

NGHIÊN CỨU TẠO VECTOR CHUYỂN GEN MANG CÁC CẤU TRÚC GEN *rol* TĂNG CƯỜNG CẢM ỨNG TẠO RỄ TỜ Ở THỰC VẬT CHUYỂN GEN

Lê Thu Ngọc^{1*}, Trần Thu Trang¹, Phạm Bích Ngọc¹, Chu Hoàng Hà¹, Dương Tấn Nhựt¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *le_thu_ngoc@yahoo.com

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Nuôi cấy rễ tơ, loại rễ hình thành do sự xâm nhiễm của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* vào mô thực vật bị tổn thương từ lâu đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu như phân tích chức năng của gen, biểu hiện protein ngoại lai, sản xuất các hợp chất thứ cấp hay biến đổi thành phần các chất chuyển hóa ở thực vật. Nguyên nhân của sự hình thành rễ tơ được xác định có liên quan đến vùng TL-DNA nằm trên plasmid Ri của các chủng *A. rhizogenes*, trong đó giữ vai trò quan trọng là 4 locus gen *rolA*, *B*, *C* và *D* (root locus). Tuy nhiên, việc biểu hiện đơn lẻ hay liên kết của các gen *rol* này có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất hình thành rễ tơ cũng như sự phát triển và hình thái của rễ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập, đánh giá và lựa chọn các cấu trúc chuyển gen *rol* đem lại hiệu quả cao trong việc chuyển gen tạo rễ tơ ở thực vật. Các gen *rolB*, *rolC* riêng biệt và tổ hợp *rolABC* liên kết được khuếch đại từ khuôn DNA là plasmid Ri tách chiết từ chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 nhờ phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế thêm trình tự nhận biết của enzyme hạn chế. Hai gen *rolB*, *rolC* và đoạn đa gen *rolABC* sau đó được nối ghép vào vector pBI121 và pCB301, theo thứ tự tương ứng, tạo thành các vector tái tổ hợp và được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* C58/PGV 2260. Kết quả chuyển gen tạo rễ tơ ở lá thuốc lá thông qua các chủng *Agrobacterium* mang 3 cấu trúc gen *rol* cho thấy, sự biểu hiện và tương tác đồng thời của các gen *rolA*, *B*, *C* cho hiệu suất cảm ứng tạo rễ tơ ở các mô chuyển gen cao nhất (hơn 60%), hình thái rễ mang đầy đủ các đặc điểm điển hình cho rễ tơ. Ở các mô chuyển gen *rolB* đơn lẻ, hiệu suất hình thành rễ tơ chỉ đạt khoảng 20%, đồng thời tốc độ phát triển và mức độ phân nhánh của loại rễ này cũng thấp hơn. Trong khi đó, hoạt động đơn lẻ của gen *rolC* hầu như không gây ra hiện tượng biểu hiện kiểu hình rễ tơ.

Từ khóa: *Agrobacterium*, *rolA*, *rolB*, *rolC*, rễ tơ, vector chuyển gen

MỞ ĐẦU

Ở đa số các họ thực vật, rễ là nơi tổng hợp và tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp chính bao gồm các alkaloid, polyacetylen, sesquiterpen và naphthoquinon. Những hợp chất này có thể được tổng hợp theo cách tương tự trong rễ tơ [24]. Rễ tơ là một bệnh ở thực vật gây ra bởi quá trình tương tác giữa vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, một loại vi khuẩn đất gram âm, với tế bào vật chủ. Giống như vi khuẩn *A. tumefaciens* mang plasmid Ti, *A. rhizogenes* mang plasmid Ri (root-inducing) được xác định là tác nhân gây bệnh rễ tơ ở các mô tế bào thực vật bị xâm nhiễm [11, 34]. Khi bị tổn thương, tế bào thực vật tiết ra các polyphenol hấp dẫn các vi khuẩn, tại đây chúng chuyển một đoạn T-DNA (transfer DNA) từ plasmid Ri vào hệ gen của tế bào vật chủ. Nhìn chung, cơ chế quá trình xâm nhiễm và cơ chế phân tử của quá trình vận chuyển T-DNA vào tế bào vật chủ của hai vi khuẩn này được chứng

minh là tương tự nhau [22]. Tuy nhiên, sự hình thành khối u ở vi khuẩn *A. tumefaciens* do gen mã hóa sinh tổng hợp auxin quy định, trong khi đó, các gen mã hóa sinh tổng hợp auxin ở vi khuẩn *A. rhizogenes* có vai trò rất nhỏ trong quá trình hình thành rễ tơ ở thực vật [9, 22].

Plasmid Ri là phân tử DNA mạch vòng, sợi kép có trọng lượng phân tử lớn từ 200-800 kb gồm 2 vùng chính là T-DNA và vir (virulence). T-DNA ở plasmid Ri của nhóm agropine bao gồm 2 vùng chính là vùng biên trái TL-DNA và biên phải TR-DNA. Hai vùng này đều có kích thước khoảng 15-20 kb và được xen kẽ bởi 1 đoạn DNA, đoạn này không được chuyển vào hệ gen của tế bào vật chủ. TR-DNA chỉ được tìm thấy ở plasmid Ri của các chủng thuộc nhóm agropine, vùng này mang các gen mã hóa sinh tổng hợp auxin và opine (*aux1*, *aux2*, *rolB* TR, *mas1*, *mas2* và *ags*). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh được các gen *aux* không giữ vai trò quan trọng trong quá trình cảm ứng sản sinh rễ

tơ mà chỉ đóng vai trò hỗ trợ cho quá trình này. Nghiên cứu của Vilaine et al (1987) [31] cho thấy, sự biểu hiện của các gen nằm trên T-DNA vùng biên phải có khả năng cam ứng hình thành kiểu hình rễ tơ ở một số thực vật, tuy nhiên hình thái rễ tơ là không điển hình và tốc độ sinh trưởng của rễ không mạnh như khi biểu hiện cả vùng biên trái và vùng biên phải. Điều này cho thấy, T-DNA vùng biên trái là cần thiết để mở rộng đối tượng vật chủ ở các chủng *A. rhizogenes* nhóm agropine [6, 17, 20].

Vùng TL-DNA bao gồm 18 khung đọc mở (ORFs), trong đó các gen được nghiên cứu có khả năng gây bệnh bao gồm 4 locus 10, 11, 12 và 15 tương ứng với các gen *rolA*, *B*, *C* và *D* (root locus) và các ORFs 8, 13 và 14 [15, 33]. Plasmid Ri của các chủng *A. rhizogenes* thuộc nhóm mannopine, cucumopine và mikimopine chứa vùng T-DNA đơn, có cấu trúc giống như vùng TL-DNA của các chủng thuộc nhóm agropine nhưng khuyết gen *rolD*. Các gen *rolA*, *rolB* và *rolC* đóng vai trò quan trọng trong quá trình cam ứng tạo rễ tơ ở thực vật. 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 [18]. Có rất nhiều nghiên cứu về vai trò ảnh hưởng của các gen *rol* lên quá trình cam ứng hình thành rễ tơ ở thực vật thông qua việc chuyển từng gen *rol* hay tổ hợp các gen *rol* vào các đối tượng thực vật khác nhau. Những nghiên cứu này đã cho thấy các gen *rol* tương tác hỗ trợ lẫn nhau, tuy nhiên, *rolB* đóng vai trò trung tâm và quan trọng hơn cả, trong khi *rolA* và *rolC* hoạt động hỗ trợ thúc đẩy sự hình thành và phát triển của rễ tơ [2, 30]. Khi *rolB* bị bất hoạt, hoạt động của các gen còn lại không tạo được kiểu hình rễ tơ [6]. Trái lại, ở rất nhiều loài thực vật, chỉ riêng sự biểu hiện của *rolB* đã đủ cam ứng sản sinh ra rễ. Loại rễ tơ này cũng có khả năng phát triển nhanh, phân nhánh nhiều và không hướng đất [1, 29]. Mặc dù vậy, một số phân tích cho thấy có sự khác nhau về vai trò của các gen *rol* giữa một số loài thực vật, phần lớn phụ thuộc vào sự cân bằng hormon cần thiết cho quá trình tái sinh [32].

Chuyển gen thông qua *A. rhizogenes* từ lâu đã được coi là phương thức biến đổi hệ gen thực vật. Sự có mặt và hoạt động của các gen vi

khuan trong mô thực vật chuyển gen có khả năng cam ứng hình thành rễ tơ ở nhiều loài thực vật khác nhau [5, 12, 13, 27]. Phần lớn các nghiên cứu chuyển gen nhờ *A. rhizogenes* chỉ áp dụng trên cây cảnh [16, 26] và chuyển gen tạo rễ tơ vào một số loài thực vật với mục đích sản xuất hợp chất thứ cấp [4, 21, 22, 29], trong đó có một số cây được lưu quan trọng [3, 10, 14, 28]. Gần đây, xu hướng sử dụng hệ thống nuôi cấy rễ tơ để sản xuất các dược phẩm sinh học tái tổ hợp bắt đầu được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng [19]. Tuy nhiên, hiện các hệ vector chuyển gen mang gen đích sử dụng trong nghiên cứu phần lớn là các vector sử dụng trong chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Trong nghiên cứu này, để đồng thời sản xuất sinh khối rễ tơ và biểu hiện các protein được phẩm sinh học tái tổ hợp, chúng tôi đã thiết kế vector chuyển gen nhũ thể mang các cấu trúc gen *rol* cho hiệu quả cao trong quá trình cam ứng hình thành rễ tơ ở thực vật. Kết quả của nghiên cứu tạo được hệ vector nên trong các nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ thực vật để thu sinh khối sản xuất protein tái tổ hợp sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 đang nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*; vector tách dòng pBT, các vector chuyển gen ở thực vật pBI121 và pCB301 (sử dụng kháng sinh chọn lọc *nrpIII* kanamycin) do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

Chung *E. coli* DH5 α [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 Δ lac U169* (ϕ 80 *lacZ*A115)] của hãng Invitrogen được dùng để chọn dòng và nhân dòng gen.

Chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834, *A. tumefaciens* C58/PGV 2260 (Viện Dược học và Sinh học phân tử, Trường Đại học Heidelberg, CHLB Đức) được sử dụng cho mục đích chuyển gen vào thực vật.

Phân lập, tách dòng và giải trình tự các gen *rol*

Dựa trên trình tự của các gen quan tâm trong Ngân hàng gen Quốc tế, sử dụng chương trình phân mềm DNASTar, BioEdit để so sánh tìm ra các vùng có độ bảo thủ cao nhất, chúng

tôi đã thiết kế 3 cặp mồi đặc hiệu nhằm khuếch đại các gen *rolB*, *rolC* và tổ hợp đa gen *rolABC* (bao gồm cả vùng promoter và terminator) từ khuôn DNA là plasmid R1 tách chiết từ vi khuẩn *A. rhizogenes* nhóm agropine ATCC 15834. Cả

bà cặp mồi trên đều được tổng hợp bởi hãng Amersham Pharmacia Biotech, trình tự mồi được thiết kế thêm vị trí cắt của enzyme hạn chế tạo thuận lợi cho quá trình nối ghép gen sau này (bảng 1).

Bảng 1 Các cặp mồi sử dụng

Tên mồi	Trình tự mồi	Nhân gen hoặc đoạn gen/kích thước (kb)
rolB_F_SacI	CCGAGCTCTTAGGCTTCTTCTTCAG	Gen <i>rolB</i> /0,8
rolB_R_XbaI	GCTCTAGAAATGGATCCCAAATTGCTA	
rolC_F_XbaI	GCTCTAGAAATGGCTGAAGACGACCTG	Gen <i>rolC</i> /0,56
rolC_R_SacI	CGGAGCTCTTAGGCTGCGCAAACTTG	
rolABC_F_EcoRI	AATTGGAATTCCAAACGATTC	Gen <i>rolABC</i> /4
rolABC_R_EcoRI	CCGAATTCGGCGCGTGGGCCAGTGC	

Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 25 μ l, thành phần phản ứng bao gồm 1 μ l DNA plasmid (10-50 ng), 1 μ l *Pfu* DNA polymerase, 2,5 μ l đệm PCR và $MgSO_4$ (10X), 2 μ l hỗn hợp dNTP (10 mM), 1 μ l mồi xuôi và 1 μ l mồi ngược và 16,5 μ l nước khử ion vô trùng.

Quá trình nhân gen gồm các bước sau: 94°C/5 phút; 30 chu kỳ lặp lại các bước 94°C/1 phút, 55°C/30 giây, 72°C/1 phút (đối với các gen *rolB*, *rolC*) hoặc 72°C/4 phút (đối với *rolABC*); 72°C/10 phút, bao quan mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% và sau đó được tinh sạch bằng bộ Kit PCR purification (Fermentas) trước khi được đưa vào vector tách dòng pBT. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào kha biến *E. coli* DH5 α . Plasmid tách chiết từ tế bào biến nạp được cắt kiểm tra bằng enzyme hạn chế *Bam*HI và trình tự các gen *rol* trên vector được so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank sau khi giải trình tự gen.

Thiết kế các vector chuyển gen pBI121/*rolB*, pBI121/*rolC* và pCB301/*rolABC*

Các vector tách dòng pBT/*rolB*, pBT/*rolC* và vector chuyển gen pBI121 đồng thời được cắt tạo đầu sole bằng cặp enzyme giới hạn *Xba*I và *Sac*I. Đoạn gen *rolB*, *rolC* và vector pBI121 thu được sau đó được tinh sạch và sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng nối ghép dưới sự xúc tác của T4 DNA ligase để tạo thành vector pBI121/*rolB* và pBI121/*rolC*. Theo cách tương tự, gen *rolABC* trong vector tách dòng

pBT/*rolABC* được cắt thu và nối ghép vào vector chuyển gen pCB301 tại vị trí cắt của enzyme *Eco*RI để tạo thành vector pCB/*rolABC*. Sản phẩm lai được biến nạp vào *E. coli* DH5 α theo phương pháp sốc nhiệt. Tiến hành sàng lọc các thể biến nạp mang plasmid tái tổ hợp mong muốn bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu và phương pháp cắt kiểm tra bằng enzyme hạn chế. Sau khi được thiết kế thành công, các vector trên được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* C58/PGV 2260 bằng phương pháp xung điện để phục vụ cho mục đích chuyển gen tạo rễ tơ ở thực vật.

Phương pháp chuyển gen vào thực vật thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Quy trình chuyển gen vào giống thuốc lá *N. tabacum* K326 thông qua *Agrobacterium* được tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) có cải tiến. Các bước chính như sau:

Tạo dịch huyền phù *Agrobacterium*: Cây trái *A. tumefaciens* C58/PGV 2260 mang các cấu trúc gen *rol* cất giữ trong glycerol nên đưa môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh rifamycin 50 mg/l, carbenicillin 50 mg/l và kanamycin 50 mg/l, nuôi ở 28°C trong 36-48 giờ. Sau đó lấy một khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung các kháng sinh như trên và lắc ở 220 vòng/phút, 28°C. Sau 16-18 giờ, tiếp tục chuyển 5 ml dịch vi khuẩn trên sang bình to hơn, bổ sung 45 ml LB lỏng, tiếp tục nuôi lắc ở 220 vòng/phút, 28°C trong 3-5 giờ. L1 tâm dịch khuẩn 4500-

5000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, loại bỏ dịch nổi và hòa tan cân trong môi trường 1/5 MS, pha loãng tới OD₆₀₀ = 0,5-0,8. Dịch huyền phù vi khuẩn này có thể được sử dụng để biến nạp ngay hay có thể giữ ở 4°C trong 1-2 giờ.

Nhiễm vi khuẩn với mảnh lá là bánh tẻ của các cây thuốc lá K326 *in vitro* hai tuần tuổi được cắt thành những mảnh nhỏ có kích thước 1 cm². Những mảnh lá này sau đó được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn khoảng 10-20 phút, thấm khô và được đặt lên môi trường công sinh MS trong tối ở nhiệt độ 25°C ± 2°C. Sau hai ngày đồng nuôi cấy, các mảnh lá được chuyển sang môi trường chọn lọc MS có bổ sung 100 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxim, liên tục chuyển 2 tuần/lần.

Các mẫu mô chuyển gen sống sót trên môi trường chọn lọc được theo dõi và đánh giá hiệu suất cảm ứng hình thành rễ tơ, tốc độ phát triển cũng như hình thái của từng loại rễ.

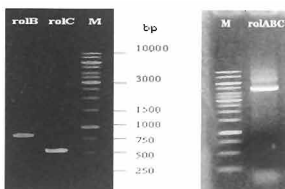
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Theo những báo cáo gần đây, trong số các root locus nằm trên vùng TL-DNA của plasmid R₁, *rolB* và *rolC* là đối tượng của nhiều nghiên cứu trong lĩnh vực công nghệ hóa sinh. Trong bài báo này, cùng với việc thiết kế các cấu trúc chuyển gen *rol*, chúng tôi đã bước đầu khảo sát ảnh hưởng của các gen *rolB*, *rolC* riêng biệt và tác dụng hiệp trợ giữa cả 3 gen *rolA*, *B*, *C* lên quá trình hình thành và phát triển của rễ tơ ở cây thuốc lá làm cơ sở cho các nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ thực vật thu sinh khối sau này.

Tổng hợp, thiết lập hệ vector tách dòng các gen *rolB*, *rolC* và *rolABC*

Sử dụng phần mềm DNASTar và trình tự của các gen *rol* khai thác trên ngân hàng gen quốc tế với mã số K03313 [1], chúng tôi đã thiết kế 3 cặp mồi để khuếch đại hai 2 gen *rolB*, *rolC* và đoạn DNA bao gồm 3 gen *rolA*, *rolB* và *rolC* liên kết (đồng thời chứa các trình tự của promoter và terminator tạo thuận lợi cho các bước thiết kế vector chuyển gen về sau) từ khuôn DNA là plasmid R₁ tách chiết từ vi khuẩn *A. rhizogenes* nhóm agropine ATCC 15834. Để đảm bảo độ chính xác cao trong quá trình tổng hợp gen chúng tôi sử dụng *Pfu* DNA polymerase khi thực hiện phản ứng PCR. Ngoài

hoạt tính 5'-3' polymerase xúc tác cho quá trình polymer hóa các deoxiribonucleotide, enzyme này còn có khả năng đọc sửa (proofreading) nhờ hoạt tính 3'-5' exonuclease, giúp sửa chữa những sai hỏng trên sợi DNA mới tổng hợp. Kết quả điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% (hình 1) cho thấy, sản phẩm của phản ứng PCR là các băng đặc hiệu với kích thước đúng như dự đoán 0,8 kb, 0,56 kb và > 4 kb tương ứng với các gen *rolB*, *rolC* và đoạn đa gen *rolABC*. Điều này cho thấy chúng tôi đã nhân thành công các gen *rol* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đã thiết kế và chu trình nhiệt phù hợp.



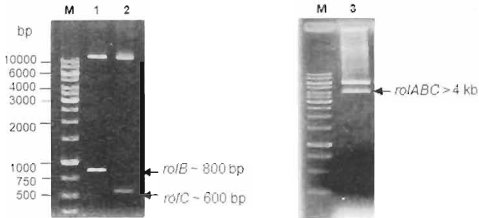
Hình 1. Phân tích sản phẩm PCR nhân các gen *rolB*, *rolC* và *rolABC* trên gel agarose 0,8% (M thang DNA chuẩn 1 kb. Fermentas)

Các đoạn DNA sau khi khuếch đại thành công được tinh sạch và nối ghép vào vector tác động pBT nhờ tác dụng của enzyme T4-DNA ligase. Các vector tái tổ hợp tạo ra từ phản ứng lại được biến nạp vào tế bào kha biến *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt. Kết quả sàng lọc các thể biến nạp trên đĩa LB chứa kanamycin 50 mg/l bằng phương pháp PCR và cắt enzyme hạn chế cho thấy các gen *rolB*, *rolC* và *rolABC* đã được đồng hóa thành công trong vector pBT (không công bố). Chúng tôi sử dụng các dòng này làm nguyên liệu để giải trình tự gen. Kết quả BLAST 3 trình tự thu được cho thấy, các gen *rolA*, *rolB* và *rolC* đã phân lập có độ tương đồng 99% với trình tự DNA của các gen tương ứng trên ngân hàng gen với mã số K03313 [1]. Tuy nhiên, các vị trí sai khác không ảnh hưởng đến quá trình dịch mã của các gen này, trình tự axit amin suy diễn từ các gen vẫn đạt độ tương đồng là 100% (không công bố).

Kết quả thiết kế vector chuyển gen mang đơn gen *rolB*, *rolC* và đa gen *rolABC*

Như đã trình bày ở trên, do trong quá trình thiết kế các môi được gắn thêm điểm cắt của enzyme hạn chế nên các gen *rol* sau khi được

đồng hóa ở 2 đầu sẽ mang trình tự nhận biết của cặp enzyme *Xba*I và *Sac*I (đối với *rolB*, *rolC*) và *Eco*RI (đối với *rolABC*). Điều này tạo thuận lợi cho việc cắt nối gen trong thí nghiệm tiếp theo

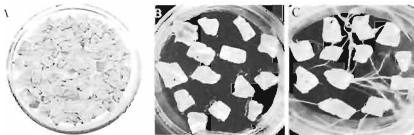


Hình 2. Kết quả cắt kiểm tra các vector tái tổ hợp pB1121-*rolB*, pB1121-*rolC* bằng *Xba*I và *Sac*I (1, 2); cắt kiểm tra pCB301/*rolABC* bằng *Eco*RI; M thang DNA chuẩn 1 kb, Fermentas

Quá trình thiết lập các vector chuyển gen *rol* vào thực vật có nhiều điểm tương tự với quá trình tạo đồng. Tuy nhiên, trong quá trình này, vị trí nhận biết của cặp enzyme *Xba*I và *Sac*I hay enzyme *Eco*RI nằm trên 2 đầu các gen *rolB*, *rolC* và *rolABC* được sử dụng làm điểm cắt, nối ghép vào các vector chuyển gen pB1121 và pCB301, theo thứ tự tương ứng, để tạo thành pB1121/*rolB*, pB1121/*rolC* và pCB301/*rolABC*. Các vector tái tổ hợp này cũng được xác định bằng việc cắt kiểm tra tại chính vị trí của các enzyme nói trên. Kết quả điện di sản phẩm cắt

trên gel agarose 0,8% (hình 2) cho thấy các phân đoạn gen thụ được có kích thước đúng với tính toán lý thuyết. Như vậy, chúng tôi đã thiết kế thành công vector chuyển gen mang các cấu trúc gen *rol* ở cả dạng đơn lẻ và liên kết. Những cấu trúc này sau đó được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* C58/PGV 2260 bằng phương pháp xung điện để phục vụ cho mục đích chuyển gen tạo rễ tơ ở thực vật.

Kết quả tạo các dòng rễ tơ chuyển gen *rol* ở cây thuốc lá



Hình 3 Hình ảnh một số bước chuyển các cấu trúc gen *rol* vào mảnh lá thuốc lá tạo các dòng rễ tơ chuyển gen

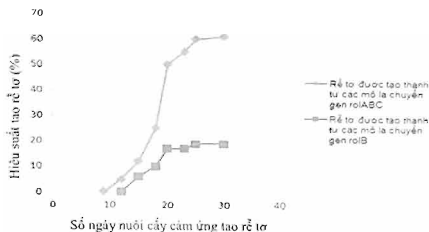
A. Mảnh lá ngâm trong dung dịch huyền phù vi khuẩn, B. Mảnh lá chuyển gen trong môi trường chọn lọc, C. Rễ tơ chuyển gen xuất hiện sau 20 ngày nuôi cấy.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi chọn cây mô hình thuốc lá làm nguyên liệu phục vụ cho

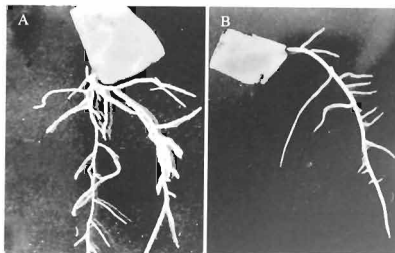
việc chuyển gen để đánh giá hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ ở thực vật của ba cấu trúc gen *rol* đã

thiết kế. Đối với mỗi cấu trúc gen *rol*, chúng tôi sử dụng 96 mảnh lá. Sau khi lấy nhiễm và đồng nuôi cây với vi khuẩn *Agrobacterium*, các mảnh lá thuốc lá được đặt trên môi trường chọn lọc có bổ sung kanamycin ở nồng độ cao (100 mg/l). Do trong quá trình xâm nhiễm, ngoài các cấu

trúc gen *rol*, gen *nptII* trên vector chuyển gen mã hóa cho enzyme phân hủy kanamycin cũng được tích hợp vào genome vật chủ nên chỉ những mô lá được chuyển gen mới có thể sống sót trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin và cảm ứng tạo rễ (hình 3).



Hình 4. Hiệu suất tạo rễ ở các mảnh lá thuốc lá sau khi lấy nhiễm với *A. tumefaciens* mang các cấu trúc gen *rol* trong 30 ngày theo dõi



Hình 5. Hình thái rễ tơ của các dòng rễ chuyển cấu trúc đa gen *rolABC* (A) và đơn gen *rolB* (B)

Qua theo dõi, các mô được lấy nhiễm với *A. tumefaciens* mang cấu trúc *rolB* và *rolABC* có khả năng biệt hóa tạo rễ tơ trên môi trường MS không chứa chất kích thích sinh trưởng. Các mảnh lá chuyển gen có xu hướng hình thành rễ ở cạnh đã cắt bỏ gần giữa đê gây tổn thương, hiệu suất tạo rễ tơ được biểu thị bởi phần trăm số mô ra rễ trên tổng số mô lá ban đầu. Từ hình 4 có thể thấy các mảnh lá sau khi chuyển gen

rolABC hình thành rễ sớm nhất. Chỉ 10-12 ngày sau khi lấy nhiễm *Agrobacterium*, rễ đã bắt đầu trồi ra từ một số mô lá và 5-7 ngày sau đó, một nửa số mảnh lá đã cảm ứng tạo rễ tơ. Đến ngày thứ 30, số mảnh lá tạo rễ tơ chiếm hơn 60%. Các dòng rễ chuyển gen *rolABC* này mang đầy đủ các đặc điểm hình thái điển hình của rễ tơ như tốc độ sinh trưởng nhanh, thân rễ dày, phân nhánh nhiều và giảm thiểu sự hướng đất (hình

SA) Trong khi đó, ở các mô được lây nhiễm với *A. tumefaciens* mang cấu trúc *rolB* riêng biệt, thời gian cảm ứng hình thành rễ tơ muộn hơn, đồng thời hiệu suất tạo rễ tơ cũng thấp hơn, chỉ đạt khoảng 20%. So với dòng rễ tơ chuyên đa gen *rolABC*, các dòng rễ chuyên đơn gen *rolB* có tốc độ phát triển chậm hơn và mật độ rễ bên thấp hơn (hình 5B). Trong số 3 cấu trúc gen *rol* được chuyển vào mảnh lá thuốc lá, duy nhất cấu trúc *rolC* không thúc đẩy sự hình thành rễ tơ. Như vậy, cấu trúc đa gen *rolA, B, C* liên kết cho hiệu quả cao nhất trong việc cảm ứng tạo rễ tơ ở thực vật.

Các kết quả trên cho thấy sự cần thiết của locus *rolB* trong việc cảm ứng hình thành rễ tơ ở thực vật, tuy nhiên, một số gen như *rolA* và *rolC* có thể cũng cần thiết để hình thành đầy đủ triệu chứng rễ tơ. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trong lĩnh vực công nghệ hóa sinh gần đây về các root locus nằm trên vùng TL-DNA của plasmid R1. Theo đó, hoạt động của gen *rolB* được chứng minh là giữ vai trò quan trọng nhất trong sự hình thành rễ tơ ở thực vật, đồng thời thúc đẩy mạnh mẽ quá trình tổng hợp các hợp chất thứ cấp [23]. Tuy nhiên, sự biểu hiện quá mức của gen này trong các mô chuyển gen có thể gây ức chế sự phát triển của tế bào [8]. So với *rolB*, gen *rolC* có khả năng hoạt hóa quá trình tổng hợp các chất thứ cấp yếu hơn nhưng lại giữ một vai trò quan trọng thúc đẩy sự phát triển của tế bào [7]. Spena et al. (1987) [25] đã tiến hành phân tích sự hình thành rễ tơ ở lá cây bông khi chuyển các tổ hợp gen *rol* và thấy rằng chỉ có gen *rolB* mới có khả năng cảm ứng sản sinh rễ tơ, trong khi đó tự thân các gen *rolA* và *rolC* không thể gây ra hiện tượng này, tuy nhiên, hoạt động hiệp trợ của các gen này với *rolB* giúp gia tăng sự hình thành rễ tơ. Các rễ tạo thành từ lá cây bông khi được chuyển tổ hợp gen *rolAB* hoặc *rolABC* có hình thái xoắn, trong khi các rễ chuyên gen *rolB* hoặc *rolBC* phát triển thẳng từ bề mặt lá. Quan sát tương tự cũng được báo cáo bởi White et al. (1985) [33] khi phân tích các đột biến chèn trên plasmid R1 của *A. rhizogenes* chủng A4. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng khác nhau về mặt sinh học của hai gen *rolA* và *rolC* lên sự phát triển của rễ tơ được chứng minh thông qua các phân tích về đặc tính phát triển của các dòng rễ

tơ thuốc lá chuyển gen. Theo đó, *rolB* giữ vai trò tiên quyết trong quá trình cảm ứng tạo rễ tơ, tuy nhiên, sự phát triển nhanh và phân nhánh nhiều của rễ đòi hỏi có hoạt động bổ trợ của gen *rolC*. Tổng hợp các kết quả cho thấy sự phối kết hợp của các gen *rolB* với *rolC* (hoặc với cả *rolA* và *rolC*) là cần thiết để cải thiện đáng kể sự sản sinh và phát triển của rễ tơ trong nuôi cấy *in vitro*.

KẾT LUẬN

Đã thiết lập thành công các vector chuyển gen vào thực vật mang đơn gen *rolB*, *rolC* và đa gen *rolABC*, đồng thời kiểm tra và đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ tơ ở lá thuốc lá của ba cấu trúc gen *rol* đã thiết kế. Bước đầu đã lựa chọn được cấu trúc liên kết *rolABC* là phù hợp cho các nghiên cứu tạo và nuôi cấy rễ tơ thực vật. Các dòng rễ chuyển gen tạo ra do tác động của tổ hợp gen này có khả năng sinh trưởng, phát triển nhanh và mang đầy đủ các đặc điểm hình thái điển hình của rễ tơ.

Lời cảm ơn Công trình này được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài "Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tót sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) làm vật liệu cho nuôi cấy bioreactor" thuộc chương trình Trọng điểm phát triển và ứng dụng Công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020 do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn chủ trì. Các thí nghiệm trong nghiên cứu này được thực hiện tại phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altamura M. M., 2004. *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 77: 89-101.
- Aoki S, Syono K., 1999. Synergistic function of *rolB*, *rolC*, ORF13 and ORF14 of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* in hairy root induction in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.*, 40: 252-256.
- Batra J., Dutta A., Singh D., Kumar S., Sen J., 2004. Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus*

- hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration. *Plant Cell Rep.*, 23: 148-154.
4. Bauer N., Kiseljak D., Jelaska S., 2009. The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Colletus blumei* hairy roots. *Biol. Plant*, 53: 650-656.
 5. Birot A. M., Bouchez D., Casse-Delbart F., Durand-Tardif M., Jouanin L., Pautou V., Robaglia C., Tepfer D., Tepfer M., Tourneur J., Vilaine F., 1987. Studies and uses of the rRi plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiol. Biochem.*, 25: 323-335
 6. Britton M. T., Escobar M. A., Dandekar A. M., 2008. The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. In: Tzfira T., Citovsky V. (eds) *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. New York, Springer: 523-563.
 7. Bulgakov V. P., 2008. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.*, 26: 318-24
 8. Bulgakov V. P., Shkryl Y. N., Veremeichik G. N., Gorpenchenko T. Y., Inyushkina Y. V., 2011. Application of *Agrobacterium rol* genes in plant biotechnology: A natural phenomenon of secondary metabolism regulation. In: *Genetic Transformation*: 261-270, Prof. María Álvarez (Ed.), ISBN: 978-953-307-364-4. In-Tech Publisher.
 9. Cardarelli M., Spanò L., 1987. The role of auxin in hairy root induction. *Mol. Gen. Genet.*, 208(3): 457-463.
 10. Chaudhury K. N., Ghosh B., Tepfer D., Jha S., 2006. Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, 25: 1059-1066.
 11. Chilton M. D., Tepfer D. A., 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 295: 432-434.
 12. Christey M. C., 1997. Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. In: Doran PM (ed.): *Hairy Roots: Culture and Applications*: 99-111. Harwood Academic Publishers, Amsterdam
 13. Christey M. C., 2001. Use of Ri mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro cell. dev. Biol. Plant*, 36: 687-700
 14. Gangopadhyay M., Sircar D., Mitra A., Bhattacharya S., 2008. Hairy root culture of *Plumbago indica* as a potential source for plumbagin. *Biol. Plant*, 52: 533-537.
 15. Jouanin L., Guerche P., Pamboukdjian N., Tourneur C., Casse-Delbart F., Tourneur J., 1987. Structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Mol. Gen. Genet.*, 206: 387-392.
 16. Mishiba K. I., Nishihara M., Abe Y., Nakatsuka T., Kawamura H., Kodama K., Takesawa T., Abe J., Yamamura S., 2006. Production of dwarf potted gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Biotechnol.*, 23: 33-38.
 17. Nilsson O., Olsson O., 1997. Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol. Plant*, 100: 463-473
 18. Palazón J., Mallol A., Eibl R., Lettenbauer C., Cusidó R. M., Pinol M. T., 2003. Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor. *Planta Med.*, 69(4): 344-349.
 19. Pham N. B., 2009. Production and secretion of recombinant sweet-tasting thaumatin from suspension cells and hairy roots of *Nicotiana tabacum*, PhD Thesis, University of Heidelberg.
 20. Porter J. R., 1991. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10: 387-421.
 21. Rosić N., Momčilović I., Kovačević N., Grubišić D., 2006. Genetic transformation of *Rhamnus fallax* and hairy roots as a source of anthraquinones. *Biol. Plant*, 50: 514-518.

22. Sevón N., Oksman-Caldentey K. M., 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med.*, 68(10): 859-868.
23. Shkryl Y. N., Veremeichik G. N., Bulgakov V. P., Tchemod G. K., Mischenko N. P., Fedoroyev S. A., Zhuravlev Y. N., 2008. Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnol Bioeng.* 100 118-25.
24. Sivanesan I., Jeong B. R., 2009. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. *Af J. Biotech.* 8: 5294-5300.
25. Spena A., Schmulling T., Koncz C., Schell J. S., 1987. Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* và *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J.*, 6(13): 3891-3899.
26. Teixeira da Silva J. A., 2003. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, 21 715-766
27. Tepfer D., 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* *Physiol. Plant.* 79 140-146.
28. Tiwari R. K., Trivedi M., Guang Z. C., Guo G. Q., Yang G. C., 2007 Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes* growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicoside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Rep.*, 26. 199-210.
29. Tiwari R. K., Trivedi M., Guang Z. C., Guo G. Q., Zheng G. C., 2008. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots. *Biol. Plantarum*, 52(1): 26-35.
30. Veena V., Taylor G. C., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro cell Dev. Biol. Plant.* 43: 383-403.
31. Vilaine F., Casse-Delbart F., 1987. Independent induction of transformed roots by the TL and TR regions of the R1 plasmid of agropine type *Agrobacterium rhizogenes*. *Mol. Gen. Genet.* 206: 17-23.
32. Vinterhalter B., Zdravkovic-Korać S., Ninkovic S., Mitic N., Jankovic T., Miljus-Djukic J., Vinterhalter D., 2011. Variability in shoot cultures regenerated from hairy roots of *Gentiana punctata*. *Biologia. Plantarum*, 55(3): 414-422.
33. White F. F., Taylor B. H., Huffman G. A., Gordon M. P., Nester E. W., 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol.*, 164. 33-44.
34. Zhi-Bi H., Min D., 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *J. Integr Plant Biol.* 48(2): 121-127.

STUDY ON CONSTRUCTION OF TRANSFORMATION VECTORS CARRYING CONSTRUCTS OF *rol* GENES HIGHLY EFFECTIVE IN PLANT HAIRY ROOTS INDUCTION

Le Thu Ngoc¹, Tran Thu Trang¹, Pham Bich Ngoc¹,
Chu Hoang Ha¹, Duong Tan Nhut²

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Tay Nguyen Institute for Scientific Research, VAST

SUMMARY

Culture of hairy roots the roots induced by infection of *Agrobacterium rhizogenes* into wounded plant tissues has long been widely applied in many research fields such as functional analysis of genes, expression of foreign proteins, production of secondary compounds or changes of the composition of metabolites in plants. The causes of hairy root formation were identified related to the TL-DNA on Ri plasmids of *A. rhizogenes* strains, in which 4 gene loci including *rolA*, *B*, *C* and *D* (root loci) play important roles. However, expression of these *rol* genes in single form or in combination greatly affects the frequency of hairy root formation as well as the growth and morphology of the roots. In this study, we established, evaluated and selected the transgenic constructs of *rol* genes highly effective in plant hairy root induction. Single *rolB*, *rolC* genes and a combination of *rolA*, *B*, *C* were amplified from DNA template as Ri plasmid extracted from *A. rhizogenes* strain ATCC 15834 by PCR using specific primers linked with recognition sequences of restriction enzymes. The two genes *rolB*, *rolC* and the multi-gene segment *rolABC* were then introduced into pBI121 and pCB301 vectors, respectively, to yield recombinant plasmids and were transformed into *A. tumefaciens* C58/PGV 2260. The results of transgenesis for induction of hairy roots on leaves of tobacco via *Agrobacterium* strains carrying the three constructs of *rol* genes showed that the simultaneous expression and interaction of *rolA*, *B* and *C* resulted in the highest frequency of hairy root formation in transgenic tissues (over 60%), and the roots displayed all typically morphological characteristics of hairy roots. In the transgenic tissues containing single *rolB*, root formation frequency was only about 20%. Moreover, the speed of growth and density of branches were also lower. Meanwhile, individual activity of *rolC* hardly induced hairy root phenotype.

Keywords: *Agrobacterium*, *rolA*, *rolB*, *rolC*, hairy root, transgenic vectors.

Ngày nhận bài: 15-5-2013