XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHUYỂN GEN ĐƠN GIẢN VÀ HIỆU QUẢ ĐỂ CẢM ỨNG TẠO RỄ TÓC KHỔ QUA RỪNG (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser.)

Nguyễn Thị Thu Trang[1], Vũ Thị Đào[1*], Bùi Minh Trí[2]

[1]Trung tâm Sinh học ứng dụng Anh Đào
[2] Trường đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

Email[*]: daovu10@gmail.com

Ngày gửi bài: 28.09.2016 Ngày chấp nhận: 13.02.2017

TÓM TẮT

Khổ qua rừng (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser.) được biết đến như một loài thực phẩm và thảo dược quý. Trong cây khổ qua rừng có chứa nhiều hoạt chất như glycoside, saponin, alkaloid, hỗn hợp lipid, triterpen, protein và steroid. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng một quy trình chuyển gen đơn giản, hiệu quả và nhanh chóng để tạo rễ tóc cây khổ qua rừng nhờ chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* TR7 có chứa plasmid pPE113 mang gen *e-gfp*. Các yếu tố như độ tuổi của cây, vị trí xâm nhiễm đã được khảo sát. Kết quả ghi nhận cây 7 ngày tuổi với vị trí xâm nhiễm ở trụ dưới lá mầm cho tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tóc đạt 69,66-73,33%. Sau quá trình tái sinh và sàng lọc, 30 dòng rễ giả định chuyển gen được chia thành 4 nhóm kiểu hình khác nhau với các đặc điểm như rễ trắng, sinh trưởng nhanh, phân nhánh mạnh trên môi trường MS. Tỷ lệ biểu hiện của protein e-GFP cho 4 nhóm đạt trung bình 46,7%. Kết quả PCR đã khẳng định 4 dòng rễ đại diện cho 4 nhóm kiểu hình đã được chuyển gen thành công thông qua sự hiện diện của gen *rolA* và sự vắng mặt của gen *virD*.

Từ khóa: *Agrobacterium rhizogenes*, chuyển gen, gen *rol*, khổ qua rừng, rễ tóc.

Establishment of A Simple and Efficient Transformation Protocol for Hairy Root Induction of Wild Bitter Melon (*Momordica charantia* L.var. *abbreviata* Ser.)

ABSTRACT

Wild bitter melon (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser.) is known as a valuable vegetable and herb. It contains several important bioactive substances, including glycoside, saponin, alkaloide, triterpen and steroide. This study was carried out to establish a simple and efficient transformation protocol for inducting hairy roots of wild bitter melon by using strain TR7 of *Agrobacterium rhizogenes* which carries pPE113 binary vector harbouring *e-gfp* gene. Major parameters were optimized including, the age of plant and position for injection. The results indicated that highest hairy root induction frequencies was about 69.66-73.33% when seven-day-old seedlings were used to infect with the bacterium using hypocotyl. After regeneration and selection, thirty putative root clones of 4 specific phenotypes, i.e. white hairs, fast growth and branching on hormone-free MS medium, were obtained. The average GFP expression rate in 4 specific phenotypic groups were about 46.7%. PCR analysis using specific primers for *rolA* gene and *virD* gene confirmed the presence of the *rolA* gene and absence of *virD* gene in the genome of four hairy root lines. It was suggested that this simple transformation protocol can be applied for hairy root induction of other varieties as well.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser., *rol* gene, transformation.

1. MỞ ĐẦU

Khổ qua rừng (*Momordica charantia* L. var. abbreviata Ser.) là một loại cây vừa làm thực phẩm vừa có giá trị dược liệu. Các bài thuốc từ khổ qua rừng cũng đã được chứng minh là có khả năng ngăn ngừa bệnh tiểu đường, kháng vi khuẩn, virus, ức chế sự phát triển của khối u, hạn chế viêm loét, ngăn ngừa bệnh viêm khớp (Grover and Yadav, 2004). Đặc biệt, charatin -

hợp chất đặc trưng của khổ qua rừng được sử dụng để điều trị tiểu đường hiệu quả. Ngoài ra, một số protein như MAP30, anpha momorchain, beta momorchain thu nhận từ khổ qua cũng đã được ghi nhận có khả năng kháng lại virus HIV (Bourinbaiar and Lee-Huang, 1996). Hiện nay, khổ qua rừng thu hái tự nhiên không có nhiều để cung cấp cho sản xuất, cần hướng đến giải pháp sản xuất bằng con đường công nghệ sinh học. Chuyển nạp gen là một công cụ có tiềm năng trong việc nâng cao hiệu năng sản xuất những hoạt chất sinh học giá trị cao, đặc biệt là dùng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* chứa gen *rol* cảm ứng tạo rễ tóc.

Rễ tóc được tạo ra nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes,* với khả năng phát triển nhanh và phù hợp với các qui trình nuôi cấy tạo sinh khối liên tục, là nguồn nguyên liệu thích hợp để sản xuất các hợp chất thứ cấp hay các dược phẩm sinh học tái tổ hợp (Guillon *et al.*, 2006). Tuy nhiên, hiện nay, một số quy trình chuyển gen cảm ứng tạo rễ tóc thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* phải trải qua nhiều công đoạn và hiệu quả biến nạp chưa cao. Để cải thiện, chúng tôi đã sử dụng phương pháp chuyển gen đơn giản hơn với thao tác nhanh và thực tế đã thu được hiệu quả biến nạp tương đối cao cho việc tạo rễ tóc trên cây khổ qua rừng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Hạt khổ qua rừng được thu thập ở thị xã An Khê - Gia Lai. Chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* TR7 mang hệ thống vector nhị thể gồm plasmid Ri và plasmid pPE113 với đoạn T-DNA có chứa gen chỉ thị *e-gfp* được điều khiển bởi promoter *35S*, gen chọn lọc *nptII* được điều khiển bởi promoter *nos*. Chủng vi khuẩn này được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Nông nghiệp và Môi trường - Trường Đại học Nông nghiệp và Công nghiệp Thực phẩm Nancy - Cộng hòa Pháp.

2.2. Phương pháp

Chuẩn bị mẫu thực vật:

Hạt khổ qua rừng sau khi được khử trùng bằng nước Javel 20% trong 10 phút và tách vỏ được cấy vào môi trường MS. Những cây khổ qua *in vitro* 5, 7, 10 ngày tuổi có kích thước đồng nhất và sức sống tốt đã được dùng để tiến hành xâm nhiễm.

Chuẩn bị vi khuẩn:

Vi khuẩn *A. rhizogenes* TR7 bảo quản ở -80°C được hoạt hóa bằng cách nuôi trải lên môi trường YMB đặc bổ sung 50 mg/L kanamycine trong 48 h ở 28°C trong điều kiện tối. Sau 2 ngày, lấy một khuẩn lạc đơn chuyển sang nuôi cấy trong môi trường YMB lỏng có bổ sung kanamycine 50 mg/L, lắc 120 vòng/phút ở 28°C trong 16 h. Ly tâm, loại bỏ phần dịch trên, sau đó vi khuẩn được hòa lại với môi trường MS lỏng tới mật độ khi OD ở bước sóng 600 nm đạt chỉ số 0,5 - 0,6.

Xâm nhiễm:

Dùng ống, kim tiêm vô trùng 26G x 1/2 lấy dịch khuẩn và châm nhẹ xung quanh vị trí trên và dưới, cách đốt lá mầm 0,5 cm từ 2 - 3 điểm. Tiêm khoảng 5 - 10 µL dịch khuẩn vào các vị trí đã gây vết thương. Sau đó cấy cây trở lại môi trường, để trong phòng nuôi cấy mô ở 25°C, ánh sáng 1.000 lux. Sau 2 - 3 tuần, sẽ xuất hiện các cụm rễ nhú ra tại vị trí xâm nhiễm hoặc vùng lân cận, mỗi một rễ nhú ra được coi là một dòng giả định chuyển gen (transformationevent). Tiếp tục nuôi cây 4 - 5 tuần, cắt dòng rễ ra và nuôi trên môi trường MS có bổ sung cefotaxime 200 mg/L để loại bỏ vi khuẩn. Mẫu đối chứng là những cây được tạo vết thương và tiêm với nước cất vô trùng thay cho dịch khuẩn.

Đánh giá hình thái và khả năng tăng trưởng các dòng rễ:

Sau nhiều lần cấy truyền để khử khuẩn và chọn lọc, các dòng rễ giả định chuyển gen được nuôi trên môi trường MS lỏng và rắn để đánh giá khả năng phân nhánh, tốc độ sinh trưởng, tính ổn định và phân nhóm kiểu hình.

Kiểm tra nhanh kết quả chuyển gen bằng xác định sự biểu hiện protein e-GFP:

Các dòng rễ giả định chuyển gen, sau 2 - 3 lần cấy chuyền trên môi trường MS có bổ sung cefotaxime 200 mg/L được soi dưới kính hiển vi

huỳnh quang (Eclipse E-800, Nikon, Nhật Bản) với kính lọc sắc B-2A, bước sóng kích thích tín hiệu FITC 480 nm, hiển thị và chụp ảnh tế bào bằng camera DS Nikon để kiểm tra sự biểu hiện của protein e-GFP. Những mẫu có hiện màu xanh lục sáng đặc trưng là những mẫu có biểu hiện dương tính với protein GFP do gen *e-gfp* mã hóa (Chiu *et al.*, 1996).

Xác định rễ chuyển gen bằng kỹ thuật PCR:

DNA tổng số của các mẫu rễ giả định chuyển gen được tách chiết theo hướng dẫn của Kit Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit). Sử dụng kỹ thuật PCR khuếch đại gen *rolA* bằng cặp mồi rolAF (CAGAATGGAATTAGCCGGACTA) và rolAR (ÔÔÁÁÔCCCGTAGGTTTGTTTCG) và kiểm tra sự vắng mặt của vi khuẩn *A. rhizogenes* bằng cặp mồi khuếch đại gen *virD*: virDF (GAAGAAAGCCGAAATAAAGAG) và virDR (TTGAACGTATAGTCGCCGATA) (Quan *et al.*, 2001). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agrose 1%.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu:

Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần với số mẫu trên mỗi nghiệm thức 50 mẫu. Số liệu thu được từ kết quả của các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel và Starphaphics centurion XVII.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

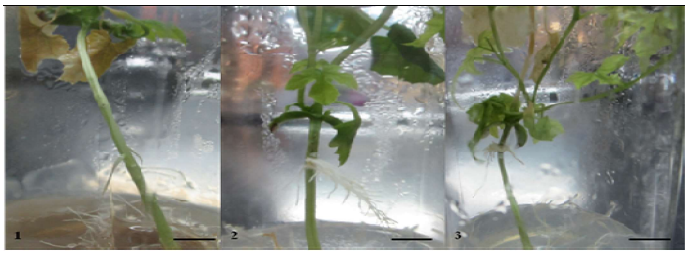
3.1. Ảnh hưởng của độ tuổi cây đến sự cảm ứng tạo rễ tóc

Cây khổ qua rừng *in vitro* 5, 7 và 10 ngày tuổi được xâm nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* nhằm xác định độ tuổi của cây thích hợp cho hiệu quả chuyển nạp gen cao nhất. Kết quả bảng 3.1 cho thấy cây con 7 ngày tuổi cho tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tới 73,33%, cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Với cây 10 ngày tuổi, có 36,67% mẫu cảm ứng tạo rễ. Điều này có thể giải thích do mẫu tương đối già, tế bào hình thành vách cellulose dày hơn nên khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn *A. rhizogenes* vào tế bào bị hạn chế (Ni *et al.*, 1998). Trong khi ở cây 5 ngày tuổi, tỷ lệ cây chết lớn do cây non, khả năng chống chịu với lực tác động cơ học khi tiêm vi khuẩn kém, do đó tỷ lệ này chỉ đạt 58,15%. Tất cả các cây đối chứng (tiêm nước cất) ở cả 3 độ tuổi đều không hình thành rễ. Điều này cho thấy rễ tạo ra là do cảm ứng của vi khuẩn

Bảng 1. Ảnh hưởng độ tuổi cây lên tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tóc khổ qua rừng

Tuổi cây (ngày)	Tỷ lệ cây cảm ứng tạo rễ tóc (%)	
	ĐC	Mẫu xâm nhiễm
5	0,00	58,15 ± 1,61[b]
7	0,00	73,33 ± 1,69[a]
10	0,00	36,67 ± 1,69[c]
CV (%)		4,21

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p = 0,05) giữa các giá trị trung bình.



Hình 1. Rễ tóc cảm ứng từ cây khổ qua rừng *in vitro* với các độ tuổi khác nhau

Ghi chú: 1. Cây 5 ngày tuổi, 2. Cây 7 ngày tuổi, 3. Cây 10 ngày tuổi. Thanh ngang ứng với 1 cm.

A. rhizogenes. Như vậy, cây khổ qua rừng 7 ngày tuổi là loại mẫu thích hợp nhất để cảm ứng tạo rễ tóc bằng phương pháp tiêm.

3.2. Ảnh hưởng của vị trí xâm nhiễm đến sự cảm ứng tạo rễ tóc

Trong nghiên cứu này, hai vị trí xâm nhiễm đã được khảo sát trên cây khổ qua rừng *in vitro* 7 ngày tuổi đó là trụ trên và trụ dưới lá mầm. Kết quả thí nghiệm cho thấy khi xâm nhiễm vi khuẩn *A. rhizogenes* ở trụ dưới lá mầm, tỷ lệ cây cảm ứng tạo rễ tóc đạt 69,63%, cho rễ to, phân nhánh và kéo dài nhanh. Trong khi, ở phần trụ trên lá mầm, do thân mảnh, nhỏ nên rễ tạo ra khi xâm nhiễm ở vị trí này có kiểu hình mảnh, nhỏ và sinh trưởng chậm với tỷ lệ cảm ứng chỉ đạt 35,55%. Như vậy, vị trí cảm ứng rễ tóc thích hợp ở cây khổ qua rừng là trụ dưới lá mầm.

3.3. Đánh giá hình thái và sự tăng trưởng các dòng rễ

Sau nhiều lần cấy chuyền và chọn lọc các dòng rễ trên môi trường chứa kháng sinh để loại bỏ vi khuẩn *A. rhizogenes* trên bề mặt rễ, chúng tôi đã thu được 30 dòng rễ có khả năng sinh trưởng nhanh và ổn định. Khi nuôi các dòng rễ này và dòng rễ đối chứng (thu nhận từ rễ của cây khổ qua rừng *in vitro* không chuyển gen) trên môi trường MS rắn và lỏng, chúng tôi ghi nhận được rễ cảm ứng từ cây xâm nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* có màu trắng và sinh trưởng rất nhanh trong khi đó rễ đối chứng sinh trưởng rất chậm và màu sắc chuyển dần sang nâu. Các dòng rễ giả định chuyển gen có nhiều hình thái khác nhau, tuy nhiên được phân loại thành 4 kiểu hình thái chính (Hình 4): (1) dạng rễ tóc mảnh, ngắn, mọc thành chùm;(2) dạng rễ tóc to, thẳng, phân nhánh, (3) dạng rễ tóc xoắn và phân nhánh, (4) dạng rễ tóc tạo mô sẹo và (5) rễ đối chứng (Hình 3) có kiểu hình mảnh, không phân nhánh. Trong 4 kiểu hình thái rễ tóc đạt được thì kiểu hình rễ tóc (2) có khả năng sinh trưởng nhanh hơn so với ba kiểu hình còn lại.Khi tính toán tốc độ tăng trưởng của các kiểu hình rễ trên môi trường MS lỏng (Bảng 3), chúng tôi nhận thấy kiểu hình rễ tóc to, thẳng và phân nhánh có hệ số nhân sinh khối đạt tới 11,73 lần sau 30 ngày nuôi cấy, trong khi với rễ đối chứng hệ số này chỉ đạt được 2,79 lần.

Bảng 2. Ảnh hưởng vị trí xâm nhiễm lên tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tóc khổ qua rừng

Vị trí xâm nhiễm	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tóc (%)	
	ĐC	Mẫu xâm nhiễm
Trên lá mầm	0,00	35,55 ± 0,64[b]
Dưới lá mầm	0,00	69,63 ± 1,61[a]
CV (%)		3,67%

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p = 0,05) giữa các giá trị trung bình.

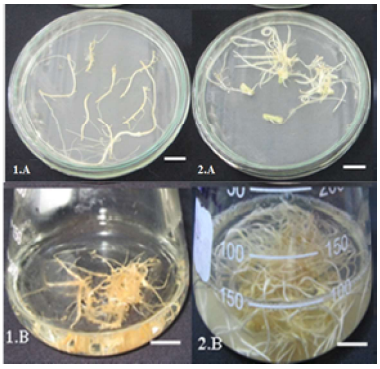
Hình 2. Rễ tóc khổ qua rừng cảm ứng từ cây *in vitro* ở các vị trí xâm nhiễm khác nhau

Ghi chú: 1. Trụ dưới lá mầm, 2. Trụ trên lá mầm. Mỗi thanh ngang ứng với 1 cm.

Bảng 3. Hệ số tăng trưởng của các dòng rễ khổ qua rừng sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường MS lỏng

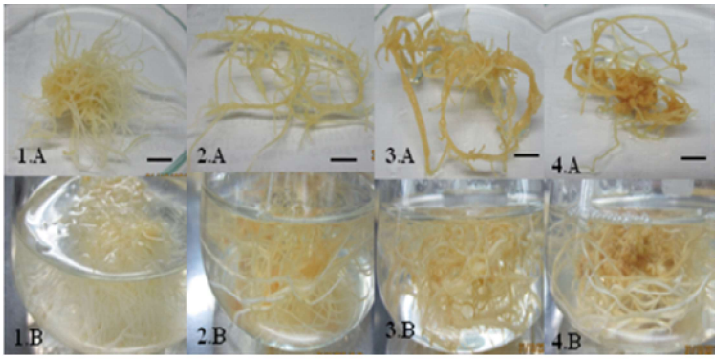
Dòng	Đặc điểm hình thái	Hệ số tăng trưởng
1	Rễ mảnh, nhỏ, mọc thành chùm	9,82 ± 0,42[b]
2	Rễ to, thẳng, phân nhánh	11,73 ± 0,19[a]
3	Rễ xoắn, phân nhánh	9,78 ± 0,34[b]
4	Rễ hình thành sẹo	8,63 ± 0,14[c]
5	Rễ đối chứng	2,79 ± 0,21[d]

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p = 0,05) giữa các giá trị trung bình.



Hình 3. Rễ đối chứng (1), rễ khổ qua rừng giả định chuyển gen (2) trên môi trường MS rắn (A) và lỏng (B)

Ghi chú: Thanh ngang ứng với 1 cm.



Hình 4. Các kiểu hình rễ khổ qua rừng trên môi trường rắn (A) và lỏng (B)

Ghi chú:
1. Dạng rễ mảnh nhỏ, 2. Dạng rễ tóc to, thẳng,
3. Dạng rễ tóc xoắn, 4. Dạng rễ tóc tạo mô sẹo;
Mỗi thanh ngang tương ứng 1 cm.

3.4. Kiểm tra sự biểu hiện của protein e-GFP

Kết quả kiểm tra biểu hiện của protein e-GFP cho 30 dòng rễ (Hình 5 và Bảng 4) cho thấy: Ở cả 4 nhóm kiểu hình rễ đều có tỷ lệ biểu hiện protein e-GFP trong khoảng 41 - 50% và tần số biểu hiện protein e-GFP trung bình cho 4 dòng trung bình đạt 46,7%.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện protein e-GFP

Nhóm	Số dòng rễ	Tổng số mẫu kiểm tra	Số mẫu biểu hiện	Tỷ lệ biểu hiện (%)
1	4	12	5	41,67
2	12	36	18	50,00
3	9	27	13	48,15
4	5	15	7	46,67
Tổng cộng	30	90	42	
Trung bình				46,70

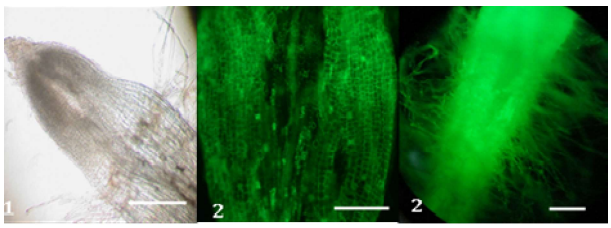
3.5. Kiểm kết quả chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Kết quả điện di sản phẩm gen *rolA* sau khi khuếch đại bằng kỹ thuật PCR cho thấy ở cả 4 dòng rễ tóc đều xuất hiện vạch sáng ở vị trí 307 bp (cùng vị trí với đối chứng dương gen *rolA*). Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *virD* cho thấy chỉ có giếng đối chứng dương có xuất hiện sản phẩm ở vị trí 540 bp, các giếng còn lại đều không có sản phẩm khuếch đại (Hình 6). Từ những kết quả trên có thể kết luận các dòng rễ tóc đã qua kiểm tra được khẳng định là những dòng rễ chuyển gen thực sự bởi sự có mặt của gen *rolA* và sự vắng mặt của gen *virD*. Điều này cũng chứng minh rằng những dòng rễ tóc được tạo ra đã hoàn toàn loại bỏ vi khuẩn bám trên bề mặt tế bào.

4. THẢO LUẬN

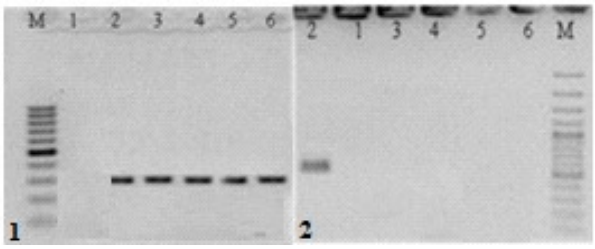
Phương pháp chuyển gen tạo rễ tóc nhanh và hiệu quả là điều kiện tiên quyết trong quy trình nuôi cấy rễ tóc - một hệ thống sản xuất các hợp chất thứ cấp ổn định từ cây thuốc đầy hứa hẹn. Phương pháp chuyển gen "truyền thống" bằng cách ngâm mẫu với dịch khuẩn đã được thực hiện để cảm ứng tạo rễ tóc trên rất nhiều đối tượng. Với cây khổ qua, Thiruvengadam *et al.* (2014) đã sử dụng lá mầm, lá thật, trụ mầm và đốt thân làm nguồn vật liệu để xâm nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes,* tần số biến nạp gen thu được từ 35,5 - 91,5%, tùy vào loại mẫu và chủng vi khuẩn. Trong khi một quy trình chuyển gen được xem là tốt phải đảm bảo tần số chuyển gen không phụ thuộc vào kiểu gen (Geng *et al.*, 2012). Đồng thời, vấn đề còn tồn tại trong phương pháp "truyền thống" là thao tác phức tạp và thời gian kéo dài do phải trải qua nhiều giai đoạn như tiền nuôi cấy mẫu, ủ mẫu với dịch khuẩn, đồng nuôi cấy, diệt vi khuẩn. Đặc biệt giai đoạn diệt khuẩn phải tái rửa mẫu với kháng sinh nhiều lần, điều này gây mất nhiều thời gian, tốn kém và làm giảm sức sống của mẫu do đó tỷ lệ cảm ứng của mẫu tạo rễ tóc bị sụt giảm.

Thực tế, phương pháp xâm nhiễm vi khuẩn lên thân cây con đã được ứng dụng để cảm ứng tạo rễ tóc trên một số đối tượng như cây *Solanum dulcamara* L. (Amani *et al.*, 2011), cây đậu nành (Kereszt *et al.*, 2007; Weber and Zanettini, 2011; Khandual and Reddy, 2014), đu đủ (Nguyen *et al.*, 2010). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào áp dụng phương pháp này với đối tượng khổ qua rừng. Do đó, trong nghiên cứu này, một số yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển nạp gen như độ tuổi của mẫu và vị trí xâm nhiễm (Tazeen and Mirza, 2004) đã được khảo sát với cây khổ qua rừng. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ và chất lượng rễ khi tiến hành xâm nhiễm vi khuẩn vào cây con khổ qua rừng với các độ tuổi và vị trí xâm nhiễm khác nhau. Ở cây 5 ngày tuổi, tỷ lệ mẫu chết khá cao trong khi ở cây 10 ngày tuổi, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ lại thấp. Cây 7 ngày tuổi với vị trí xâm nhiễm ở trụ dưới lá mầm



Hình5. Biểu hiện gen e-GFP ở các dòng rễ tóc khổ qua rừng

Ghi chú: 1. Rễ đối chứng, 2. Rễ tóc. Thang ngang ứng với 100 µm



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR cặp mồi gen rolA (1) và virD (2)

Ghi chú: M: thang chuẩn 1.000 bp, giếng 1: đối chứng âm, giếng 2: đối chứng dương, 3: dòng rễ 1, giếng 4: dòng rễ 2, giếng 5: dòng rễ 3, giếng 6: dòng rễ 4.

cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ đạt 69,63 - 73,33%. Rễ tạo ra ở công thức này có kiểu hình to, phân nhánh mạnh và kéo dài nhanh hơn so với rễ tạo ra khi xâm nhiễm ở trụ trên lá mầm. Với đậu nành - một đối tượng được nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tóc rộng rãi bằng phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn đã cho thấycây5 ngày tuổi cho tần số biến nạp gen là 70% khi tiêm vi khuẩn ở đốt mầm (Khandual and Reddy, 2014) và đạt 100% khi tiêm vi khuẩn ở vị trí trụ dưới lá mầm (Kereszt *et al.*, 2007). Trong khi kết quả từ nghiên cứu của Weber và Zanettini (2011) cho thấy với vị trí xâm nhiễm ở đốt mầm, tần số biến nạp gen chỉ đạt từ 14 - 52% ở cây 4 ngày tuổi. Như vậy, hiệu quả của việc chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* mang gen mục tiêu có mối quan hệ chặt chẽ với độ tuổi và vị trí xâm nhiễm. Điều này có thể giải thích, do cây ở các giai đoạn phát triển khác nhau thì cấu tạo của vách tế bào khác nhau. Khi tế bào trưởng thành, thành phần của vách sẽ bị thay đổi làm vị trí gắn kết của vi khuẩn *Agrobacterium* cũng dần dần mất đi (Ni *et al.*, 1998), ngoài ra còn do sự khác biệt về nồng độ của các chất điều hòa nội sinh ở các vị trí khác nhau trong cùng một mẫu và những mẫu có độ tuổi khác nhau (Karmarkar *et al.*, 2001).

Sự tăng trưởng nhanh chóng của rễ tóc khổ qua rừng có thể là do sự hiện diện của auxin được hình thành với nồng độ cao do các gen *rol* và gen *aux* quy định. Bản chất của sự tăng trưởng này là sự kích thích mạnh của auxin lên sự phân chia tế bào (Geng *et al.*, 2012). Đồng thời, có sự đa dạng về kiểu hình rễ tóc là do sự biểu hiện đồng thời hoặc riêng lẻ của các gen *rolA*, *rolB* and *rolC* nằm trên T-DNA dẫn đến sự thay đổi quá trình trao đổi chất hay tỷ lệ của auxin trong tế bào được chuyển gen (Gelvin, 2003). Ngoài ra một số yếu tố khác cũng ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen như mối tương tác gen, sự sắp xếp lại gen, số bản sao hoặc sự hợp nhất của gen vào tế bào chủ (Chan and Choo, 2004).

Trong nghiên cứu này, gen *e-gfp* được sử dụng như một chỉ thị phân tử để đánh giá sơ bộ khả năng chuyển nạp gen của vi khuẩn *A. rhizogenes* TR7 vào cây khổ qua rừng. Do có độ tương đồng lớn, giữa các vùng gây độc của 2 plasmid nên gen *e-gfp* nằm trên vùng T-DNA của plasmid pPE113 sẽ cùng đi vào tế bào thực vật với T-DNA của plasmid Ri (Simpson *et al.*, 1986). Do đó, thông qua khả năng biểu hiện của gen *e-gfp* ở các dòng rễ giả định chuyển gen, có thể nhận xét phương pháp chuyển gen tạo rễ tóc khổ qua rừng thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* TR7 có khả năng thành công với tần số biến nạp gen là 46,67%. Bên cạnh đó, 4 dòng rễ tóc đại diện cho 4 nhóm kiểu hình đều cho kết quả dương tính với gen *rolA* và âm tính với gen *virD* - một gen gây độc có mặt ở vùng gen *vir* trên Ri-plasmid của vi khuẩn và không được chuyển vào tế bào genome thực vật trong quá trình xâm nhiễm.

Như vậy, nghiên cứu này đã thiết lập được quy trình chuyển gen đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả cho đối tượng cây khổ qua rừng. Sau khi xâm nhiễm với vi khuẩn, cây cảm ứng tạo rễ tóc khá nhanh, chỉ sau 7 - 10 ngày tiêm vi khuẩn đã có khối u hình thành tại vị trí xâm nhiễm và sau 14 ngày thì rễ bắt đầu nhú ra từ khối u, kéo dài rất nhanh và xuất hiện rất nhiều lông hút màu trắng đục bao quanh rễ. Đây là quy trình chuyển gen tạo rễ tóc đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả vì không phải sử dụng kháng sinh sau khi đồng nuôi cấy và số lần cấy truyền để khử khuẩn ít hơn so với khi xâm nhiễm mẫu mô với dịch khuẩn.

5. KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được, chúng tôi nhận xét đây là một quy trình chuyển gen nhanh chóng, cho hiệu quả cao trong việc cảm ứng tạo rễ tóc khổ qua rừng đã được thiết lập bằng cách tiêm vi khuẩn vào phần trụ dưới lá mầm của cây *in vitro* 7 ngày tuổi. Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tóc đạt từ 69,63 - 73,33%. Với tần suất biến nạp gen *e-gfp* 46,7%, 30 dòng rễ tóc khổ qua rừng thuộc 4 nhóm kiểu hình rễ khác nhau đã được tạo ra. Kiểm tra PCR với 4 dòng rễ đại diện cho 4 nhóm kiểu hình cho phản ứng dương tính với gen mục tiêu *rolA* và âm tính với gen *virD*. Các dòng rễ tóc thu nhận được sinh trưởng tốt trên môi trường dinh dưỡng không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, điều này mở ra triển vọng loại bỏ hoàn toàn các chất kích thích dùng

cho ngành sản xuất sinh khối và các hợp chất thứ cấp từ tế bào thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amani MM, Stanley GD, Robert JN and Alexander IG (2011). Transformed Root Cultures of *Solanum dulcamara* L.: A Model for Studying Production of Secondary Metabolites. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, INTECH Open Access Publisher, DOI: 10.5772/23640.

Bourinbaiar AS, Lee-HuangS (1996). The activity of plant derived antiretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun., 219: 923-929.

Chan KL, Choo CY (2004). Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifoliaJack* using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum*. J Ethnopharmacol, 92(2-3): 223-227.

Chiu WL, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, and Sheen J (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. Curr. Biol., 6: 325-330.

GelvinSB (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. Microbiol Mol Biol Rev, 67(1): 16-37.

Geng L, Niu L, Peter M, Gresshoff, Shu C, Song F, Huang D, Zhang J (2012). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult, 109: 491-500.

Grover JK, Yadav SP (2004). Pharmacological actions and potentialuses of *Momordica charantia*: a review". J Ethnopharmacol, 93: 123-132.

Guillon S, Mouillaux-Guiller JT, Pati PK, Rideau Mand Gantet P (2006). Hairy root research: Recent scenario and exciting prospects.Plant Biology, 9: 341-346.

Karmarkar SH, Keshavachandran R, Nazeem PAand Girija D (2001). Hairy root induction in *Adapathiyan* (Holostemma ada-kodien K. Schum.). Journal of Tropical Agriculture, 39: 102-107.

Kereszt A, Lii D, Indrasumunar A, Nguyen CDT, Nontachaiyapoom S, Kinkema M, Gresshoffl PM (2007).*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. Nature Protocol, 2(4): 948-952.

Khandual S, Reddy PM, (2014). Rapid, Efficient and High-Performance Protocol for *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Hairy Root Transformation of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris)*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 5: 333-339.

Nguyen NK, McCafferty H, Aoki A, Nishijima W, Zhu YJ (2010). *Agrobacteriumrhizogenes* Generates Transgenic Hairy Roots in. *Caricapapaya* L.: A new approach for studying and improving resistance to the root-rot pathogen, Phytopthora palmivora. Transgenic Plant Journal, 4(1): 94-96.

Ni WC, Zhang ZL, and Guo SD (1998). Development of transgenic insect-resistant cotton plants. Sci Agric Sin., 31: 8-13.

Quan LT, Adnyanam IK, Tezuka Y, Nagaoka T, Tran QK, and Kadota S (2001). Triterpene Saponins from Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis*) and Their Hepatocytoprotective Activity. J. Nat. Prod., 64(4): 456-461.

Simpson RB, Spielmann A, Margossian L, McK night TD(1986). "A disarmef binary vector from agrobacterium tumefaciens functions in *Agrobacterium rhizogenes*". Plant Mol Biol., 6: 403-415.

Tazeen S and Mirza B (2004). Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Vigna radiata* (L.). Wilczek. Pak. J. Bot., 36(4): 887-896.

Thiruvengadam M, Praveen N, John KM, Yang SY, Kim HK, Chung M (2014). Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities. Plant Cell Tiss Organ Cult, 118: 545-557.

Weber RLM and Bodanese-Zanettini MH (2011). Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. Pesq. agropec. bras., Brasília, 46(9): 1070-1075.