ tơ từ cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) được cảm ứng bằng *Agrobacterium rhizogenes* được phân lập ở Việt Nam

- **Nguyễn Như Nhứt**
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
CN Công ty TNHH Gia Tường tỉnh Bình Dương
- **Bùi Văn Lệ**
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
Email: nhunhutnguyen@yahoo.co.uk

(Bài nhận ngày 03 tháng 04 năm 2017, nhận đăng ngày 16 tháng 05 năm 2017)

TÓM TẮT

Rễ tơ cây Dừa cạn thu được từ việc chuyển gene nhờ *Agrobacterium rhizogenes* được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu và đời sống. Do đó, phương pháp bảo quản những dòng rễ có giá trị được quan tâm nghiên cứu. Khi được nuôi cấy trên các môi trường thạch khác nhau, kết quả cho thấy môi trường Gamborg'B5 thích hợp để nuôi cấy bảo quản các dòng rễ tơ từ hai giống VIN002 và VIN005 trong khi môi trường White thích hợp hơn

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

MỞ ĐẦU

Rễ tơ là sản phẩm của quá trình chuyển gene từ plasmid của *Agrobacterium rhizogenes* vào trong tế bào thực vật [18] và từ lâu đã được sử dụng như một công cụ để sản xuất các hợp chất thứ cấp [5]. Trong đó, rễ tơ từ cây Dừa cạn cũng đang được quan tâm nghiên cứu do chúng có khả năng tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp có giá trị [14]. Đáng kể là những hợp chất có tác dụng chữa trị ung thư ở người như vinblastine và vincristine [10]. Ngày nay, rễ tơ cây Dừa cạn ngày càng được quan tâm nhờ khả năng tổng hợp những hợp chất mới không có trong cây bình thường như lanast-5,8-dien-3 β -ol-27-oic acid-3 β -D-glucopyranosyl (4'-1")-

để bảo quản các dòng rễ tơ từ hai giống VIN072 và VIN077. Tất cả các dòng rễ cần phải được bảo quản trong tối ở 25–27 °C. Ở điều kiện bảo quản thích hợp, tỷ lệ số dòng rễ từ các giống VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077 phát triển ổn định đạt tuần tự là 69,3; 67,0; 57,3 và 60,7 %. Trong đó, tuần tự có 90,0; 93,3; 80,0 và 93,3 % vẫn bảo tồn được gene *rolB*, một gene quan trọng ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của rễ tơ.

10",11"-dimethoxy anthracene và 2-methoxy-6-(nonacontan-5",6"-dionyl)-11-hydroxy-13-methyl-11 β -D-rhamnopyranoside anthracene [8]. Ngoài ra, nhiều hoạt tính sinh học khác cũng đã được phát hiện ở cao chiết từ rễ tơ cây Dừa cạn như kháng khuẩn, kháng nấm và kháng oxy hóa [14].

Đa số các dòng rễ tơ nói chung được nuôi cấy bảo quản trên môi trường thạch hoặc môi trường lỏng [20]. Việc nuôi cấy bảo quản rễ trong môi trường lỏng thường tốn kém và phức tạp về thiết bị. Bảo quản ở dạng phôi soma chỉ thành công cho một số dòng rễ tơ từ vài loài thực vật nhất định. Rễ tơ cây Dừa cạn cũng đã từng được bảo quản thông qua phôi soma [15]. Tuy nhiên, điều kiện phục hồi để tái sinh lại như ban đầu khá phức tạp với tỷ lệ thành

công thấp. Do đó, cho đến nay, rễ tơ cây Dừa cạn cũng được bảo quản chủ yếu bằng phương pháp cấy chuyển trên môi trường thạch hoặc môi trường lỏng. Tuy nhiên, các nghiên cứu nuôi cấy bảo quản rễ tơ trên môi trường thạch vẫn còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này, rễ tơ cây Dừa cạn được nuôi cấy trên môi trường thạch ở các điều kiện khác nhau như môi trường cơ bản để nuôi cấy, ánh sáng và nhiệt độ để chọn lọc điều kiện bảo quản thích hợp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Bốn nhóm dòng rễ tơ thu được từ bốn giống Dừa cạn khác nhau được cảm ứng bằng các chủng *A. rhizogenes* phân lập từ đất vùng rễ cây trồng ở Việt Nam. Ba giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 được cảm ứng tạo rễ tơ bằng chủng *A. rhizogenes* C18 và giống Dừa cạn VIN077 được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* C26.

Phương pháp

Chuẩn bị dòng rễ

Rễ tơ sau khi thu được từ sự chuyển gene bởi *A. rhizogenes* được loại nhiễm bằng cách nuôi cấy trên môi trường có cefotaxime 500 mg/L. Sau đó, rễ được cắt tạo dòng theo định nghĩa dòng rễ của Chilton và cộng sự (1982) [7]. Theo đó, mỗi dòng rễ là một rễ sơ cấp được hình thành từ vị trí vết thương bị xâm nhiễm. Việc cắt tạo dòng rễ tơ khi chiều dài của rễ được khoảng 2–3 cm.

Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy bảo quản

Để đánh giá ảnh hưởng của loại môi trường khoáng cơ bản, các dòng rễ tơ khác nhau có chiều dài 2–3 cm (có trọng lượng khoảng 0,1–0,2 g) được cấy vào môi trường thạch trên đĩa petri [2]. Các môi trường được sử dụng gồm Gamborg'B5 (B5), Murashige và Skoog (MS), Schenk và Hildebrandt (SH) và White (W) và bốn môi trường có thành phần khoáng bán đậm đặc (1/2B5, 1/2MS, 1/2SH và 1/2W). Ủ đĩa ở nhiệt độ 25 °C trong tối. Rễ được

cấy chuyển sang đĩa petri chứa môi trường mới tương tự sau mỗi 3–4 tuần.

Sự ảnh hưởng của cường độ ánh sáng được thực hiện bằng cách nuôi cấy các dòng rễ tơ trên môi trường khoáng thích hợp tương ứng cho bốn nhóm dòng rễ tơ từ bốn giống Dừa cạn được chọn ở trên ở 25 °C. Các đĩa được ủ ở chế độ chiếu sáng liên tục với cường độ chiếu sáng thay đổi từ 500 đến 1000 lux. Đối chứng được ủ trong tối. Rễ được cấy chuyển sang đĩa petri chứa môi trường mới tương tự sau mỗi 3–4 tuần.

Để xác định nhiệt độ bảo quản, các dòng rễ tơ từ bốn giống Dừa cạn được nuôi cấy trên môi trường khoáng và điều kiện chiếu sáng thích hợp tương ứng đã chọn ở trên. Nhiệt độ nuôi cấy được điều chỉnh ở các khoảng 8–10 °C, 18–20 °C, 25–27 °C và 32–34 °C. Rễ được cấy chuyển sang đĩa petri chứa môi trường mới tương tự sau mỗi 3–4 tuần.

Mỗi nghiệm thức cấy 100 dòng rễ khác nhau. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và thực hiện tương tự cho bốn nhóm dòng rễ tơ thu được từ bốn giống Dừa cạn VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077. Sau khi nuôi cấy 2 tháng, dựa vào tỷ lệ số dòng rễ tơ phát triển tạo rễ mới HR_d (Công thức 1) để chọn lọc điều kiện thích hợp cho nuôi cấy bảo quản rễ tơ [1, 20].

$$HR_d(\%) = \frac{\text{số dòng rễ phát triển bình thường}}{\text{Tổng số dòng rễ thí nghiệm}} \times 100 \quad \text{Công thức 1}$$

Đánh giá sự ổn định di truyền của rễ tơ sau khi bảo quản

Tiến hành nuôi cấy bảo quản các dòng rễ tơ ở các điều kiện thích hợp đã xác định cho từng nhóm dòng rễ tơ. Sau 12 tháng nuôi cấy bảo quản, những dòng rễ phát triển bình thường được tách chiết DNA để xác định sự hiện diện của các gene *rolB* trong bộ gene. Dựa vào kết quả phân tích để đánh giá sự ổn định của rễ tơ Dừa cạn sau thời gian bảo quản. Phân tích được thực hiện ngẫu nhiên trên 30 dòng rễ tơ cho mỗi nhóm rễ tơ từ bốn giống Dừa cạn. Gene *rolB* được xác định bằng cách cắt lấy rễ tơ để xác định sự hiện diện của gene *rolB* (có nguồn gốc từ plasmid Ri của vi khuẩn) bằng cách khuếch

đại các trình tự với cặp mồi gene *roIB* 430 bp có trình tự 5'-GCTCTTGACGTGCTAGATTT-3' và 5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3' [9]. Sử dụng cặp mồi gene *virC* 730 bp có trình tự 5'-ATC ATT TGT AGC GAC T-3' và 5'-AGC TCA AAC CTG CTT C-3' [6] 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 với 5 phút ở 72 °C. Sản phẩm sau khuếch đại có kích thước 430 bp sẽ được nhận diện bằng cách điện di trên gel agarose 1% với đệm TAE 0,5X. Phát hiện gene trên gel bằng cách ngâm trong dung dịch ethidium bromide rồi quan sát 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 [18, 21].

Xử lý số liệu

Số liệu thu được từ kết quả các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS version 20 và được trình bày dưới dạng số trung bình.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của môi trường thạch cơ bản

Để chọn lọc môi trường nuôi cấy, cả bốn nhóm dòng rễ tơ từ bốn giống Dừa cạn VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077 được nuôi cấy trên bốn loại môi trường thạch Gamborg B5 (B5), Murashige và Skoog (MS), Schenk và Hildebrandt (SH) và White (W) với nồng độ các thành phần khoáng đậm đặc và bán đậm đặc (1/2B5, 1/2MS, 1/2SH và 1/2W). Sau khi thử nghiệm, kết quả phân tích thống kê cho thấy có sự ảnh hưởng khác biệt giữa các môi trường nuôi cấy khác nhau lên khả năng phát triển của các nhóm dòng rễ tơ (Hình 1). Nhìn chung, các môi trường có thành phần khoáng đậm đặc cho tỷ lệ số dòng rễ tơ phát triển bình thường cao hơn so với các môi trường bán đậm đặc (Bảng 1). Với nhóm dòng rễ tơ từ giống VIN002 và VIN005 thì môi

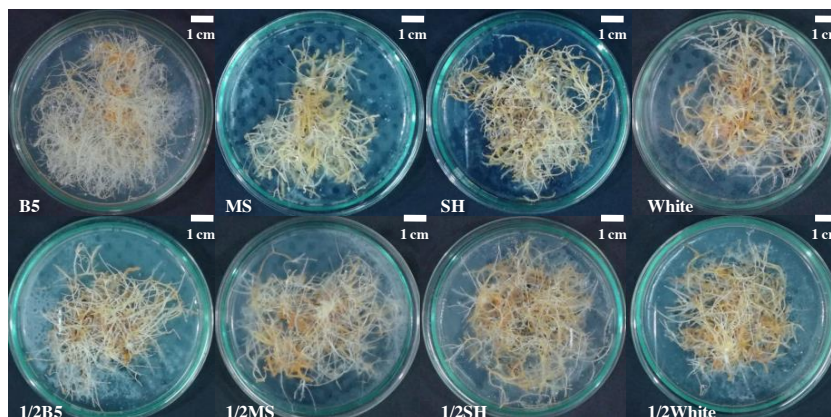
trường B5 thích hợp để nuôi cấy hơn các môi trường còn lại vì có tỷ lệ số dòng rễ phát triển bình thường cao hơn đáng kể (68,7% và 64,7% tương ứng). Trong khi đó, môi trường W lại là môi trường thích hợp hơn để nuôi cấy nhóm các dòng rễ tơ của giống VIN072 và VIN077 với tỷ lệ số dòng rễ phát triển bình thường đạt 56,0% và 55,3% tương ứng. Trước đây, môi trường 1/2B5 được [3] sử dụng để nuôi cấy bảo quản các dòng rễ tơ cây Dừa cạn được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 nhưng tỷ lệ rễ sống sót chỉ đạt 35 – 43%. Trong khi đó, rễ tơ cây *Coleus forskohlii* Briq. cũng được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 có thể được nuôi cấy bảo quản trên môi trường thạch MS [12]. Qua đó cho thấy môi trường khoáng thích hợp để nuôi cấy bảo quản các dòng rễ tơ từ các loài thực vật khác nhau thì không giống nhau. Dựa trên thành phần khoáng, sự hiện diện của sodium cùng với magnesium hàm lượng cao hơn trong môi trường B5 và W đã cho thấy có thể hai nhân tố này có vai trò quan trọng cho sự tăng trưởng của các dòng rễ tơ từ cây Dừa cạn. Ngoài ra, sự khác nhau của nguồn nitrogen trong môi trường B5 và W so với MS và SH cũng có lẽ đã góp phần gây ảnh hưởng lên sự phát triển của các dòng rễ tơ Dừa cạn [13].

Kết quả quan sát cho thấy trên tất cả các loại môi trường, các dòng rễ không phát triển bình thường thì có xu hướng phát triển thành sẹo (Hình 2) sau hai tháng nuôi cấy. Sự hình thành sẹo xuất hiện cả ở vùng rễ non và rễ già (Hình 3). Rất ít dòng rễ hóa gỗ sau thời gian cấy chuyển trên môi trường thạch (Hình 4). Một số ít dòng rễ cũng phát triển tạo sẹo rồi tiếp tục hình thành chồi (Hình 5) và phát triển thành cây sau đó. Sự hình thành sẹo và chồi này xảy ra khi không có sự bổ sung các hormone tăng trưởng, trước đây, được gọi là sự hình thành sẹo tự phát và chồi tự phát [5]. Sự tạo sẹo tự phát trên môi trường thạch của rễ tơ cây Dừa cạn đã từng được báo cáo bởi Brillanceau và cộng sự (1989) [4], tuy nhiên chưa có báo cáo nào về sự hình thành chồi tự phát từ rễ tơ cây Dừa cạn. Năm 1994, sự hình thành sẹo tự phát ở rễ tơ cây Dừa cạn cũng được Bhadra ghi nhận với tỷ lệ 57–65% tùy nhóm dòng rễ tơ từ bốn giống Dừa cạn khác nhau [2].

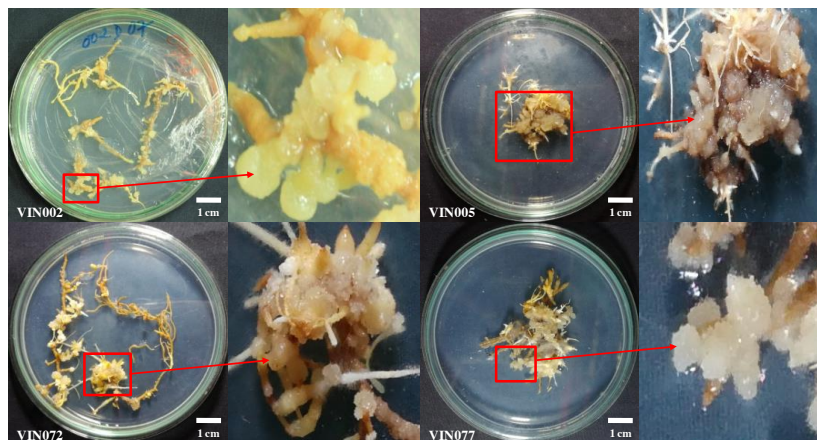
Bảng 1. Tỷ lệ dòng rễ tơ phát triển trên các môi trường khoáng khác nhau

| Môi trường thạch | HR _d (%) | | | |
|------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | VIN002 | VIN005 | VIN072 | VIN077 |
| B5 | 68,7 ^a | 64,7 ^a | 44,0 ^{cd} | 44,7 ^b |
| 1/2B5 | 58,3 ^{bc} | 54,3 ^c | 35,7 ^e | 35,3 ^c |
| MS | 59,3 ^{bc} | 60,3 ^{ab} | 52,3 ^{ab} | 47,7 ^b |
| 1/2MS | 62,7 ^{ab} | 57,0 ^{bc} | 50,0 ^{abc} | 46,7 ^b |
| SH | 58,0 ^{bc} | 47,0 ^d | 43,3 ^{cd} | 32,3 ^{cd} |
| 1/2SH | 47,7 ^d | 38,3 ^e | 38,0 ^{de} | 28,3 ^e |
| W | 61,3 ^{bc} | 57,0 ^{bc} | 56,0 ^a | 55,3 ^a |
| 1/2W | 55,0 ^c | 46,7 ^d | 47,3 ^{bc} | 49,0 ^b |

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 $p=0,05$.



Hình 1. Minh họa sự phát triển của rễ tơ giống VIN002 trên các môi trường khoáng khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy



Hình 2. Minh họa sự phát triển sẹo của rễ tơ từ các giống Đưa cạn khác nhau trên môi trường thạch 1/2MS sau 8 tuần nuôi cấy



Hình 3. Minh họa sự hóa sẹo ở vùng rễ trưởng thành (phải) và vùng rễ non (trái) của rễ tơ từ giống VIN072 trên môi trường 1/2B5 sau 8 tuần nuôi cấy



Hình 4. Minh họa sự hóa gỗ của rễ tơ từ giống VIN072 trên môi trường thạch 1/2SH sau 8 tuần nuôi cấy



Hình 5. Minh họa sự phát triển chồi của rễ tơ giống VIN002 trên môi trường thạch 1/2MS sau 8 tuần nuôi cấy

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng

Điều kiện chiếu sáng cũng có ảnh hưởng khác nhau lên sự phát triển của rễ tơ nói chung [2]. Ánh sáng trắng có ảnh hưởng tốt hơn lên sự tăng trưởng sinh khối rễ tơ từ câu đậu ma (*Pueraria phaseoloides*) [11] trong khi ánh sáng lại không ảnh hưởng đáng kể lên sự phát triển của rễ tơ từ cây *Plumbago zeylanica* [16]. Ở đây, sự phát triển

của rễ tơ từ bốn giống cây Dừa cạn đều bị ức chế bởi ánh sáng trắng với các cường độ khác nhau. Tỷ lệ số dòng rễ phát triển bình thường bị giảm rõ rệt khi rễ được chiếu sáng liên tục so với khi được nuôi cấy trong tối (Bảng 2). Ngoài ra, khi được chiếu sáng ở các cường độ khác nhau, tỷ lệ số dòng rễ tơ phát triển bình thường khác biệt không có ý nghĩa.

Bảng 2. Tỷ lệ dòng rễ tơ phát triển trên các môi trường thạch ở các cường độ chiếu sáng khác nhau

| Cường độ chiếu sáng (lux), 16 giờ/ngày | HR _d (%) | | | |
|---|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | VIN002 | VIN005 | VIN072 | VIN077 |
| 0 | 69,0 ^a | 64,0 ^a | 57,7 ^a | 59,0 ^a |
| 500 | 16,0 ^b | 14,3 ^b | 12,7 ^b | 13,7 ^b |
| 1000 | 13,0 ^b | 10,0 ^{bcd} | 6,7 ^{bc} | 10,0 ^b |
| 1500 | 13,7 ^b | 12,7 ^b | 8,3 ^{bc} | 12,3 ^b |
| 2000 | 15,0 ^b | 11,3 ^{bc} | 7,3 ^{bc} | 12,7 ^b |
| 2500 | 14,0 ^b | 12,0 ^{bc} | 5,7 ^c | 8,7 ^b |
| 3000 | 10,3 ^b | 7,3 ^{cd} | 6,0 ^{bc} | 12,0 ^b |
| 3500 | 11,3 ^b | 5,7 ^d | 7,3 ^{bc} | 9,7 ^b |

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 $p=0,05$.

Khi được chiếu sáng, hầu hết các dòng rễ tơ không phát triển bình thường sẽ phát triển thành sẹo tự phát. Dưới ảnh hưởng của ánh sáng trắng ở các cường độ khác nhau, tỷ lệ số dòng rễ hình thành sẹo tự phát cao hơn so với ảnh hưởng của loại môi trường nuôi cấy (số liệu không được trình bày ở đây). Vài trường hợp, ánh sáng trắng cũng làm rễ tơ chuyển sang màu xanh (Hình 6) và trước đây cũng đã từng được báo cáo bởi Bhadra và cộng sự (1998) [3]. Ngoài ra, trong một số trường hợp cho thấy chóp rễ cũng bị thoái hóa (cháy) khi được chiếu sáng ở cường độ cao từ 2000 lux trở lên (Hình 7). Với các dòng rễ có thể thích nghi với ánh sáng, rễ phát triển với ít nhánh bên hơn so với trong tối. Cường độ ánh sáng càng cao thì rễ càng có ít nhánh bên hơn (Hình 8). Trong khi đó, các dòng rễ tơ thu được từ cây cà phê được gây nhiễm với chủng *A. rhizogenes* A4RS phân nhánh nhiều hơn khi được nuôi cấy bảo quản trên môi trường thạch MS và được chiếu sáng với cường độ trung

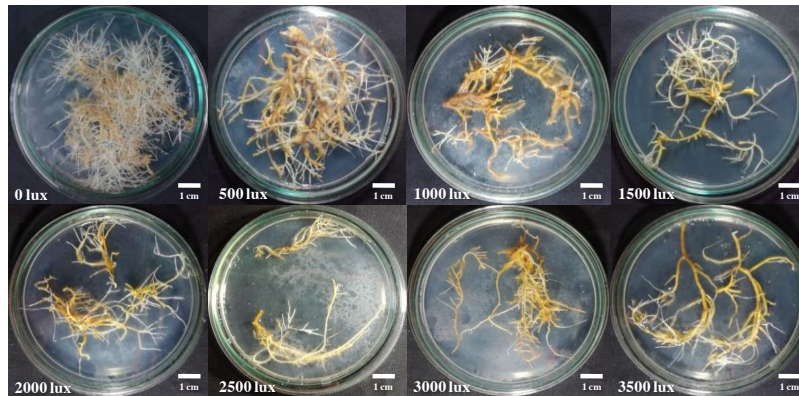
bình so với điều kiện tối hoặc được chiếu sáng ở cường độ cao hơn [1]. Sự khác nhau này có thể cho thấy rễ tơ Dừa cạn kém thích nghi với ánh sáng. Kết quả nghiên cứu này đã góp phần cho thấy điều kiện chiếu sáng có ảnh hưởng không tốt lên sự phát triển của rễ tơ Dừa cạn trên môi trường thạch và nuôi cấy bảo quản rễ tơ từ bốn giống VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077 ở điều kiện tối thích hợp hơn khi được chiếu sáng với ánh sáng trắng.



Hình 6. Minh họa sự chuyển màu xanh của rễ tơ từ giống VIN005 trên môi trường thạch sau 8 tuần nuôi cấy ở 3500 lux



Hình 7. Minh họa chóp của các dòng rễ tơ từ giống VIN002 trên môi trường thạch B5 và VIN072 trên môi trường thạch W bị thoái hóa khi chiếu sáng 3500 lux sau 8 tuần nuôi cấy

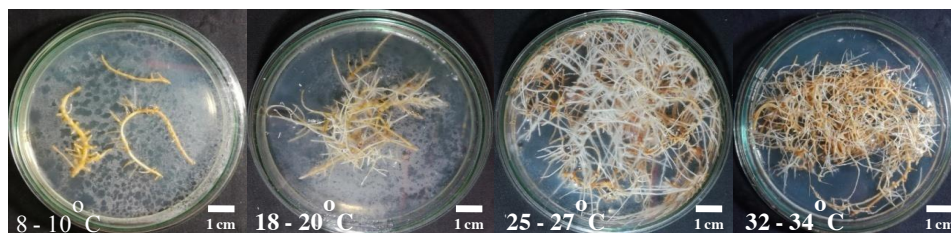


Hình 8. Minh họa ảnh hưởng của cường độ ánh sáng lên sự phát triển của các dòng rễ tơ từ giống VIN005 trên môi trường thạch B5 sau 8 tuần nuôi cấy

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Khi được nuôi trong môi trường lỏng, nhiệt độ có thể làm thay đổi sự tăng trưởng của rễ tơ cây Dừa cạn [17]. Thật vậy, các kết quả thu được cũng đã cho thấy trên môi trường thạch sự phát triển của rễ tơ cây Dừa cạn cũng chịu ảnh hưởng của nhiệt độ. Trên môi trường thạch, các dòng rễ tơ của cả bốn nhóm Dừa cạn đều không thể phát triển và sẫm màu ở nhiệt độ 8–10 °C trong khi nhiệt độ nuôi cấy từ 18 °C đến 34 °C không ảnh hưởng lên tỷ lệ số dòng rễ phát triển bình thường (Bảng 3, Hình 9). Tuy nhiên, ở 18–20 °C, các dòng rễ tơ

phát triển chậm hơn. Quan sát cho thấy các dòng rễ tơ phát triển mạnh, tỏa tròn với nhiều nhánh bên ở 25–27 °C trong khi các nhánh rễ trở nên mảnh hơn ở 32–34 °C sau hai tháng cấy chuyển (Hình 9). Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự tăng trưởng của các dòng rễ tơ có thể liên quan mật thiết với hoạt tính của các enzyme tổng hợp đến các hợp chất sơ cấp, bao gồm những hợp chất cấu tạo nên vật chất của tế bào. Theo đó, ở 25 – 27 °C có lẽ là nhiệt độ thích hợp để các enzyme này hoạt động nên sự tăng trưởng của rễ xảy ra mạnh hơn.



Hình 9. Minh họa sự phát triển của rễ tơ từ giống VIN002 trên môi trường thạch B5 ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy

Bảng 3. Tỷ lệ dòng rễ tơ phát triển trên các môi trường thạch ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau

| Nhiệt độ nuôi cấy (°C) | HR _d (%) | | | |
|------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | VIN002 | VIN005 | VIN072 | VIN077 |
| 8–10 | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b |
| 18–20 | 65,7 ^a | 64,0 ^a | 59,3 ^a | 60,7 ^a |
| 25–27 | 69,3 ^a | 67,0 ^a | 57,3 ^a | 60,7 ^a |
| 32–34 | 67,0 ^a | 64,3 ^a | 57,3 ^a | 61,3 ^a |

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

Sự ổn định di truyền của các dòng rễ tơ sau thời gian bảo quản 12 tháng

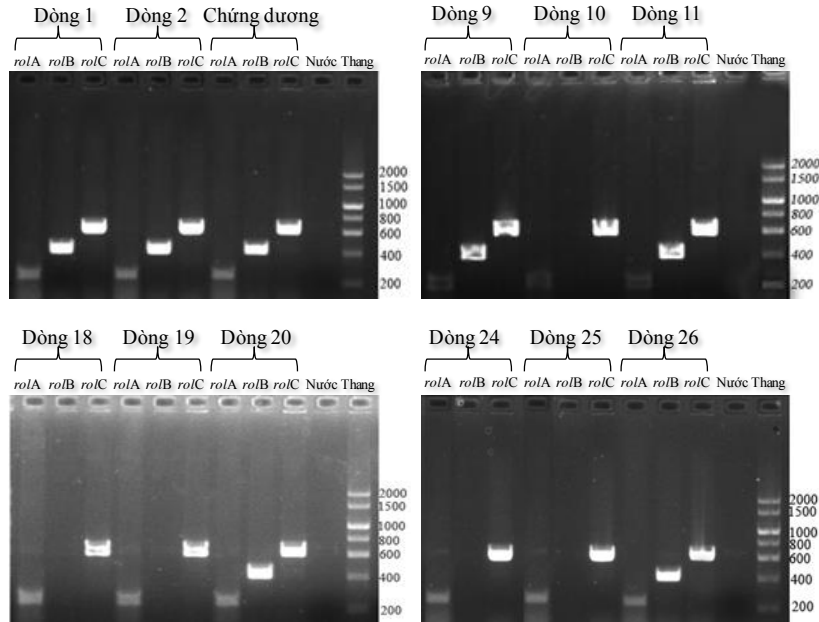
Các dòng rễ tơ từ bốn giống Dừa cạn được nuôi cấy ở các điều kiện thích hợp đã chọn lọc ở trên. Các dòng rễ tơ giống VIN002 và VIN005 được nuôi cấy trên môi trường thạch B5, trong tối ở 25 – 27 °C. Các dòng rễ tơ giống VIN072 và VIN077 được nuôi cấy ở điều kiện tương tự nhưng trên môi trường thạch W. Sau 12 tháng cấy chuyển, 30 dòng rễ phát triển tạo rễ mới của mỗi

nhóm được kiểm tra sự hiện diện của các gene *rolABC* (Hình 10). Kết quả phân tích cho thấy một số dòng đã bị mất gene *rolB*. Tỷ lệ số dòng rễ bị mất gene *rolB* không giống nhau giữa bốn nhóm dòng rễ tơ (Bảng 4). Nhóm dòng rễ tơ từ giống VIN072 có tỷ lệ số dòng rễ bị mất gene *rolB* cao nhất, lên đến 20%. Rễ tơ từ giống VIN002 có tỷ lệ số dòng rễ bị mất gene *rolB* thấp nhất và bằng một nửa so với nhóm dòng VIN072.

Bảng 4. Tỷ lệ dòng rễ tơ giữ được gene *rolB* sau 12 tháng cấy chuyên bảo quản liên tục trên môi trường thạch

| Nhóm dòng rễ tơ | Tỷ lệ dòng rễ tơ giữ được gene <i>rolB</i> (%) |
|-----------------|--|
| VIN002 | 90,0 |
| VIN005 | 93,3 |
| VIN072 | 80,0 |
| VIN077 | 93,3 |

Kết quả khảo sát trên 30 dòng rễ phát triển bình thường (không tạo sẹo, không tạo chồi) cho mỗi nhóm dòng rễ tơ từ bốn giống Dừa cạn.



Hình 10. Minh họa kết quả phân tích PCR xác nhận sự hiện diện các gene *rolABC* trong bộ gene của một số dòng rễ tơ từ giống Dừa cạn VIN002 sau 12 tháng cấy chuyên liên tục trên môi trường thạch B5 ở 25–27 °C trong tối

Gene *rolB* được biết là gene có vai trò quan trọng nhất quyết định sự hình thành rễ tơ [18]. Kết quả quan sát cho thấy tất cả các dòng rễ tơ từ bốn giống Dừa cạn mà bị mất gene *rolB* có hình thái sau 12 tháng cấy chuyên liên tục đều phát triển với ít nhánh bên và các nhánh trở nên mảnh hơn. Điều này cho thấy gene *rolB* cũng đóng vai trò quyết định đến sự phát triển của rễ tơ cây Dừa cạn và có thể sẽ ảnh hưởng lên sản lượng sinh khối rễ khi nuôi cấy. Kết quả khảo sát cũng cho thấy sự ổn định của hình thái rễ sau thời gian cấy chuyên liên tục là một đặc điểm hữu ích giúp chọn lọc dòng rễ cho các nghiên cứu về sau. Ngoài ra, kết quả phân tích cũng cho thấy một số dòng rễ không có sự hiện diện của các gene *rolA* và/hoặc *rolC* (số liệu không được trình bày ở đây). Hiện tượng này có

thể do các gene này không được chuyển đồng thời cùng với gene *rolB* [19] hoặc chúng cũng bị mất như gene *rolB* trong quá trình bảo quản.

KẾT LUẬN

Kết quả trên đã cho thấy rễ tơ thu được từ bốn giống Dừa cạn có môi trường thích hợp để nuôi cấy bảo quản khác nhau. Môi trường thích hợp để bảo quản thay đổi tùy vào giống Dừa cạn nhưng không phụ thuộc vào chủng *A. rhizogenes* được dùng để cảm ứng. Môi trường B5 thích hợp để bảo quản các dòng rễ tơ thu được từ hai giống VIN002 và VIN005, trong khi môi trường W thích hợp hơn để bảo quản các dòng rễ tơ thu được từ hai giống VIN072 và VIN077. Các dòng rễ tơ từ cả bốn giống VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077 phải

được nuôi cấy bảo quản trong điều kiện tối ở 25–27 °C. Khi điều kiện bảo quản không phù hợp, rễ tơ có xu hướng kém phát triển hoặc phát triển thành sẹo (hoặc chồi) tự phát. Tuy nhiên, ở điều

kiện nuôi cấy bảo quản thích hợp, rễ tơ cũng có thể bị mất gene *rolB* dẫn đến thay đổi hình thái sau mười hai tháng cấy chuyển liên tục.

Preliminary study on the preservation of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don hairy root lines induced by *Agrobacterium rhizogenes* isolated in Vietnam

- **Nguyen Nhu Nhut**
University of Science, VNU-HCM
Giatuong Company Limited, Binhduong branch
- **Bui Van Le**
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Agrobacterium rhizogenes-transformed hairy roots from *Catharanthus roseus* have been widely used in research and in life. Consequently, methods for preservation are essential to maintain valuable hairy root lines. Our results showed that Gamborg 'B5 was the most suitable medium for hairy roots from VIN002 and VIN005 while solid White media was more comfortable for the hairy

lines from VIN022 and VIN077. All hairy root lines must be preserved in the dark at 25–27 °C. Under suitable conditions, the rate of lines growing normally reached 69.3, 67.0, 57.3 and 60.7 % for VIN002, VIN005, VIN072, and VIN077, respectively. There were 90.0, 93.3, 80.0 and 93.3 % of lines could preserve *rolB*, a gene which has important effect on the growth of hairy roots.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. E. Alpizar, E. Dechamp, F. Lapeyre-Montes, C. Guilhaumon, B. Bertrand, C. Jourdan, P. Lashermes, H. Etienne, *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of Coffee (*Coffea arabica*): Conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization, *Annals of Botany*, 101, 929–940 (2008).
- [2]. R. Bhadra, Establishment, cultivation and optimization of hairy roots of *Catharanthus roseus* for the synthesis of indole alkaloids, *Thesis for the doctor degree of philosophy*, Rice University, Houston, Texas (1994).
- [3]. R. Bhadra, J.A. Morgan, J.V. Shanks, Transient studies of light-adapted cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*: growth and indole alkaloid accumulation, *Biotechnol. Bioeng.*, 60 (6), 670–678 (1998).
- [4]. M.H. Brillanceau, C. David, J. Tempé, Genetic transformation of *Catharanthus roseus* G. Don by *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell Rep.*, 8(2), 63–6 (1989).
- [5]. S. Chandra, H. Lata, A. Varma, *Biotechnology for medicinal plants*. Springer, London (2013).
- [6]. 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).
- [7]. M.D. Chilton, A.T. David, P. Annik, D. Chantal, C.D. Francine, J. Tempé, *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells, *Nature*, 295, 432–434 (1982).
- [8]. I.M. Chung, M. Ali, Y.M. Yang, C.A. M. Peebles, S.C. Chun, S.J. Lee, K.Y. San, A. Ahmad, Identification of new compounds from *Catharanthus roseus* hairy root cultures, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 28, 8, 1294–1298 (2007).
- [9]. S. Ewa, K. Agnieszka, A.O. Monika, K.K. Anna, W. Halina, 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).
- [10]. M.S. Hanafy, M.A. Matter, M.S. Asker, M.R. Rady, Production of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* L. and their antimicrobial activity, *South African Journal of Botany*, 105, 9–18 (2016).
- [11]. H.J. He, P. Liang, H.P. Shi, Effects of sucrose and light on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 21, 6, 1003–1008 (2005).
- [12]. D.K. Maheshwari, *Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems*, Springer (2011).
- [13]. Y.S.W. Manuhara, A.N. Kristanti, E.S.W. Utami, A. Yachya, Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type huybubble bioreactor, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5, 12, 1027–1032 (2015).
- [14]. S. Mardani-Nejad, Khavari-Nejad A. Ramazan, S. Saadatmand, N. Farzaneh, A.A. Parviz, Potent antioxidant properties of *rolB*-transformed *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 2, 537–550 (2016).
- [15]. A. Pietrosiuk, M. Furmanowa, Preliminary results of indole alkaloids production in different roots of *Catharanthus roseus* cultured *in vitro*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 70, 261–265 (2001).
- [16]. 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).
- [17]. L. Toivonen, S. Laakso, H. Rosenqvist, The effect of temperature on hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Growth, indole alkaloid accumulation and membrane lipid composition, *Plant Cell Rep.*, 11, 8, 395–399 (1992).
- [18]. T. Tzfira, V. Citovsky, *Agrobacterium – From biology to biotechnology*, Springer (2008).
- [19]. P. Verma, A.K. Mathur, K. Shanker, Growth, alkaloid production, *rol* genes integration, bioreactor up-scaling and plant regeneration studies in hairy root lines of *Catharanthus roseus*, *Plant Biosystems*, 146, 1, 27–40 (2012).
- [20]. S.H. Xue, X.J. Luo, Z.H. Wu, H.L. Zhang, X.Y. Wang, Cold storage and cryopreservation of hairy root cultures of medicinal plant *Eruca sativa* Mill., *Astragalus membranaceus* and *Gentiana macrophylla* Pall., *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 92, 251–260 (2008).
- [21]. S. Zahra, K. Mehrnaz, A. Gholamreza, G. Mustafa, 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).