

## CHUYÊN GEN TẠO RỄ TỜ SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.) QUA TRUNG GIAN VI KHUẨN *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

Hà Thị Mỹ Ngân<sup>1</sup>, Trịnh Thị Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Bá Nam<sup>1</sup>, Lê Kim Cương<sup>1</sup>, Nguyễn Phúc Huy<sup>1</sup>, Vũ Thị Hiền<sup>1</sup>, Vũ Quốc Luận<sup>1</sup>, Nguyễn Hồng Hoàng<sup>1</sup>, Ngô Thanh Tài<sup>1</sup>, Nguyễn Đình Trọng<sup>2</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2</sup>, Dương Tấn Nhật<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là loài dược liệu quý và đặc hữu cho một vùng sinh thái nhất định của Việt Nam. Trong nuôi cấy tạo sinh khối sâm, việc tồn dư các chất điều hòa sinh trưởng có thể gây ảnh hưởng đến tính an toàn của sản phẩm và sức khỏe người sử dụng. Nuôi cấy sinh khối từ rễ tơ bằng cách sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* kết hợp với kỹ thuật chuyển gen có thể khắc phục được vấn đề trên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *Agrobacterium* ( $OD_{600} = 0,3, 0,5, 0,7, 0,9$ ), thời gian lây nhiễm (10, 20, 30 phút và 16 giờ), nồng độ Acetosyringone (As) (50, 100, 150, 200 mM) và nguồn mẫu (lá, củ, cuống lá, cu, mô sẹo, rễ, phôi) đến hiệu quả chuyển gen. Kết quả cho thấy mật độ vi khuẩn  $OD_{600} = 0,5$  cho biểu hiện gen *Gus* tạm thời cao nhất (59%), thời gian lây nhiễm càng lâu thì hiệu quả chuyển gen càng cao tuy nhiên sức sống của mẫu cấy lại giảm, vì vậy 20 phút là thời gian nhiễm khuẩn phù hợp nhất, môi trường  $\frac{1}{2}$ SH bổ sung 100 mM Acetosyringone tỏ ra ưu việt hơn so với các môi trường còn lại, biểu hiện gen *Gus* đạt 61%, sự biểu hiện gen *Gus* ở các loại mẫu cấy khác nhau là khác nhau, mẫu mô sẹo có sự biểu hiện gen *Gus* cao hơn so với các vật liệu còn lại, mẫu rễ tơ ra là vật liệu không phù hợp trong nghiên cứu này. Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường chọn lọc đã được đầu ghi nhận được hiệu quả chuyển gen với sự hình thành rễ tơ từ mẫu mô sẹo, cu, phôi và củ, cuống lá

**Từ khóa:** Acetosyringone, *Agrobacterium rhizogenes*, chuyển gen, nhiễm khuẩn, rễ tơ, sâm Ngọc Linh

### MỞ ĐẦU

Ngành công nghệ sinh học với sự phát triển của công nghệ gen đã và đang tạo ra những bước đột phá do công nghệ này cho phép đưa các gen có lợi vào thực vật để tạo ra những cây trồng có tính trạng mà chúng ta mong muốn (Đức *et al.*, 2007). Nghiên cứu tạo giống bằng các phương pháp chuyển gen hiện đã thu được rất nhiều thành công ở các phòng thí nghiệm trên thế giới. Một số nghiên cứu về chuyển gen đã được triển khai nghiên cứu ở nước ta. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào một số đối tượng cây thực phẩm hoặc cây công nghiệp như: lúa, ngô, cà chua, bắp cải, đu đủ, bông vải... (Bình, 2005). Các nghiên cứu về chuyển gen trên đối tượng cây dược liệu vẫn còn hạn chế

Sâm Ngọc Linh có tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., thuộc chi *Panax*, họ *Araliaceae*, là một loại dược liệu quý không chỉ riêng đối với Việt Nam mà của cả thế giới. Sâm Ngọc Linh có hàm lượng saponin khá cao, đặc biệt là nhóm dammaran với các hợp chất saponin đại diện chính là MR<sub>1</sub>, G-Bb, và G-R<sub>2</sub>, (Luận, 2003) Theo

những nghiên cứu mới nhất các hợp chất saponin trong rễ củ sâm Ngọc Linh lên tới 52 loại (Đức *et al.*, 1997). Hàm lượng saponin tập trung nhiều và chủ yếu trong rễ củ sâm Ngọc Linh do đó hướng nuôi cấy tạo sinh khối rễ đang được quan tâm nghiên cứu. Trong quá trình nuôi cấy tạo sinh khối tế bào thực vật các chất điều hòa sinh trưởng thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm làm giảm hoặc mất tính biệt hóa ở các mô tế bào nuôi cấy. Việc làm này sẽ dẫn tới có sự tồn dư của các chất điều hòa sinh trưởng trong sinh khối tế bào nuôi cấy gây ảnh hưởng đến sức khỏe người sử dụng và tính an toàn của sản phẩm. Tuy nhiên, việc này có thể khắc phục được thông qua nuôi cấy sinh khối từ rễ tơ chuyển gen, bởi rễ tơ có khả năng sinh trưởng cao và đặc biệt có thể sinh trưởng, phát triển tốt trên môi trường không cần bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng. Chính vì vậy việc nghiên cứu tạo sinh khối rễ bằng kỹ thuật chuyển gen sẽ góp phần tạo ra nguồn vật liệu ban đầu phục vụ cho công tác nghiên cứu tiếp theo.

*Agrobacterium rhizogenes* là vi khuẩn đất gram

âm, mang Ri (root-inducing) plasmid gây bệnh rễ tơ ở thực vật hai lá mầm. Vùng T-DNA của Ri-plasmid chứa các loci mã hóa cho các gen *rolA*, *rolB* và *rolC*. Các gen này đóng vai trò quan trọng trong quá trình cảm ứng tạo rễ tơ ở mô tế bào thực vật (Bulgakov, 2008). Sự biểu hiện đồng thời của ba gen này gây nên kiểu hình rễ tơ ở mô tế bào thực vật bị xâm nhiễm. Các rễ tơ này có khả năng sinh trưởng và phát triển nhanh hơn rất nhiều so với rễ bình thường (Palazón *et al.*, 2003).

Trong nghiên cứu này bằng cách sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* kết hợp với kỹ thuật chuyển gen thực vật chúng tôi tập trung vào nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) với mục tiêu tạo nguồn vật liệu cho nuôi cấy bioreactor.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu thực vật

Nguồn mẫu thực vật được sử dụng trong thí nghiệm là các mẫu lá (0,5 × 0,5 cm), cuống lá (đài 1 cm), mẫu củ (0,5 cm × 0,5 cm × 1 mm), mô sẹo mẫu trắng sáng có kích thước khoảng 0,5 × 0,5 cm, mẫu rễ (1 cm) và phôi vô tình (1 phôi) của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Nguồn mẫu ban đầu được ổn định qua nhiều lần cấy chuyển hiện có tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên.

### Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 (Viện Dược học và Sinh học phân tử, trường Đại học Heidelberg, CHLB Đức) do phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp. Chủng *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 mang vector PTN289 mang gen chỉ thị là gen *Gus* để kiểm tra hiệu quả biến nạp và tối ưu hóa qui trình chuyển gen.

### Môi trường nuôi cấy

Môi trường YMB (Yeast Maltitol Broth) lỏng, đặc được sử dụng trong nuôi cấy khuẩn và dịch khuẩn sử dụng trong thí nghiệm biến nạp. Môi trường được điều chỉnh về pH = 7 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 117°C, 1 atm trong 15 phút.

Thí nghiệm biến nạp sử dụng môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972), bổ sung 30 g/l sucrose, 2,4 g/l gellan gum và môi trường 1/2SH lỏng. Môi

trường được điều chỉnh về pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 117°C, 1 atm trong 15 phút.

Tùy từng thí nghiệm mà bổ sung Acetosyringone (As) ở các nồng độ khác nhau, thời gian nuôi cấy, điều kiện chiếu sáng và nhiệt độ cũng khác nhau theo từng thí nghiệm.

## Phương pháp

### Thiết kế thí nghiệm

Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn, cấy vạch *A. rhizogenes* ATCC15834 mang vector PTN289 lên môi trường YMB đặc có bổ sung 100 mg/l Spectinomycin, nuôi ở 28°C trong 36 - 48 giờ. Sau đó lấy một đến ba khuẩn lạc nuôi trong 20 ml môi trường YMB lỏng có bổ sung 100 mg/l Spectinomycin, lắc ở 220 vòng/phút, 28°C trong 16 - 18 giờ. Tiếp tục chuyển 10 ml dung dịch vi khuẩn trên sang bình tam giác 250 ml có bổ sung 40 ml YMB lỏng có bổ sung Spectinomycin 100 mg/l, lắc ở 220 vòng/phút, 28°C trong 3 - 5 giờ. Ly tâm dịch vi khuẩn 6300 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn, sau đó hòa tan với môi trường 1/2SH, pha loãng cho tới OD<sub>600</sub> 0,3 - 0,9.

### Khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *Agrobacterium* tới hiệu quả chuyển gen

Các mẫu mô sẹo, mẫu rễ, mảnh lá, cuống lá, lá cắt củ và phôi được cắt với kích thước như trên được chuyển vào đĩa petri ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn trong 20 - 30 phút ở nhiệt độ phòng với các nồng độ OD<sub>600</sub> = 0,3; 0,5; 0,7; 0,9. Sau đó chuyển các mảnh cấy trên lên giấy thấm khử trùng, thấm cho hết nước rồi chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy SH, mẫu được giữ trong tối ở nhiệt độ 28°C, trong 2 ngày. Biểu hiện tạm thời của gen *Gus* biến nạp vào trong tế bào được đánh giá theo phương pháp nhuộm tế bào học của Jefferson (Jefferson, 1987). Các mảnh cấy sau 2 ngày nuôi cộng sinh được nhuộm với dung dịch 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-galuc), để 8 - 12 giờ trong tối ở nhiệt độ 37°C. Sau đó rửa ba lần bằng cồn 70% và quan sát dưới kính hiển vi. Những vùng có gen *Gus* nhuộm màu xanh lam.

Mục đích của thí nghiệm là tìm ra mật độ vi khuẩn *Agrobacterium* thích hợp nhất cho hiệu quả chuyển gen.

### Khảo sát ảnh hưởng của thời gian biến nạp đến hiệu quả chuyển gen

Các mẫu mô sẹo, mẫu rễ, mảnh lá, cuống lá, lá

cát cú và phối được cất với kích thước thích hợp, sau đó được chuyển vào đĩa petri có chứa dịch huyền phù vi khuẩn với OD<sub>600</sub> tối nhất ở thí nghiệm trên trong 10, 20, 30 phút và 16 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau 2 ngày đồng nuôi cấy, mẫu được nhuộm theo phương pháp nhuộm của Jefferson. Sau đó tiến hành quan sát biểu hiện tạm thời của gen *Gus*.

Mục đích của thí nghiệm là tìm ra thời gian lấy nhiễm cho hiệu quả biến nạp cao nhất.

#### Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Acetosyringone đến hiệu quả chuyển gen

Mẫu được chuyển vào đĩa petri có chứa dịch huyền phù vi khuẩn với OD<sub>600</sub> và thời gian lấy nhiễm tối nhất từ hai thí nghiệm trên. Môi trường lấy nhiễm được sử dụng là môi trường 1/2SH có bổ sung Acetosyringone với các nồng độ 50, 100, 150, 200 mM. Sau đó tiến hành quan sát biểu hiện tạm thời của gen *Gus*.

Mục đích của thí nghiệm là tìm ra nồng độ Acetosyringone cho hiệu quả chuyển gen cao nhất

#### Khảo sát ảnh hưởng của nguồn mẫu đến hiệu quả chuyển gen

Các mẫu mô sẹ, mẫu rễ, mảnh lá, cuống lá, lát cắt củ và phối sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* được biến nạp với chủng vi khuẩn ATCC:15834 mang vector PTN289 với các giá trị OD<sub>600</sub>, thời gian lấy nhiễm và môi trường lấy nhiễm đã được tối ưu ở trên. Bằng khảo nghiệm *Gus* để xác định mẫu cây cho hiệu quả biểu hiện tạm thời gen *Gus* cao nhất

#### Bước đầu thu nhận kết quả chuyển gen cho sự hình thành rễ tơ

Mẫu được chuyển gen theo qui trình đã được tối ưu như trên. Chuyển các mẫu cây ra giấy thấm để loại bỏ nước dư và cấy vào môi trường chọn lọc SH có bổ sung Cefotaxime 500 mg/l. Theo dõi và cấy chuyển 15 ngày/lần trên cùng môi trường để khảo sát

tỷ lệ hình thành và chọn lọc các dòng rễ tơ

#### Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được tiến hành trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ phòng 25 ± 2°C, chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 45 μmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, độ ẩm trung bình 55 - 60%. Một số thí nghiệm tiến hành trong điều kiện tối, hoặc trong tủ lạnh ở 220 vòng/phút ở 28°C.

#### Xử lý số liệu

Các chi tiêu theo dõi số mẫu biểu hiện màu gen *Gus*/tổng số mẫu thí nghiệm nhuộm X-gluc. diện tích biểu hiện gen *Gus* trung bình/mẫu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 mẫu (6 loại mẫu). Sau khi nhuộm với X-gluc, tiến hành lấy mẫu diệp lục 2 - 3 lần bằng cồn 70% và ghi nhận số liệu, dựa vào diện tích vùng xanh lam quan sát được trên mẫu cây ghi nhận diện tích biểu hiện gen *Gus* trung bình (% diện tích nhuộm màu gen *Gus*/mẫu). Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *Agrobacterium* tới hiệu quả chuyển gen

Mật độ tế bào vi khuẩn được xác định bởi giá trị quang phổ OD ở bước sóng 600 nm của dịch lỏng vi khuẩn (sinh khối tế bào hay số lượng tế bào trong một thể tích nhất định). Trong nghiên cứu chuyển gen, việc xác định mật độ vi khuẩn phù hợp, vi khuẩn sinh trưởng tối có ý nghĩa quan trọng để đạt hiệu quả chuyển gen cao. Để xác định OD<sub>600</sub> phù hợp chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm nhiễm khuẩn mẫu mô sâm Ngọc Linh trong môi trường huyền phù vi khuẩn với OD<sub>600</sub> dao động từ 0,3 đến 0,9 (Bảng 1).

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn *Agrobacterium* tới hiệu quả chuyển gen

OD <sub>600</sub>	Tỷ lệ mẫu cho biểu hiện gen <i>Gus</i> * (%)
0 (DC)	0
0,3	25 (23/90)
0,5	61 (54/90)
0,7	35 (32/90)
0,9	30 (27/90)

\*Số mẫu biểu hiện màu *Gus*/tổng số mẫu thí nghiệm nhuộm X-gluc

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy mật độ vi khuẩn có ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ biểu hiện tạm thời gen *Gus*. Với thời gian nhiễm khuẩn là 20 phút, tỷ lệ biểu hiện tạm thời *Gus* ở mẫu mô sảm Ngọc Linh dao động từ 25% tới 61%, cao nhất ở  $OD_{600} = 0,5$  và thấp nhất ở  $OD_{600} = 0,3$  (Bảng 1). Qua kết quả thí nghiệm, giá trị  $OD_{600} = 0,5$  được dùng cho các thí nghiệm chuyển gen tạo rễ tơ sảm Ngọc Linh tiếp theo. Mật độ vi khuẩn ảnh hưởng đến khả năng chuyển gen vào tế bào thực vật. Mật độ vi khuẩn phù hợp phụ thuộc vào từng loại thực vật cũng như từng chủng vi khuẩn sử dụng. Kết luận này được khẳng định qua nghiên cứu của Wahyu và đồng tác giả (2012) khi sử dụng chung khuẩn *A. rhizogenes* ATCC15834 cảm ứng tạo rễ tơ trên loài *Lycopersicon esculentum* Mill ở giá trị  $OD_{600} = 0,5$  cho tỷ lệ tạo rễ dao động từ 33 đến 59% và bảo cáo của Shi và Kintizios (2003) cho kết quả lên đến 70% khi  $OD_{600} = 1$  ở loài *Pueraria phaseoloides*.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn tới khả năng chuyển gen

Thời gian	Tổng số mẫu	<i>Gus</i> <sup>+</sup> (%)*
0	90	0
10 phút	90	35 (31/90)
20 phút	90	42 (38/90)
30 phút	90	52 (47/90)
16 giờ	90	65 (58/90)

\*Số mẫu biểu hiện màu *Gus*/tổng số mẫu thí nghiệm nhuộm X-gluc

Khi thời gian lây nhiễm tăng dần từ 10 - 30 phút và 16 giờ, tỷ lệ biểu hiện tạm thời gen *Gus* cũng tăng dần tỷ lệ thuận với thời gian nhiễm khuẩn (Bảng 2). Tuy nhiên, thời gian nhiễm khuẩn dài lại ảnh hưởng tới sức sống và khả năng sống sót của mẫu thí nghiệm (dữ liệu chưa công bố). Do vậy, chúng tôi chọn thời gian lây nhiễm phù hợp là 20 phút cho các thí nghiệm tiếp theo. Nghiên cứu của Tao và Li (2006) trên đối tượng *Torenia foenieri* L. cũng cho thấy rằng 20 phút là thời gian lây nhiễm cho hiệu quả chuyển gen cũng như tỷ lệ sống sót của mẫu trên

## Ảnh hưởng của thời gian biến nạp đến hiệu quả chuyển gen

Hiệu quả biến nạp gen thông qua *Agrobacterium* ở thực vật phụ thuộc vào một số yếu tố như tiền xử lý mô thực vật, nguồn vật liệu gây nhiễm, nồng độ vi khuẩn và thời gian lây nhiễm. Thời gian nhiễm khuẩn là yếu tố quan trọng ảnh hưởng lớn đến khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn, khả năng sống sót cũng như khả năng tái sinh của cây. Khi thời gian biến nạp kéo dài thì gây ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sống và phát triển của mô thực vật. Số lượng vi khuẩn xâm nhập vào mẫu biến nạp sẽ gây ảnh hưởng đến khả năng diệt khuẩn sau này cũng như sự phát triển của vi khuẩn trên môi trường đồng nuôi cây. Ngược lại, khi thời gian biến nạp ngắn nồng độ vi khuẩn xâm nhập vào mẫu biến nạp sẽ thấp dẫn đến tỷ lệ chuyển gen thấp (Bảng 2)

môi trường đồng nuôi cây đạt cao nhất khi lây nhiễm mẫu với *A. rhizogenes*.

## Ảnh hưởng của nồng độ Acetosyringone đến hiệu quả chuyển gen

Mẫu cây được lây nhiễm với dịch huyền phù tế bào vi khuẩn trong môi trường 1/2SH có bổ sung Acetosyringone ở các nồng độ khác nhau. Sau thời gian nuôi cây tiến hành quan sát biểu hiện tam thời gen *Gus*. Kết quả được trình bày trong bảng 3

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nồng độ Acetosyringone tới hiệu quả chuyển gen

Nồng độ Acetosyringone	<i>Gus</i> <sup>+</sup> (%)*
1/2SH + 0 mM As	38 (34/90)
1/2SH + 50 mM As	47 (42/90)
1/2SH + 100 mM As	59 (53/90)
1/2SH + 150 mM As	41 (37/90)
1/2SH + 200 mM As	37 (33/90)

\*Số mẫu biểu hiện màu *Gus*/tổng số mẫu thí nghiệm nhuộm X-gluc

Thành phần môi trường nhiễm khuẩn là một yếu tố có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả của quá trình biến nạp. Môi trường phải vừa đảm bảo sức sống cho vi khuẩn và cả cho mẫu thực vật, vừa phải đảm bảo pH, vừa phải bổ sung dinh dưỡng để không gây sốc cho vi khuẩn và mẫu. Nhặt và đồng tác giả (2010) đã báo cáo môi trường SH bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng tùy theo mục đích thí nghiệm là môi trường tối ưu nhất cho hiệu quả cao trong nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh. Bên cạnh đó một số nghiên cứu cũng cho thấy môi trường nhiễm khuẩn trong chuyển gen ở đối tượng sâm đưa trên cơ sở là môi trường cơ bản SH. Tuy nhiên để đảm bảo sức sống cho mẫu và khuẩn chúng tôi sử dụng môi trường ½SH với các thành phần đa lượng, vi lượng và vitamin được giảm đi một nửa, sử dụng nguồn cacbon là đường glucose (Chung *et al.*, 2003). Acetosyringone được biết đến như là chất dẫn dụ vi khuẩn, giúp tăng hiệu quả cho quá trình biến nạp cũng được bổ sung vào môi trường lấy nhiễm. As có bản chất phenolic, có tác dụng làm lạnh vết thương vừa là chất dẫn dụ vi khuẩn xâm nhập, lại có vai trò như một chất kích hoạt vùng gen vir thuộc Ti-plasmid kích thích cho sự cắt đoạn T-ADN (tại vùng

bờ trái và bờ phải) để gắn vào genom thực vật. Sự có mặt của As giúp nâng cao hiệu quả biến nạp (từ 38% đến 59%) Trong thí nghiệm này kết quả cho thấy trên môi trường lấy nhiễm ½SH bổ sung 100 mM Acetosyringone cho hiệu quả biểu hiện gen *Gus* tạm thời cao hơn (59%) so với môi trường lấy nhiễm có bổ sung 50, 150 và 200 mM Acetosyringone (Bảng 3) Acetosyringone thúc đẩy quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn tuy nhiên khi sử dụng ở nồng độ cao lại làm giảm hiệu quả biến nạp. Vì vậy, chúng tôi chọn môi trường lấy nhiễm khuẩn là môi trường ½SH có bổ sung 100 mM As cho các thí nghiệm cảm ứng tạo rễ tơ ở sâm Ngọc Linh.

### Ảnh hưởng của nguồn mẫu đến hiệu quả chuyển gen

Mẫu lá, cuống lá, mô sẹo, phôi, rễ và lát cắt cu được sử dụng làm vật liệu nhận gen chuyển. Các mẫu này được biến nạp với chủng vi khuẩn ATCC 15834 có mang vector biểu hiện gen *Gus* PTN 289 trong thời gian 20 phút với giá trị  $OD_{600} = 0.5$  trên môi trường ½SH bổ sung 100 mM Acetosyringone. Kết quả được ghi nhận ở bảng 4

**Bảng 4** Ảnh hưởng của nguồn mẫu đến hiệu quả chuyển gen

Nguồn mẫu	<i>Gus</i> (%)*	Diện tích biểu hiện gen <i>Gus</i> (trung bình (% diện tích mẫu))	Mô tả
Củ	33.33 (5/15)	10%	Màu xanh lam xuất hiện ở phần rìa củ
Mô sẹo	86.67 (13/15)	70%	Màu xanh bao trùm gần như cả khối mô sẹo
Phôi	60 (9/15)	70 - 80%	Cả mẫu phôi bắt màu thuốc nhuộm
Cuống lá	46.67 (8/15)	10%	Màu xanh lam đa số xuất hiện ở 2 đầu cuống lá, vi tri lớn thương do cắt mẫu
Rễ	26.67 (4/15)	5 - 10%	Màu xanh lam chỉ xuất hiện một ít ở đỉnh rễ
Lá	40 (6/15)	40%	Gân lá và rìa lá có biểu hiện tạm thời của gen <i>Gus</i>

\*Số mẫu biểu hiện màu *Gus*/tổng số mẫu thí nghiệm nhuộm X-gluc

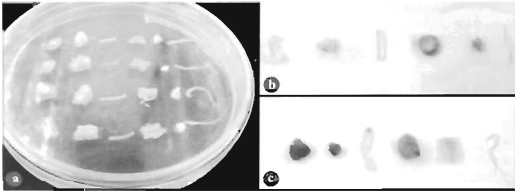
Khi khảo sát vật liệu chuyển gen, chúng tôi nhận thấy sự biểu hiện tạm thời gen *Gus* ở các loại mẫu mô là khác nhau (Hình 1a, b, c). Các mẫu mô sẹo có sự biểu hiện gen *Gus* cao hơn so với các vật liệu chuyển gen còn lại. Tỷ lệ vùng xanh lam ở mô rễ là thấp nhất (26.67%). Mẫu phôi và mẫu mô sẹo đều cho hiệu quả biểu hiện gen *Gus* cao (86% và 60%, tương ứng) (Bảng 4) hứa hẹn là nguồn vật liệu triển vọng cho nghiên cứu chuyển gen sâm Ngọc Linh. Theo nghiên cứu của Britton và Escobar (2008), gen *roffB* là một trong những gen đồng vai trò quan trọng nhất trong quá trình cảm ứng tạo rễ tơ và kiểu hình

rễ tơ ở thực vật lại được cảm ứng bởi auxin. Do vậy, khi sử dụng vật liệu chuyển gen là mô sẹo, hàm lượng auxin vẫn được tích lũy trong mô sẹo nên khả năng tạo rễ tơ là cao hơn so với nguồn vật liệu chuyển gen là mảnh lá, cuống lá, củ, rễ và phôi

Hiệu quả chuyển gen phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, các loài khác nhau cho hiệu quả chuyển gen không giống nhau. Nguồn vật liệu sử dụng cho chuyển gen tạo rễ tơ trên đối tượng sâm cũng khác nhau. Yang và Choi (1999) đã sử dụng các mẫu rễ của *P. ginseng* C. A. Meyer làm vật liệu chuyển gen trên môi trường MS cơ bản. Mỗi báo cáo khác lại

cho thấy mẫu lá mầm và cuống lá của *P. ginseng* C. A. Meyer cv. Chungpung lại là vật liệu thích hợp cho quá trình chuyển gen (Chung *et al.*, 2003) Choi và đồng tác giả (2002) nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ trên đối tượng *P. ginseng* C. A. Meyer đã sử dụng mô sẹo là nguồn vật liệu nhân gen cam ứng tạo rễ tơ

Năm 2008, báo cáo của Han và Choi về nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ trên *P. ginseng* C. A. Meyer đã cho thấy rằng mẫu rễ cũng là vật liệu tiềm năng cho hiệu quả biến nạp cao và đã thu nhận được cây tái sinh từ phôi soma thông qua nuôi cấy đoạn rễ mang gen cam ứng tạo rễ tơ.

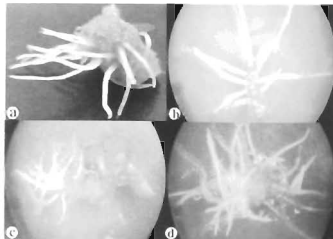


Hình 1. Sâm Ngọc Linh trước và sau khi chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. a, b. Nguồn mẫu ban đầu trước khi chuyển gen, c. Biểu hiện gen *Gus* trên các nguồn mẫu sau khi chuyển gen (từ trái sang phải: mô sẹo, phôi, cuống lá, củ, lá)

#### Bước đầu thu nhận kết quả chuyển gen cho sự hình thành rễ tơ

Các nguồn mẫu khác nhau cho hiệu quả chuyển gen và hình thành rễ tơ không giống nhau, vì vậy cần phải theo dõi khả năng hình thành rễ tơ (rễ chuyển gen) của mẫu lá, cuống lá, củ, mô sẹo, phôi và rễ sau 8 tuần trên môi trường chọn lọc. Sau 8 tuần trên môi trường chọn lọc, đã bước đầu thu nhận được những kết quả chuyển gen. Trên 6 loại mẫu khảo sát có 4 loại mẫu (mô sẹo, củ, phôi, cuống lá) cho hiệu quả chuyển gen với biểu hiện

là sự hình thành rễ tơ trên môi trường hoàn toàn không có chất điều hòa sinh trưởng. Khả năng hình thành rễ tơ mẫu mô sẹo chuyển gen cao hơn so với mẫu phôi, củ hay cuống lá. Trung bình từ 1 mẫu mô sẹo đã được chuyển gen hình thành từ 10 đến 15 rễ, rễ mập mạp, khỏe mạnh, trên rễ cũng có nhiều lông hút (Hình 2a). Tách những rễ chuyển gen thu được ra khỏi mẫu cây ban đầu, sau đó chúng tôi đã tiến hành nhân nhanh và chọn lọc một số dòng rễ tơ trên môi trường SH không bổ sung chất điều hòa (Hình 2b, c, d).



Hình 2. Bước đầu thu nhận kết quả chuyển gen. a. Rễ chuyển gen thu được trên mẫu mô sẹo lây nhiễm với *A. rhizogenes* ATCC15834. b, c, d. Nhân nhanh và chọn lọc một số dòng rễ tơ.

## KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu cho thấy việc lựa chọn nguồn mẫu, mật độ vi khuẩn lây nhiễm, thời gian và môi trường lây nhiễm thích hợp trong quá trình biến nạp là điều cần phải quan tâm trong quá trình chuyển gen tạo rễ tơ trên đôi tượng cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Hiệu quả chuyển gen đạt cao nhất khi mẫu được lây nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn có giá trị  $OD_{600} = 0.5$ , với thời gian lây nhiễm là 20 phút, thêm vào đó bổ sung 100 mM Acetosyringone vào môi trường lây nhiễm cũng làm gia tăng hiệu quả chuyển gen. Mô sẹo dưới các điều kiện tối ưu cho biểu hiện gen *Gus* là cao nhất. Kết quả cũng chỉ ra rằng mẫu rễ đường như không thích hợp cho chuyển gen tạo rễ tơ trên sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Mẫu mô sẹo, mẫu củ, mẫu phôi và cuống lá sau 6 đến 8 tuần nuôi cấy trên môi trường chọn lọc hoàn toàn không có mặt các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đã hình thành rễ tơ chuyển gen. Mẫu mô sẹo तो ra là vật liệu thích hợp trong chuyển gen tạo rễ tơ ở sâm Ngọc Linh. Bước đầu tiên hành nhân nhanh và chọn lọc được một số dòng rễ tơ.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin chân thành cảm ơn: Đề tài cấp Nhà nước "Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv)" và Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Trần Bình (2005) Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen để tạo cây chuyển gen năng cao sức chống chịu đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi. *Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật* 9-15.

Britton MT, Escobar MA (2008) *The oncogenes of Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes*. In Tzfira T, Citovsky V, eds *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. New York, Springer 524-565.

Bulgakov VP (2008) Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biochem Adv* 26: 318-324

Choi YE, Jeong JH, In JK, Yang DC (2002) Production of herbicide-resistant transgenic *Panax ginseng* through the introduction of the phosphinotransferase acetyl transferase gene and successful soil transfer. *Plant Cell Rep* 21: 563-568.

Chung JH, Cho IS, Kim HJ, In DS, Hup CG, Song JS, Woo SS, Choi WD, Liu JR (2003) Changes in gene expression during hairy root formation by *Agrobacterium*

*rhizogenes* infection in ginseng. *J Plant Biol* 46(3): 187-198

Duc NM, Kasai R, Ohtani K, Ito A, Yamasaki K, Nguyen TN, Tanaka O (1997) New saponins from Vietnamese ginseng: highlights on biogenesis of dammarane triterpenoids. *Adv Exp Med Biol* 404: 129-149

Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hồ, Nguyễn Văn Uyên (2007) Cấu trúc vector plasmid mang gen kháng sâu và ứng dụng trong tạo cây trồng chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Báo cáo hội nghị khoa học và công nghệ*, 345-350

Han JY, Choi YE (2008) Rapid induction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic roots directly from adventitious roots in *Panax ginseng*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 96: 143-149

Jefferson RA (1987) *Gus fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. *EMBO J* 16: 2901-2907.

Trần Công Luận (2003) Kết quả nghiên cứu về hoa học sâm Việt Nam. *Hồi thảo báo cáo và phát triển sâm Ngọc Linh tại tỉnh Quảng Nam*: 62-75.

Dương Tấn Nhứt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trục, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tinh, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thủy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, Nguyễn Thành Hải (2010) Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv). *Tap chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1211-1219

Palazón J, Mallol A, Eribi R, Lettenbauer C, Cusidó RM, Priol MT (2003) Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor. *Planta Med* 69(4): 344-349

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.

Shi HP, Kimizios S (2003) Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Rep* 21(11): 1103-1107.

Tao J, Li L (2006) Genetic transformation of *Torenia foeniculifera* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *S Afr J Bot* 72(2): 211-216.

Yang DC, Choi YE (1999) Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 19: 491-496

Wahyu W, Ratna P, Estri LA, Edi PU, Tatik W (2012) Genetic transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with *Agrobacterium rhizogenes* and production of lycopene in transformed root culture. *J Int Biotech Res* 3(9): 158-165

## AGROBACTERIUM RHIZOGENES - MEDIATED HAIRY ROOTS FORMATION OF NGOC LINH GINSENG (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.)

Hà Thị Mỹ Ngân<sup>1,\*</sup>, Trình Thu Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Ba Nam<sup>1</sup>, Lê Kim Cường<sup>1</sup>, Nguyễn Phúc Huy<sup>1</sup>, Vũ Thị Hiền<sup>1</sup>, Vũ Quốc Luan<sup>1</sup>, Nguyễn Hồng Hoàng<sup>1</sup>, Ngô Thanh Tài<sup>1</sup>, Nguyễn Đình Trọng<sup>1</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2</sup>, Duong Tan Nhut<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tax Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology,

<sup>2</sup>Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology.

### SUMMARY

Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grishv.), an endemic medicinal plant of Vietnam, is restricted to a certain ecological area. In cell culture for biomass of ginseng production, the residual growth regulators might affect the safety of products and the health of users. Hairy roots that derive from using the *in vitro* techniques in combination with gene transfer techniques can resolve these problems. In this study, we investigated the effects of *Agrobacterium* concentrations (OD<sub>500</sub> = 0.3, 0.5, 0.7, 0.9), infection times (10, 20, 30 minutes and 16 hours), Acetosyringone concentrations (50, 100, 150 and 200 nM) and explant sources (leaves, stems, roots, callus, roots and embryos) to efficiency of gene transfer. Bacterial concentration for treatment with OD<sub>500</sub> of 0.5 showed the highest temporary expression of *Gus* (59%) with longer infection time, the efficiency of gene transfer was higher but the vitality of transgenic explants was decreased, the duration of 20 mins was suitable for infection. Acetosyringone concentration of 100 nM was found to be better than others (*Gus* expression level was 61%). *Gus* expression in various sources of explants was different, the highest level was found in callus while root explants were unsuitable for this study. Root samples proved unsuitable material in this study. After 8 weeks of culture on selective medium, we were recorded initially effective gene transfer with the formation of hairy roots from callus, thin cell layers of rhizome, somatic embryo and stems.

**Keywords:** *Acetosyringone*, *Agrobacterium rhizogenes*, transformation, infection, root hairs, Ngoc Linh ginseng

\* Author for correspondence: Tel: +84-63-3831056; Fax: +84-63-3831028; E-mail: [duongtannhut@gmail.com](mailto:duongtannhut@gmail.com)