

# Nghiên cứu tạo rễ tơ ở cây thổ nhân sâm Việt Nam (*Talinum paniculatum* Gaertn.)

Vũ Thị Như Trang<sup>1,2</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Thái Nguyên, 20 Đường Lương Ngọc Quyến, Thái Nguyên, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Y-Dược, Đại học Thái Nguyên, 284 Đường Lương Ngọc Quyến, Thái Nguyên, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

**Tóm tắt:** Cây thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum* Gaertn.) 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 thổ nhân sâm 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 thổ nhân sâm là ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tạo dòng rễ tơ tăng sinh khối. Nghiên cứu này trình bày kết quả tối ưu hóa quy trình tạo dòng rễ tơ thông qua *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) ở cây thổ nhân sâm. Trong 3 loại vật liệu lây nhiễm với *A. rhizogenes* (lá mầm, đoạn thân mang mắt chồi bên, mô lá) thì mô lá là vật liệu thích hợp cho tạo rễ tơ. Mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị OD<sub>600</sub> = 0,6; nồng độ AS 100 µmol/l; thời gian nhiễm khuẩn 10 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày; nồng độ cefotaxime 500 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 lác là thích hợp cho sự tăng trưởng rễ tơ. 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 thổ nhân sâm.

**Từ khóa:** *Agrobacterium rhizogenes*, thổ nhân sâm, rễ tơ.

## 1. Đặt vấn đề

Cây thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum* Gaertn.) chứa flavonoid, saponin có khả năng chống oxy hóa mạnh, được dùng để điều trị một số bệnh như viêm nhiễm, dị ứng, loét dạ dày và hành tá tràng, giúp cơ thể điều hòa các quá trình chuyển hóa, chống lão hóa, làm bền thành mạch máu, giảm lượng cholesterol trong máu và phòng chống ung thư [1-3],... Tuy nhiên, hàm lượng flavonoid được sản xuất tự nhiên trong

cây thổ nhân sâm còn rất thấp (khoảng 0,897 mg/g lá tươi) [4]. Hiện nay, người ta chú trọng đến sản xuất flavonoid có nguồn gốc từ thực vật vì chúng an toàn với con người.

Nuôi cấy sinh khối rễ tơ nhờ vi khuẩn *A. rhizogenes* để thu nhận các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học là một giải pháp hiệu quả, có thể khắc phục được những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống (dễ nhiễm dịch bệnh, có tồn dư các thuốc bảo vệ thực vật, dễ nhiễm các kim loại nặng,...) và phương pháp nuôi cấy tạo sinh khối tế bào thực vật (do tồn dư của các chất điều hòa sinh trưởng trong sinh khối tế bào nuôi cấy ảnh hưởng trực tiếp đến sản phẩm và sức khỏe người sử dụng). Đồng

\* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-913383289.

Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4561>

thời, rễ tơ có khả năng sinh trưởng nhanh, phát triển tốt trên môi trường không cần bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng và là cơ quan biệt hóa nên rễ tơ có sự di truyền ổn định hơn nuôi cấy tế bào huyền phù và mô sẹo [5-7].

Ở trên thế giới, đã có rất nhiều công trình nghiên cứu tạo rễ tơ và nhân nuôi sinh khối rễ tơ để tăng cường sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp tự nhiên có trong rễ. Hàm lượng glycyrrhizin tổng số đã tăng trong rễ tơ của cây cam thảo [8], hay hàm lượng plumbagine được tăng trong rễ tơ cây *Plumbago rosea* [9], hàm lượng saponin gia tăng trong rễ tơ cây rau đắng biển [10], hàm lượng anthraquinones tổng số được gia tăng trong rễ tơ cây hà thủ ô đỏ [11] và hàm lượng polyphenols tổng số được gia tăng trong rễ tơ cây mướp đắng [12]. Đối với cây thổ nhân sâm, nghiên cứu rễ tơ và ứng dụng kỹ thuật nhân nuôi tăng sinh khối rễ tơ đã được Manuhara và cộng sự (2012) công bố [13]. Tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng của việc sục khí và mật độ cấy đến sinh khối và hàm lượng saponin ở rễ tơ của cây thổ nhân sâm trong bình bioreactor. Mẫu lá của cây thổ nhân sâm được sử dụng để biến nạp *A. rhizogenes*. Sau hai tuần biến nạp, khi rễ tơ dài 2-5cm thì được cấy chuyển sang môi trường lỏng trong bình bioreactor. Kết quả cho thấy mật độ cấy là 5g rễ tơ/l và tốc độ sục khí ở 0,25 vvm là điều kiện tốt nhất cho sản xuất sinh khối và hàm lượng saponin. Đồng thời nhóm tác giả cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy rễ tơ trên môi trường bán lỏng đến trọng lượng khô và hàm lượng saponin trong rễ tơ của cây thổ nhân sâm. Kết quả cho thấy thời gian nuôi cấy 2 tuần cho khối lượng rễ tơ đạt kết quả cao nhất. Ở Việt Nam, nghiên cứu tạo dòng rễ tơ từ thực vật và đặc biệt là ở cây thổ nhân sâm còn rất mới mẻ.

## 2. Đối tượng và phương pháp

### 2.1. Đối tượng

Hạt cây thổ nhân sâm được thu tại tỉnh Thái Nguyên được sử dụng cho nuôi cấy *in vitro*. Hạt được khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 1 phút, rửa sạch bằng nước cất, sau đó khử

trùng hạt bằng dung dịch javel 60% trong khoảng thời gian 10 phút. Rửa sạch hạt bằng nước cất vô trùng 8 lần, sau đó cấy lên môi trường MS cơ bản [14]. Số mẫu hạt đưa vào cấy 50 - 60 hạt/bình. Sau khi cấy xong đem để bình tam giác trên giá của phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật 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. Theo dõi khả năng sinh trưởng phát triển của hạt trên môi trường MS cơ bản.

Chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây thổ nhân sâm

Hầu hết các mô và cơ quan thực vật gồm lá mầm, thân, lá hay cuống lá đều có khả năng nhiễm *A. rhizogenes* và cảm ứng hình thành rễ tơ. Tuy nhiên, hiệu quả biến nạp gen cảm ứng tạo rễ tơ phụ thuộc vào sự tương tác giữa *A. rhizogenes* với từng loại mô, từng loại tế bào [15, 16]. Vì vậy, thí nghiệm được thực hiện nhằm xác định mẫu phù hợp cho hiệu suất tạo rễ tơ cao. Theo đó, lá mầm hai tuần tuổi được gây tổn thương bằng mũi kim nhọn ở nách lá. Lá và đoạn thân mang mắt chồi bên được tách ra từ cây thổ nhân sâm sau nuôi cấy *in vitro* 6-8 tuần, các mảnh lá được cắt với kích thước khoảng  $1\text{cm}^2$ , đoạn thân có kích thước 1,0 - 1,5cm mang mắt chồi bên được gây tổn thương bằng dao cùn dọc qua giữa 2 mắt chồi bên, dùng kim châm gây tổn thương ở mắt chồi bên. Sau đó các mẫu vật được sử dụng làm vật liệu lây nhiễm. Sự phát sinh và sinh trưởng của rễ tơ được đánh giá bằng tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ, số rễ/mẫu, chiều dài rễ, tỷ lệ rễ tơ sinh trưởng phát triển tốt sau 4 tuần.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes*, nồng độ acetosyringone, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ mô lá thổ nhân sâm

Chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 gốc được cấy ria trên môi trường LB (Luria Bertani) đặc nuôi trong tủ ấm  $28^{\circ}\text{C}$  trong 48 giờ. Lấy

một khuẩn lạc nuôi phục hồi trong 20 ml LB lỏng nuôi lắc 110 vòng/phút ở 28°C qua đêm. Nhân nuôi thu sinh khối: lấy 5ml dịch khuẩn phục hồi cho vào 45 ml LB lỏng, nuôi lắc 110 vòng/phút ở 28°C trong 4-5 giờ và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm (OD<sub>600</sub>), OD<sub>600</sub> đạt 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 là có thể sử dụng cho biến nạp [17]. Các môi trường nuôi khuẩn đều không bổ sung kháng sinh do vector pRi 15834 không có gen kháng kháng sinh. Dịch khuẩn được ly tâm 4000 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút thu sinh khối loại bỏ môi trường nuôi cấy. Cặn khuẩn được hòa tan trong môi trường ½ MS lỏng có bổ sung acetosyringone (AS) với các nồng độ 50 µmol/l; 75 µmol/l; 100 µmol/l; 125 µmol/l; 150 µmol/l tạo dịch huyền phù vi khuẩn. Mẫu cây (mô lá) được cắt, tạo vết thương bởi dao cắt và được nhúng vào dịch khuẩn trong khoảng thời gian 5- 10- 15- 20-25 phút. Sau đó chuyển mẫu cây lên giấy thấm đã khử trùng, thấm khô và cấy lên môi trường MS cơ bản trong khoảng thời gian 1 - 2 - 3 ngày trong điều kiện tối.

2.2.3. Nghiên cứu xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime

Kết thúc giai đoạn đồng nuôi cấy, mẫu cây được chuyển sang môi trường diệt khuẩn MS cơ bản có bổ sung kháng sinh cefotaxime 350 mg/l; 400mg/l; 450 mg/l; 500 mg/l; 550 mg/l; 600 mg/l; 650 mg/l trong điều kiện tối. Xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime được đánh giá bằng các chỉ tiêu tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm, tỷ lệ mẫu sống sót và tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau 4 tuần nuôi cấy.

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

Phương pháp PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu của gen *rolC* (root locus C) để kiểm tra sự chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào thực vật [18] 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 [19]. DNA của rễ tơ được tách chiết bằng phương pháp CTAB theo Shanghai Maroof và cộng sự (1984) [20], điện di kiểm tra DNA tổng số trên gel agarose 0,8% và bằng quang phổ

hấp thụ ở bước sóng 260 nm. Cặp mồi khuếch đại đoạn gen *rolC* là *rolCF* (5'-ATGGCTGAAGACGACCTGTGT-3') và *rolCR* (5'-TTAGCCGATTGCAAACCTTGCA-3') [21]; cặp mồi cho gen *virD2* là *virDF* (5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAG-3') và *virDR* (5'-GACCCAAACATCTCGGCTG-3') [21]. Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích hỗn hợp là 25 µl gồm 1µl DNA tổng số (hay Ri plasmid), 2 µl dNTPs 2 mM, 1,25 µl DreamTaq DNA polymerase (1unit/µl), 10 pmol với mỗi mồi, 1,5 µl DreamTaq buffer và bổ sung nước cất vô trùng để đủ thể tích. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *rolC* là biến tính ban đầu ở 95°C trong 2 phút, 30 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây và 72°C trong 60 giây) và 10 phút kéo dài ở 72°C [22]. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *virD2* là biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút, 30 chu kỳ (94°C trong 60 giây, 62°C trong 30 giây và 72°C trong 60 giây) và 10 phút kéo dài ở 72°C. Sản phẩm khuếch đại PCR được phân tích và kiểm tra kích thước bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Gel sau đó sẽ được ngâm với dung dịch nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV.

2.2.5. 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 thô nhân sâm. Môi trường đặc là môi trường có chứa 8g agar/l, môi trường bán lỏng chứa 4g agar/l và môi trường lỏng không chứa agar nuôi lắc 90 vòng/phút ở 28 ± 2°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 [23]).

2.2.6. 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 150 mẫu. Các chỉ tiêu được theo dõi và đo đếm sau 2, 4, 6 tuần.

Các số liệu được xử lý trên máy vi tính bằng phần mềm Excel với trị số  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$  [24].

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây thổ nhân sâm

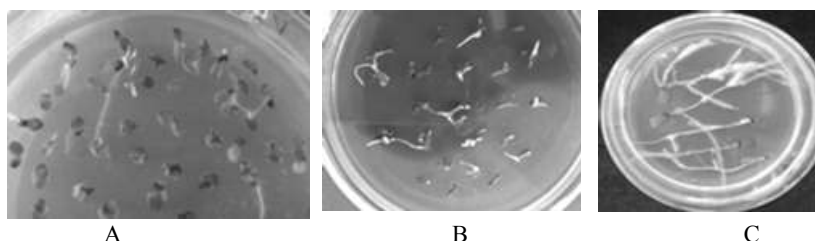
Sau 4 tuần lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* tại mật độ khuẩn tương ứng với giá trị  $OD_{600} = 0,6$ ; nồng độ AS 100  $\mu\text{mol/l}$ ; thời gian lây nhiễm 10 phút, thời gian đồng nuôi cấy

2 ngày, nồng độ cefotaxime diệt khuẩn 500 mg/l, kết quả khảo sát loại mô thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ được thể hiện qua bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, trong 3 loại mô khảo sát cho cảm ứng tạo rễ tơ thì mô lá cho tỷ lệ tạo rễ tơ cao nhất 65,9% (4 tuần tuổi), thấp nhất là đoạn thân mang mắt chồi bên cho tỷ lệ tạo rễ tơ là 55,6% (4 tuần tuổi). Đồng thời rễ tơ cũng sinh trưởng và phát triển tốt từ mô lá chuyển gen. Như vậy, mô lá của cây *in vitro* sau 4 - 6 tuần nuôi cấy là nguồn vật liệu thích hợp cho tạo rễ tơ ở cây thổ nhân sâm.

Bảng 1. Kết quả khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây thổ nhân sâm (n=150)

Loại mô	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ rễ tơ sinh trưởng phát triển tốt (%)
Lá mầm	58,2 ± 2,23	2,32 ± 0,23	1,82 ± 0,18	9,01 ± 1,78
Đoạn thân mang mắt chồi bên	55,6 ± 2,25	1,89 ± 0,19	1,59 ± 0,25	4,32 ± 2,10
Lá	65,9 ± 1,19	3,45 ± 0,25	3,25 ± 0,19	11,91 ± 1,15



Hình 1. Khảo sát vật liệu thích hợp đến khả năng tạo rễ tơ ở cây thổ nhân sâm sau 4 tuần biến nạp.

A: rễ tơ được cảm ứng từ lá mầm, B: rễ tơ được cảm ứng từ đoạn thân mang mắt chồi bên,

C: rễ tơ được cảm ứng từ mô lá.

#### 3.2. 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 thổ nhân sâm

Mật độ *A. rhizogenes* là một trong những thành tố có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ của thực vật. Để xác định được ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả biến nạp vào mô lá thổ nhân sâm sau 4-6 tuần nuôi cấy *in vitro*, tiến hành nhiễm khuẩn mẫu lá trong 10 phút, bổ sung AS 100  $\mu\text{mol/l}$  ở các mật độ vi khuẩn khác nhau để xác định mật độ tối

ưu. Kết quả ở bảng 2 cho thấy sự khác nhau về tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau khi mô lá thổ nhân sâm được nhiễm *A. rhizogenes* ở các mật độ khác nhau tương ứng với các giá trị  $OD_{600}$  là 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0. Tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tơ đạt cao nhất khi mật độ vi khuẩn ở giá trị  $OD_{600} = 0,6$  (65,9%). Ở mật độ vi khuẩn thấp hơn ( $OD_{600} = 0,2; 0,4$ ) hay cao hơn ( $OD_{600} = 0,8; 1,0$ ) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ thấp hơn. Do vậy, mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị  $OD_{600} = 0,6$  là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá thổ nhân sâm.

Bảng 2. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes*, nồng độ AS, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cây đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ mô lá thổ nhân sâm (n=150)

Ảnh hưởng của mật độ khuẩn		Ảnh hưởng của nồng độ AS		Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn		Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cây	
OD <sub>600</sub>	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Nồng độ AS (100 μmol/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Thời gian nhiễm khuẩn (phút)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Thời gian đồng nuôi cây (ngày)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)
0,2	23,42 ± 1,17	50	43,23 ± 1,17	5	45,23 ± 1,27	1	36,12 ± 2,17
0,4	34,56 ± 2,20	75	47,32 ± 2,19	10	65,9 ± 1,19	2	65,9 ± 1,19
0,6	65,9 ± 1,19	100	65,9 ± 1,19	15	40,07 ± 0,93	3	23,34 ± 1,66
0,8	43,24 ± 1,18	125	45,14 ± 1,21	20	34,12 ± 2,19	4	14,12 ± 1,95
1,0	29,43 ± 1,23	150	40,10 ± 2,28	25	12,51 ± 2,28	5	4,12 ± 1,30

AS là một loại phenol được tiết ra từ thực vật bị tổn thương, có tác dụng dẫn dụ vi khuẩn *A. rhizogenes* xâm nhập vào tế bào thực vật tại nơi tổn thương. Vì vậy AS được bổ sung vào môi trường lây nhiễm để nâng cao hiệu quả chuyển gen. Bảng 2 cho thấy bổ sung AS với các nồng độ khác nhau thì ảnh hưởng khác nhau đến tỷ lệ tạo rễ tơ ở mẫu lá mầm thổ nhân sâm. Tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tơ (65,9%) đạt cao nhất khi nồng độ AS 100μmol/l. Ở nồng độ AS thấp hơn (50μmol/l; 75 μmol/l) hay cao hơn (125μmol/l; 150μmol/l) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ thấp hơn. Do vậy, nồng độ AS 100μmol/l là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá thổ nhân sâm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu Manuhara và cộng sự (2015) [25].

Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm *A. rhizogenes* đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ ở cây thổ nhân sâm 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 (65,9%). Ở thời gian ngâm thấp hơn (5 phút) hay cao hơn (15-20-25 phút) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ thấp hơn, thời gian ngâm càng cao thì tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ càng thấp, có thể do thời gian ngâm lâu làm cho mẫu lá bị nát và hỏng.

Đồng nuôi cây là khoảng thời gian vi khuẩn đã bám 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. Bảng 2 cho thấy, ở các khoảng thời gian đồng nuôi cây khác nhau, tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là khác nhau. Thời gian đồng nuôi cây 2 ngày thu được tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ cao nhất (65,9%). Ở thời gian đồng nuôi cây 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 cây ngắn vi khuẩn xâm nhập vào ít nên quá trình biến nạp có thể không hoàn toàn, nhưng nếu thời gian đồng nuôi cây dài hiệu quả chuyển gen lại giảm do lượng vi khuẩn phát sinh lớn sẽ gây hại trực tiếp đến mô lá thổ nhân sâm.

### 3.3. 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 sinh trưởng của mô và tế bào. Tuy nhiên, một số tế bào thực vật dễ bị nhiễm và để ngăn chặn sự phát triển của các vi sinh vật này, cần thiết phải bổ sung kháng sinh. Trong nghiên cứu này, kháng sinh được sử dụng để diệt khuẩn sau khi biến nạp là cefotaxime. Cefotaxime là kháng sinh 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. Xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime

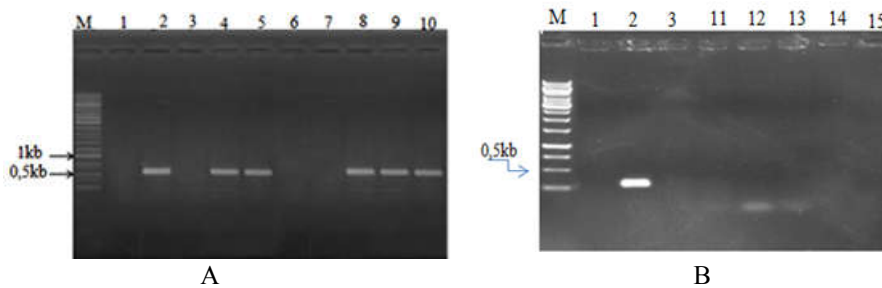
Nồng độ cefotaxime (mg/l)	Tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)
Sau 4 tuần			
0	0	100	70,1 ± 1,23
350	45,6 ± 1,33	100	68,6 ± 1,73
400	78,54 ± 1,56	100	66,23 ± 1,19
450	87,25 ± 1,42	100	66,01 ± 0,25
500	93,76 ± 0,98	100	65,9 ± 1,19
550	96,23 ± 1,43	100	49,23 ± 2,23
600	97,23 ± 1,55	100	45,12 ± 1,58
650	100	100	32,24 ± 1,67

Bảng 3 cho thấy, tăng nồng độ cefotaxime làm giảm khả năng nhiễm của quá trình biến nạp, cao nhất ở nồng độ 650 mg/l cho tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm là 100% và khi không bổ sung cefotaxime trong quá trình chuyển gen thì tỷ lệ nhiễm của các mẫu cấy là 100%. 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. Ở thí nghiệm không bổ sung cefotaxime thì tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cao nhất 70,1%, nhưng 100% mẫu bị nhiễm. Như vậy, nồng độ cefotaxime tối ưu diệt khuẩn là 500mg/l cho tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm là 93,76% và tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là 65,9%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Manuhara và cộng sự (2015) [25].

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

Sau khi tách chiết DNA của hệ gen rễ tơ thô nhân sâm, phản ứng PCR được thực hiện với

cặp môi *rolCF/rolCR* để khuếch đại vùng đặc hiệu 520 bp của gen *rolC* và cặp môi 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 môi 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.

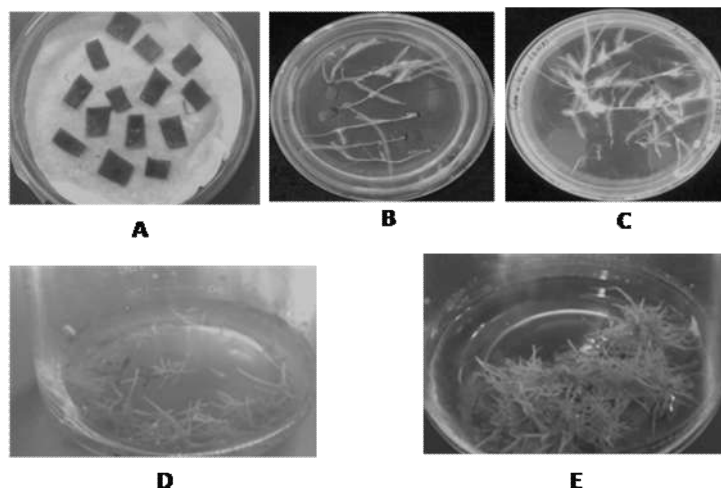


Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn gen *rolC* (A) và đoạn gen *virD2* (B). M: Thang chuẩn 1kb; 1. Đối chứng âm - nước; 2. Đối chứng dương - sản phẩm PCR của Ri plasmid; 3. Rễ không chuyển gen; Các giếng từ 4 đến 10 (A): sản phẩm PCR của 7 dòng rễ tơ thô nhân sâm. Các giếng từ 11 đến 15 (B): các dòng rễ tơ 4, 5, 8, 9, 10 mang gen *rolC*.

### 3.5. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ thảo nhân sâm

Trong ba trạng thái môi trường thử nghiệm gồm đặc, bán lỏng và lỏng thì rễ tơ trên môi trường lỏng nuôi cấy 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 7,47; 5,49 và 3,85 lần so với khối lượng rễ ban đầu sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 4). Như vậy môi trường lỏng nuôi cấy giúp rễ tơ thảo nhân sâm tăng trưởng tốt nhất. Hình ảnh thể hiện kết quả nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây thảo nhân sâm được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Hình ảnh cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ thảo nhân sâm. A- mô lá thảo nhân sâm; B- rễ tơ cảm ứng sau 4 tuần; C - nuôi cấy rễ tơ trên môi trường bán lỏng sau 2 tuần; D- nuôi cấy rễ tơ trong môi trường lỏng nuôi cấy sau 2 tuần; E - rễ tơ tăng trưởng sau 4 tuần.

Bảng 4. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ thảo nhân sâm

Trạng thái môi trường	Khối lượng rễ ban đầu (g)	Khối lượng rễ tươi sau 4 tuần (g)	Khối lượng rễ tăng (lần)	Khối lượng rễ khô (g)
Lỏng nuôi cấy	0,55	4,11 ± 0,23	7,47	0,34 ± 0,19
Bán lỏng	0,55	3,02 ± 0,17	5,49	0,23 ± 0,14
Đặc	0,55	2,12 ± 0,18	3,85	0,18 ± 0,13

## 4. Kết luận

Trong 3 loại vật liệu được nhiễm với *A. rhizogenes* (lá mầm, đoạn thân mang mắt chồi bên, mô lá) thì mô lá là vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây thảo nhân sâm. Mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị  $OD_{600} = 0,6$ ; nồng độ AS 100  $\mu\text{mol/l}$ ; thời gian nhiễm khuẩn 10 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày; nồng độ cefotaxime 500 mg/l là những điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá cây thảo nhân sâm. Môi trường MS ở trạng thái lỏng không bổ sung chất

điều hòa sinh trưởng, nuôi trong điều kiện lắc là thích hợp cho sự tăng trưởng rễ tơ ở cây thảo nhân sâm. 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 thảo nhân sâm.

## Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ một phần kinh phí của đề tài cấp Đại học Thái

Nguyễn (mã số ĐH2017-TN05-04) 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 ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

### Tài liệu tham khảo

- [1] Petprai D., Chanprasert C. and Chanvanij N. (1996), The herb in Thailand, War Veterans Organization of Thailand. *Bangkok, Thailand*.
- [2] Shimoda H., Nishida N., Ninomiya K., Matsuda H., Yoshikawa M. and Javaberine A., *New TNF-alpha and nitric oxide production inhibitor, from the roots of Talinum paniculatum*, Heterocycle, 55 (2001): 2043-2050.
- [3] Winarni D., Efek ekstrak akar ginseng Jawa dan Korea terhadap libido mencit jantan pada prakondisi testosteron rendah, Berkala Penelitian Hayati, 12(2) (2007): 153-159.
- [4] Afolabi O. B., Oloyede O. I., Antioxidant Properties of the Extracts of Talinum Triangulare and its Effect on Antioxidant enzymes in Tissue Homogenate of Swiss Albino Rat, Toxicol Int, 21(3) (2014): 307-313.
- [5] Gupta S. K., Liu R. B., Liaw S. Y., Chan H., Tsay H. S., Enhanced tanshinone production in hairy roots of "Salvia miltiorrhiza Bunge" under the influence of plant growth regulators in liquid culture, Botanical Studies, 52 (2011): 435-443.
- [6] Kai G., Xu H., Zhou C., Liao P., Xiao J., Luo X., You L., Zhang L., *Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in Salvia miltiorrhiza hairy root cultures*. Metabolic Engineering, 13(3) (2011): 319-327.
- [7] Zhao J., Zhou L. and Wu J., Promotion of Salvia miltiorrhiza hairy root growth and tanshinone production by polysaccharide - protein fractions of plant growth-promoting rhizobacterium Bacillus cereus, Process Biochemistry, 45 (2010): 1517-1522.
- [8] Mehrotra S., Kukreja A.K., Khanuja S.P.S., Mishra B.N., Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of Glycyrrhiza glabra in bioreactor, Elec J Biotechnol, 11(2) (2008): 1-7.
- [9] Yogananth N., Jothi Basu M., TLC method for determination of plumbagin in hairy root culture of Plumbago rosea L, Glob J Biotechnol Biochem, 4(1) (2009), pp. 66-69.
- [10] Majumdar S., Garai S., Jha S., 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, 30(5) (2011), pp. 941-954.
- [11] Thiruvengadam M., Praveen N., Kim E.H., Kim S.H., Chung I.M., Production of anthraquinones, phenolic compounds and biological activities from hairy root cultures of Polygonum multiflorum Thunb, Protoplasma, 251(3) (2014), pp. 555-566.
- [12] Thiruvengadam M., Praveen N., Maria John K.M., Yang Y.S., S Kim.H., Chung I.M., Establishment of Momordica charantia hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities, Plant Cell Tissue Organ Cult, 118(3) (2014), pp. 545-557.
- [13] Manuhara Y. S. W., Kristanti A. N., Utami E. S. W., Yachya A., Effect of Aeration and Inoculum Density on Biomass and Saponin Content of Talinum Paniculatum Gaertn. Hairy Roots in Balloon-Type Bubble Bioreactor, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Science, 2(4) (2012): 47-52.
- [14] Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium growth and biosynthesis with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, pp. 473-497.
- [15] Lièvre K., Hehn A., Tran T. L. M., Gravot A., Thomasset B., Bourgaud F., Gontier E., *Genetic transformation of the medicinal plant Ruta graveolens L. by an Agrobacterium tumefaciens - mediated method*. Plant Sci., 168(2005): 883-888.
- [16] Veena V., Taylor C. G., *Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications*, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 43 (2007): 383-403.
- [17] Kiana P., Khosro P., Taiebeh G., *Hairy root induction from Portulaca oleracea using Agrobacterium rhizogenes to Noradrenaline's production*, International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 3(3) (2012): 642-649.
- [18] Sinkar V. P., White F. F., Gordon M. P., *Molecular biology of Ri-plasmid*, J. Biosci. - Indian Acad.Sci., 11 (1987): 47-57.
- [19] Vanhala L., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K. M., Virulence of different Agrobacterium strains on hairy root formation of Hyoscyamus muticus, Plan Cell Rep., 14 (1995): 236-240.
- [20] Shaghai-Marooof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W., Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian



- inheritance, chromosomal location, and population dynamics, Proc Natl Acad Sci, 81 (1984): 8014-8019.
- [21] Diof M. F., Hehn A., Ptak A., Chrétien F., Doerper S., Gontier E., Bourgaud F., Henry M., Chapleur Y., Laurain-Mattar D., *Hairy root and tissue cultures of Leucojum aestivum L. - Relationships to galanthamine content*, Phytochem.Rev., 6 (2006): 137-141.
- [22] Thwe A., Arasu M. V., Li X., Park C. H., Kim S. J., Al-Dhabi N. A., Park S. U., Effect of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction and Phenylpropanoid Biosynthesis in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn), Front Microbiol, 7 (2016): 318.
- [23] Ge X., Wu J., Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag<sup>+</sup> and yeast elicitor, Plant Science, 168(2) (2005): 487-491.
- [24] Chu Hoàng Mậu, Phương pháp phân tích di truyền hiện đại trong chọn giống cây trồng (2008), NXB Đại học Thái Nguyên.
- [25] Manuhara Y. S. W., Kristanti A. N., Utami E. S. W., Yachya A., Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Volume 5, Issue 12 (2015): pp 1027-1032.

## Establishment of Hairy Root Lines in Vietnamese Fameflower Plant (*Talinum paniculatum*)

Vu Thi Nhu Trang<sup>1,2</sup>, Chu Hoang Mau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen University of Education, 20 Luong Ngoc Quyen, Thai Nguyen, Vietnam

<sup>2</sup>Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy,  
284 Luong Ngoc Quyen, Thai Nguyen, Vietnam

**Abstract:** Fameflower plant (*Talinum paniculatum* Gaertn.) contains flavonoid and saponins with antioxidant activities used in treatment of a number of symptoms and diseases such as inflammation, allergies, stomach ulcers,... However, the amount of flavonoid synthesized naturally in *Talinum paniculatum* plants is very low (about 0.897 mg/g fresh leaves). Therefore a method has been proposed for enhancing flavonoid content in *Talinum paniculatum* plants by applying tissue culture technique to produce the hairy roots to enhance biomass. This study showed the results of production/establishment of hairy root lines *in vitro* of *T. paniculatum* through *Agrobacterium rhizogenes*. Of the three types of materials that infect by *A. rhizogenes* (cotyledon, stem, leaf tissue), leaf tissue is a suitable material for transforming and inducing hairy roots. Density of bacteria corresponding to OD600 value=0.6; concentration AS 100 µmol/l; Infection time of 10 minutes; 2 days of co-culture; cefotaxime concentrations of 500 mg/l are suitable conditions for inducing hairy roots from leaf tissue. In state of the liquid MS medium without growth regulator, shaking culture conditions are suitable for hairy roots growth The 5 obtained hairy root lines were confirmed by the presence of *rolC* gene and absence of *virD2* gene through PCR.

**Keywords:** *Agrobacterium rhizogenes*, *Talinum paniculatum*, hairy roots.