NGHIÊN CỨU TẠO RỄ TÓC SÂM NGỌC LINH *Panax vietnamensis* BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN *ROL* NHỜ VI KHUẨN *Agrobacterium rhizogenes*

Hà Thị Loan[1], Dương Hoa Xô[1], Nguyễn Quốc Bình[1], Nguyễn Hoàng Quân[1], Vũ Thị Đào[1*], Nathalie Pawlicki-Jullian[2], Eric Gontier[2]

[1]Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh, *daovu10@gmail.com
[2]Trường Đại học Université Picardie Jules Verne, Cộng hòa Pháp

TÓM TẮT: Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*) là một loài dược liệu quí ở Việt Nam vì có hàm lượng saponin trong thân rễ cao hơn so với những loài sâm cùng chi *Panax*. Biến nạp gen nhằm thay đổi thông tin di truyền giúp cải thiện tạo được những hoạt chất sinh học có giá trị, đặc biệt là dùng vi khuẩn đất *Agrobacterium rhizogenes* chứa gen *rol* cảm ứng tạo rễ tóc. Thí nghiệm đã được tiến hành với hai loại mô khác nhau là lá và cuống lá của cây con *in vitro* làm nguồn lây nhiễm để cảm ứng tạo rễ tóc. Thí nghiệm có thời gian ngâm mẫu 30 phút và thời gian đồng nuôi cấy 72 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ từ mô cuống lá (14,8%) cao hơn mô lá (3,3%); số rễ tạo ra trên mẫu cuống lá (2,8), cao hơn so với mẫu lá (1,6). Thời gian mẫu cuống lá cảm ứng tạo rễ là 5 tuần, trong khi đó với mẫu lá là trên 6 tuần. Điện di sản phẩm PCR cho thấy gen *rolC* được chuyển vào tế bào sâm. Kết quả phân tích những rễ tóc này trên sắc kí UFLC cũng khẳng định sự hiện diện của 3 hoạt chất saponin đặc trưng trong sâm ngọc linh là MR2, Rb1 và Rg1. Rễ tóc sinh trưởng tốt trong môi trường nuôi lỏng lắc và loại bỏ các chất điều hòa sinh trưởng trong nhân sinh khối rễ sâm giúp giảm được những ảnh hưởng không mong muốn đến sức khỏe người sử dụng và tính an toàn của sản phẩm. Nuôi cấy rễ tóc sâm ngọc linh là giải pháp khả thi để sản suất saponin ở quy mô công nghiệp.

Từ khóa: Chuyển gen *rol*, rễ tóc, sâm ngọc linh, vi khuẩn đất.

MỞ ĐẦU

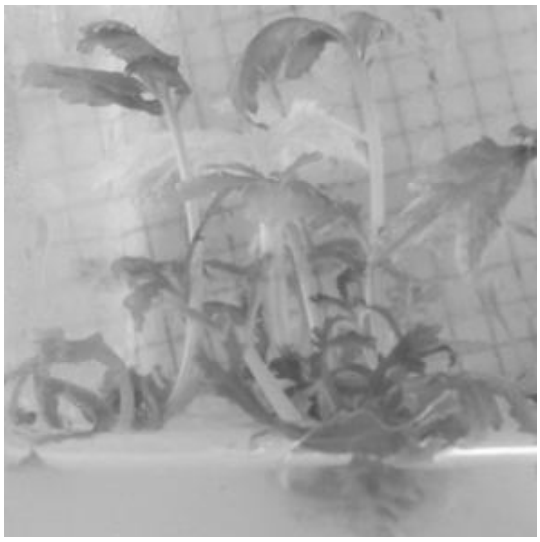
Sâm ngọc linh là một dược liệu quí ở Việt Nam nhờ giá trị về hàm lượng saponin trong thân rễ rất cao [10, 11] và giá trị của chúng đã được khẳng định trong việc bồi bổ sức khỏe con người [12]. Ngoài tự nhiên, chúng phân bố hẹp ở độ cao từ 1500 m trở lên, mọc dưới tán rừng già thuộc quần thể núi Ngọc Linh ở hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum. Tuy nhiên, việc nhân giống và sản xuất sâm ngọc linh ở đây còn nhiều hạn chế do địa hình rừng núi hiểm trở, độ dốc cao, diện tích nhỏ hẹp nên rất khó khăn để mở rộng diện tích trồng trọt [19]. Thêm vào đó, cây sinh trưởng và phát triển chậm, cây trồng sáu năm tuổi mới tích lũy đủ hoạt chất để được khai thác sản phẩm. Vì vậy, việc áp dụng công nghệ sinh học vào sản xuất nhằm cung cấp nguồn nguyên liệu sinh khối là rất cần thiết. Trên thế giới, biến nạp gen nhằm thay đổi thông tin di truyền đã được ghi nhận là công cụ có tiềm năng cải thiện sản xuất những hoạt chất sinh học có giá trị [20], đặc biệt là dùng vi khuẩn *A. rhizogenes* chứa gen *rol* cảm ứng tạo rễ tóc vì gen *rol* mã hóa sinh auxin nội sinh [4, 16, 18]. Những rễ này được tạo ra do sự chuyển gen từ hệ thống vector tự nhiên của tác nhân "gây bệnh" hay "cộng sinh" là *A. rhizogenes* vào tế bào thực vật [22]. Nuôi cấy rễ tóc với những ưu điểm vượt bậc đã được khẳng định là sinh trưởng mạnh, không hướng đất, không phụ thuộc vào chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh, bền vững về mặt di truyền và có khả năng tổng hợp các hoạt chất thứ cấp với hàm lượng cao hơn hoặc bằng cây mẹ [3, 4, 21]. Vì vậy, chiến lược tạo rễ tóc và nhân nuôi sinh khối để thu nhận các hợp chất mang hoạt tính sinh học có giá trị cao từ nguồn gốc thực vật nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học và những nhà kinh doanh. Chọn tạo được một số dòng rễ tóc chứa gen *rol* có khả năng tăng sinh trong môi trường nuôi lỏng lắc không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật là mục tiêu trọng tâm của đề tài.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Dòng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* 15834 được dùng cho việc chuyển gen vào phiến lá và cuống lá cây con *in vitro* sâm ngọc

linh theo quy trình của Bulgakov et al. (1998) [2], chứa plasmid pRi (Ri: root inducing) mang gen *rol* A, B và C. Chủng vi khuẩn này được mua từ Trung tâm sưu tập vi khuẩn BCCM^{TM}/LMG Bacteria Collection, trường Đại học Ghent, Bỉ.

Hình 1. Thân rễ sâm ngọc linh được dùng làm nguồn vật liệu khởi đầu để tái sinh



Hình 2. Cây sâm ngọc linh *in vitro* 3 tháng tuổi dùng làm mẫu để lây nhiễm

Thân rễ (củ) sâm ngọc linh 6 năm tuổi (được cung cấp bởi Trại Dược liệu Trà Linh trực thuộc Công ty Cổ phần dược-Vật tư y tế Quảng Nam) được dùng làm nguồn vật liệu ban đầu để tái sinh cây con (hình 1, 2).

Nuôi cấy vi khuẩn: vi khuẩn lấy ra từ tủ lạnh sâu -80°C được cấy trên môi trường YMB [18] thạch rắn hai lần. Sau đó lấy một khuẩn lạc đơn nuôi trên môi trường YMB lỏng lắc (25-26°C, lắc ở 120-150 rpm, thời gian từ 16-20 h). Hút dịch vi khuẩn ra đo OD ở bước sóng 600 nm, khi chỉ số đạt từ 0,5-0,6 lúc đó lấy dịch vi khuẩn để lây nhiễm.

Tạo nguồn vật liệu để chuyển gen: thân rễ (củ) sâm ngọc linh tươi được rửa sạch, khử trùng và cắt nhỏ thành từng lát mỏng có kích thước 3×5 mm rồi đưa vào môi trường tái sinh khởi tạo mô sẹo, lấy mô sẹo tái sinh thành phôi, rồi tái sinh phôi thành cây con *in vitro*. Khi cây con đạt khoảng 2 đến 3 tháng tuổi (hình 2), cắt lá và cuống lá có kích thước 8-10 mm để lây nhiễm với vi khuẩn.

Khảo sát loại mô thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tóc: hầu hết các mô và cơ quan thực vật gồm thân, lá hay cuống lá được lây nhiễm đều có khả năng chuyển gen bởi *A. rhizogenes* dẫn đến cảm ứng hình thành rễ tóc. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen phụ thuộc vào sự tương tác giữa vi khuẩn *A. rhizogenes* với từng loại mô, từng loại tế bào [7, 22]. Vì vậy, thí nghiệm được thực hiện nhằm xác định nguồn mẫu phù hợp cho hiệu suất chuyển gen tạo rễ tóc cao. Theo đó, lá và cuống lá của cây con *in vitro* 2-3 tháng tuổi được cắt nhằm tạo vết thương, được sử dụng làm nguồn nguyên liệu ban đầu để lây nhiễm.

Cảm ứng tạo rễ tóc: khi dung dịch vi khuẩn *A. rhizogenes* phát triển đến giữa pha tăng trưởng, lúc này vi khuẩn có sức sống mạnh nhất [1] được dùng để lây nhiễm. Khi nguồn mẫu đã chuẩn bị xong, lấy 30 mẫu lá hoặc 30 mẫu cuống lá lắc chung với 30 mL dịch vi khuẩn trong khoảng thời gian 30 phút (mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần), trong thời gian này thỉnh thoảng lắc nhẹ. Sau đó mẫu được lấy ra, thấm khô bằng giấy lọc vô trùng rồi nuôi trên môi trường đồng nuôi cấy MS, có bổ sung thêm 100 µM Acetosyringone để thúc đẩy quá trình chuyển gen từ tế bào vi khuẩn vào tế bào thực vật, mẫu đặt trong buồng tối 72 giờ, ở nhiệt độ 25°C. Các mẫu sau đó được chuyển sang môi

trường cảm ứng tạo rễ tóc, khử khuẩn và tái sinh (MS/2 + 30 g sucrose + 8 g agar + 300 mg/L cefotaxime, pH 5,8). Định kỳ 7-10 ngày cấy chuyền một lần, quan sát mẫu và sự xuất hiện rễ cũng như tốc độ sinh trưởng của nó để quyết định thời gian tách rễ và cấy chuyển. Mẫu đối chứng là những mảnh cắt được nuôi cấy không lây nhiễm với vi khuẩn cũng được nuôi cấy trên các môi trường tương tự. Sau một thời gian khử khuẩn và nuôi cấy, rễ tóc được sinh ra từ vết thương của mẫu lây nhiễm. Chỉ tiêu theo dõi là phần trăm số mẫu cảm ứng tạo rễ tóc và số rễ tóc tạo ra trên mỗi mẫu sau 5-7 tuần. Mẫu đối chứng là các mảnh mẫu được nuôi cấy không cho lây nhiễm với vi khuẩn, cũng được nuôi cấy trên các môi trường tương tự.

Kiểm tra sự chuyển gen: phương pháp PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu của gen *rolC* để kiểm tra sự chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào thực vật [15] và sự vắng mặt của gen *VirD*2 trong rễ tóc để khẳng định tế bào thực vật đã chuyển gen không bị nhiễm vi khuẩn trên bề mặt tế bào [21]. DNA của rễ sâm ngọc linh và tế bào vi khuẩn được tách chiết theo quy trình của QIAGEN. Cặp mồi khuếch đại đoạn gen *rolC* là rolCF (5'-ATGGCTGAAGACGACCT GTG-3') và rolCR (5'-TAGCCGATTGCAAA CTTGCAC-3'); cặp mồi cho gen *virD*2 là virDF (5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAG-3') và virDR (5'-GACCCAAACATCTCGGCTG-3') [3]. Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích hỗn hợp là 25 µl gồm 1µl DNA bộ gen (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 siêu sạch để đủ thể tích. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *rolC* là biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 54°C trong 30 giây và 72°C trong 60 giây) và 5 phút kéo dài ở 72°C. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *virD*2 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% trong đệm TAE 1X. Gel sau đó sẽ được ngâm với dung dịch nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV.

Định tính saponin trong rễ tóc: rễ tóc khô (1 g) được nghiền nhỏ thành bột mịn và được ngâm trong 50 ml methanol (70%) với thời gian là 60 phút và hỗn hợp được vortex 5000 vòng trong 30 giây. Sau đó thu nhận dung dịch và làm bay hơi dung môi. Mẫu sau khi bay hết dung môi, hòa tan trở lại bằng 1 ml methanol (70%) và tiến hành phân tích trên máy sắc kí UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) tại phòng thí nghiệm Laboratoire de Phytotechnologie của trường Đại học Université Picardie Jules Verne (Cộng hòa Pháp).

Các số liệu được phân tích thô bằng Microsoft Excel 2007 và thống kê bằng phần mềm SPSS 16.0, trắc nghiệm phân hạng theo phương pháp Duncan với độ tin cậy p=0,5.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

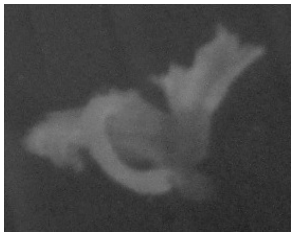
Loại mô thích hợp tạo rễ tóc

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng nguồn vật liệu dùng cho lây nhiễm với vi khuẩn có khả năng cảm ứng chuyển gen khác nhau [3, 7]. Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tóc, số rễ tóc tạo ra trên mỗi mẫu cấy được ghi nhận sau 5 và 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 1. Kết quả cho thấy, các mẫu mô khác nhau được lây nhiễm với vi khuẩn đều cảm ứng ra rễ tóc nhưng với tỷ lệ khác nhau (bảng 1). Trong đó, tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tóc và số rễ tóc được tạo ra ở mẫu cuống lá cao hơn mẫu phiến lá (hình 4 và 3), đối với các mẫu đối chứng đều không hình thành rễ. Khi quan sát hình dạng rễ tóc tạo ra từ các loại mẫu, chúng tôi nhận thấy, các dòng rễ được tạo ra từ phiến lá rất mảnh và ngắn, khi tách ra để tái sinh thì khả năng phân nhánh ít, sức sinh trưởng chậm, trong khi đó các dòng rễ được tạo ra từ những cuống lá có sức sinh trưởng nhanh, khả năng phân nhánh tốt khi được cắt và chuyển sang môi trường tái sinh không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (hình 5, 6). Rễ tóc của sâm ngọc linh thu nhận được có độ dày trung bình khoảng 2-3 mm (hình 6). Hình dạng những rễ tóc này tương đương với những rễ tóc sâm Hàn Quốc thuộc nhóm thứ 4 trong 5 kiểu nhóm rễ tóc được tạo ra khi lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes*, được mô tả bởi Jung et al. (2006) [5]; hoặc sâm Mỹ được mô tả như kiểu hình B trong nghiên cứu của Mathur et al. (2010) [8].

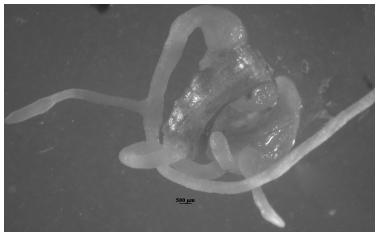
Sự cảm ứng tạo rễ tóc từ mẫu cuống lá cao hơn so với từ phiến lá, từ đó có thể nhận xét quá trình chuyển gen của vi khuẩn vào tế bào sâm ngọc linh ở cuống lá dễ xảy ra hơn so với ở phiến lá. Tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tóc và số rễ từ phiến lá lần lượt là 3,3% và 1,6 rễ. Trong khi đó, trên mẫu cuống lá tỷ lệ này tăng lên là 14,8% và 2,8 rễ. Kim et al. (2008) [6] đã chứng minh rằng chủng *A. rhizogenes* 15834 cho tỷ lệ phần trăm số mẫu cảm ứng tạo rễ tóc trên lá đậu phộng là 36,8% và số rễ tóc tạo ra từ vị trí bị thương là 2,3 rễ. Còn trên mẫu từ trụ hạ diệp thì tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tóc là 75,9% và 6,7 rễ. Shi & Kintzios (2003) [14] cũng ghi nhận đối với cây *Pueraria phaseoloides* có sự cảm ứng tạo rễ tóc từ mẫu cuống lá cao hơn từ mẫu lá và lá mầm. Còn đối với cây *Valeriana sisymbriifolium*, Rahimi et al. (2008) [13] đã chỉ ra mẫu lá và cuống lá sau khi lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tóc cao hơn so với mẫu trụ hạ diệp. Hoàng Thị Thanh Minh và nnk. (2011) [9] cũng nhận thấy sự cảm ứng tạo rễ tóc từ mẫu lá của cây đậu phộng cao hơn so với mẫu trụ hạ diệp, trụ thượng diệp, cuống lá và lá mầm. Trong thí nghiệm của chúng tôi, thời gian cảm ứng của mẫu cuống lá (5 tuần) cũng ngắn hơn so với mẫu phiến lá (6, 7 tuần), như vậy, dùng mẫu cuống lá sâm ngọc linh rút ngắn được thời gian tạo rễ tóc. Qua kết quả thí nghiệm, có thể nhận xét rằng hiệu suất biến nạp gen phụ thuộc vào loại mô, cơ quan hay vị trí xâm nhiễm, nhận xét này phù hợp với nhận xét của Rahimi et al. (2008) [13]. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tóc và số rễ tóc tạo ra trên mỗi mẫu đối với sâm ngọc linh còn thấp hơn nhiều so với một số loài thực vật khác.

Bảng 1. Ảnh hưởng của kiểu mô được lây nhiễm đến sự cảm ứng tạo rễ tóc sâm ngọc linh: tỷ lệ tạo rễ tóc và số rễ tóc được cảm ứng từ các bộ phận khác nhau

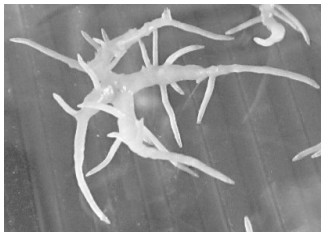
Bộ phận	Thời gian xuất hiện rễ sau lây nhiễm (ngày)	Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tóc (%)	Số rễ tóc tạo ra/mẫu
Lá	42,7±0,4	3,3±0,2	1,6±0,2
CV (%)	1,4	8,7	10,0
Cuống lá	35,0±0,7	14,8±0,4	2,8±0,3
CV (%)	2,9	3,9	7,9



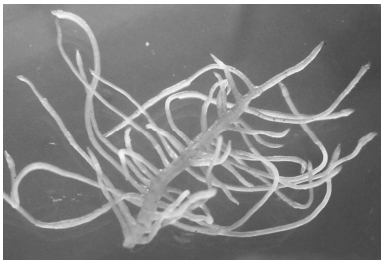
Hình 3. Rễ cảm ứng từ mô lá sau 10 tuần lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* 15834



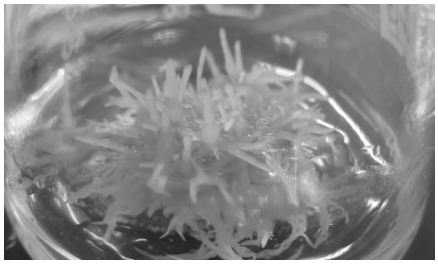
Hình 4. Rễ cảm ứng từ mô thân sau 10 tuần lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* 15834



Hình 5. Một dòng rễ tóc cảm ứng từ mô thân sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường thạch rắn



Hình 6. Rễ tóc được sử dụng vào nuôi cấy trên môi trường lỏng lắc

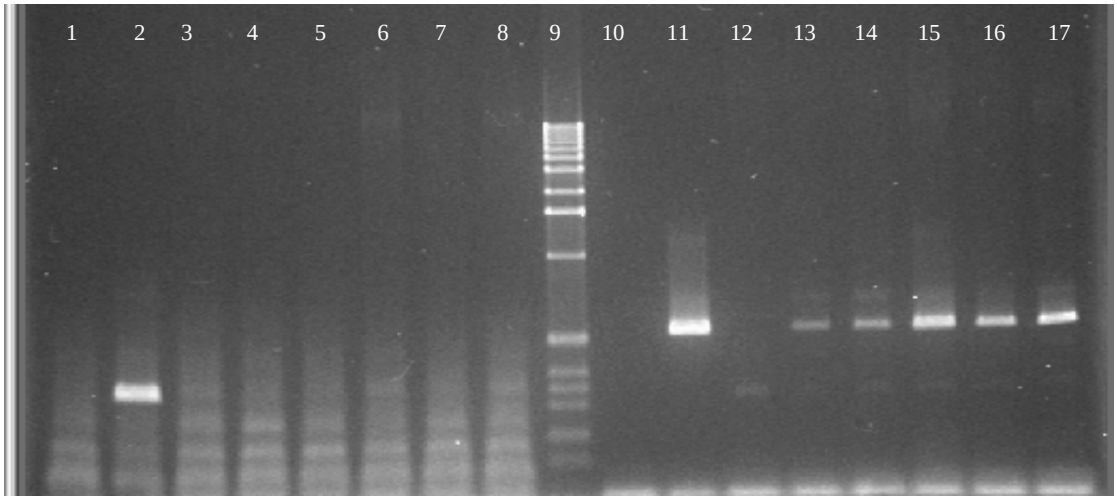


Hình 7. Rễ tóc nuôi trong môi trường lỏng lắc có hệ số nhân là 10 lần sau 8 tuần nuôi cấy

Sau khi tái sinh được một số dòng rễ tóc, chúng tôi đã thử nghiệm nuôi cấy nhằm nhân sinh khối trên những môi trường khoáng khác nhau, kết quả sau 8 tuần nuôi trên môi trường nuôi lỏng lắc, hệ số nhân của rễ tăng lên khoảng 10 lần (hình 7) (bảng số liệu không trình bày trong báo cáo này).

Kiểm tra sự chuyển gen

Sau khi tách chiết DNA của bộ gen rễ tóc sâm ngọc linh, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi mồi *rolCF* và *rolCR* khuếch đại đặc hiệu vùng 520 bp của gen *rolC* và cặp mồi gen *VirDF* và *VirDR* khuếch đại đặc hiệu một trình tự 338 bp của gen *VirD*2. Kết quả điện di sản phẩm PCR của hai cặp mồi gen *rolC* và *VirD*2 cho thấy trình tự mục tiêu của gen *rolC* với chiều dài 520 bp và chiều dài 338 bp của gen *VirD*2 được khuếch đại ở giếng đối chứng dương (pRi plasmid 15834); các giếng chạy sản phẩm PCR của rễ tóc đều có sự hiện diện của vạch phát quang ở vị trí 520 bp (cùng vị trí với đối chứng dương gen *rolC) và* không phát quang ở vị trí 338 bp gen *VirD*2; ngược lại, các giếng đối chứng âm và đối chứng rễ không chuyển gen (rễ bất định) đều không phát quang ở các vị trí này (hình 8).



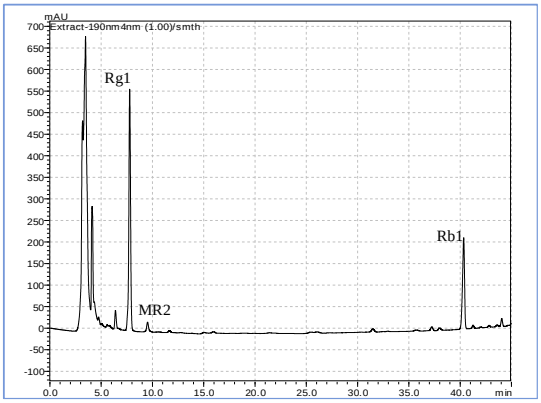
Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp mồi gen *virD*2 (338 bp) và gen *rolC* (520 bp) trên các mẫu rễ chuyển gen và mẫu rễ không chuyển gen

1. Đối chứng âm; 2. Đối chứng dương gen *virD*2; 3. Rễ không chuyển gen; 4,5,6,7,8. Dòng rễ chuyển gen số 1, 2, 10, 16, 35 và 1; 9. Thang chuẩn 1000 bp; 10. Đối chứng âm gen *rolC*, 11. Đối chứng dương *rolC*; 12. Rễ bất định (không chuyển gen); 13,14,15,16,17. Dòng rễ chuyển gen 1, 2, 10, 16 và 35.

Từ kết quả trên có thể kết luận gen *rolC* từ pRi plasmid của *A. rhizogenes* 15834 đã được chuyển vào rễ tóc sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*). Sự vắng mặt của gen *VirD*2 trong những rễ tóc đem phân tích cũng khẳng định rằng vi khuẩn sau khi đem lây nhiễm với nguồn vật liệu ban đầu đã được khử sạch hoàn toàn và không còn sót lại trên bề mặt tế bào rễ chuyển gen.

Định tính saponin bằng phương pháp UFLC

Để khẳng định những dòng rễ tóc chuyển gen thu được thực sự là những dòng rễ bắt nguồn từ những tế bào sâm ngọc linh, chúng tôi đã kiểm tra sự có mặt của ba hoạt chất saponin của sâm ngọc linh, đó là MR2, G-Rg1 và G-Rb1. Qua phân tích dịch chiết của một số dòng rễ tóc chuyển gen trên hệ thống sắc kí UFLC, chúng tôi đã tìm thấy sự hiện diện của ba hoạt chất nói trên, đặc biệt là MR2, chỉ có mặt trong sâm ngọc linh (hình 8). Điều này khẳng định rằng những dòng rễ tóc chuyển gen thu được là những dòng rễ sâm ngọc linh đích thực.



Hình 8. Sắc ký đồ trên UFLC của 1 dòng rễ sâm ngọc linh chuyển gen, saponin Rg1, MR2 và Rb1 được tách chiết bằng dung môi methanol 70%

KẾT LUẬN

Thông qua nghiên cứu này, bước đầu chúng tôi đã thu nhận được một số dòng rễ tóc sâm ngọc linh chuyển gen từ nguồn mẫu lây nhiễm là lá và cuống lá của cây sâm *in vitro*. Đặc biệt là cuống lá sau khi lây nhiễm 5 tuần cho hiệu quả chuyển gen cao hơn so với mẫu lá. Những rễ này được khẳng định là đã thay đổi thông tin di truyền so với rễ không chuyển gen, bằng sự có mặt của gen *rol*C.

Những kết quả thí nghiệm thu được đã khẳng định việc chuyển gen tạo rễ tóc sâm ngọc linh thông qua vi khuẩn trung gian là *A. rhizogenes* 15834. Bước đầu nuôi cấy thành công rễ tóc sâm ngọc linh trên môi trường thạch và trên môi trường nuôi lỏng lắc không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật đã khẳng định hướng đi đúng đắn, nhiều tiềm năng hứa hẹn cho ứng dụng trong nhân sinh khối rễ tóc để thu nhận hoạt chất saponin trong tương lai. Việc không dùng các chất điều hòa sinh trưởng trong nhân sinh khối rễ sâm giúp loại bỏ được những ảnh hưởng không mong muốn đến sức khỏe người sử dụng và tính an toàn của sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Lacoux J., Fliniaux M. A., Jacquin-Dubreuil A., 2000. Tropane alkaloid production by hairy root of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol* A, B, C genes only. J. Biotechnol., 81: 151-158.
2. Bulgakov V. P., Khodakovskaya M. V., Labetskaya N. V., Chernoded G. K., Zhuravlev Y. N., 1998. The impact of plant rolC oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root culture. Phytochem., 49(7): 1929-1934.
3. Diof M. F., Hehn A., Ptak A., Chrétien F., Doerper S., Gontier E., Bourgaud F., Henry M., Chapleur Y., Laurain-Mattar D., 2006. Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L. - Relationships to galanthamine content. Phytochem. Rev., 6: 137-141.
4. Jousse C., Thi Dao Vu, Tran T. L. M., Al Balkhi M. H., Molinié R., Boitel-Conti M., Pilard S., Mathiron D., Hehn A., Bourgaud F., Gontier E., 2009. Tropane alkaloid profiling of hydroponic *Datura innoxia* Mill. plants inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. Phytochem. Analysis, DOI 10.1002/pca.1180.
5. Jung S. M., Kim S. W., Ban S. H., In D. S. Jung J. D., Chung H. J., Liu J. R., Lim Y. P., Choi D. W., 2006. Glutamine accumulation inhibits root growth and lateral root formation in ginseng hairy roots. Plant Sci., 170: 801-807.
6. Kim J. S., Lee S. Y., Park S. U., 2008. Resveratrol production in hairy root of peanut, *Arachis hypogaea L.* transformed with defferent *Agrobacterium rhizogenes* strains. Afr. J. Biotechnol., 7: 3788-3790.
7. Lièvre K., Alain Hehn, Thi Le Minh Tran, Antoine Gravot, Brigitte Thomasset, Frederic Bourgaud, Eric Gontier, 2005. Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta graveolens* L. by an *Agrobacterium* tumefaciens - mediated method. Plant Sci., 168: 883–888.
8. Mathur A., Gangwar A., Mathur A. K., Verma P., Uniyal G. C., Lal R. K., 2010. Growth kinetics and ginsenosides production in transformed hairy root of American ginseng - *Panax quinquefolium* L. Biotechnol. Lett., 32: 457-461.

9. Hoàng Thị Thanh Minh, Quách Ngô Diễm Phương, Bùi Văn Lệ, 2011. Nghiên cứu quy trình chuyển gen tạo rễ tơ *in vitro* cây đậu phộng (*Arachis hypogaea* L.) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* nhằm thu nhận Resveratrol. Tạp chí Công nghệ sinh học, 9(4A): 665-672.

10. Nguyen M. D., Nguyen T. N., Kasai R., Ito A., Yamasaki K., Tanaka O., 1993. Saponins from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) collected in central Vietnam. Chem. Pharm. Bull., 41 (11): 2010-2014.

11. Nguyen M. D., Kasai R., Yamasaki K., Nguyen T. N., Tanaka O., 1999. New dammarane saponins from Vietnamese ginseng. Studies in Plant Science, 6: 77-82.

12. Quan L. T., I Ketut Adnyana, Yasuhiro Tezuka, Takema Nagaoka, Qui Kim Tran, and Shigetoshi Kadota, 2001. Triterpene saponins from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*) and their Hepatocytoprotective hepatocytoprotective Activityactivity. J. Nat. Prod., 64(4): 456-461.

13. Rahimi K., Haghbeen K., Marefatjo J., Jazii F. R., Sheikhani R., 2008. Successful production of hairy root of *Valeriana sisymbriifolium* by *Agrobacterium rhizogenes*. Biotechnol., 7: 200-204.

14. Shi H. P., Kintzios S., 2003. Genetic transformation of Pueraria phaseoloides with *Agrobacterium rhizogenes and* peurarin production in hairy root. Plant Cell Rep, 21: 1103-1107.

15. Sinkar V. P., White F. F., Gordon M. P., 1987. Molecular biology of Ri-plasmid. J. Biosci. - Indian Acad. Sci., 11: 47-57.

16. Srivastava S., Srivastava A. K., 2007. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. Crit. Rev. Biotechnol., 27(1): 29-43.

17. Subba Rao N. S., 1977. In: Soil Microorganisms and Plant Growth. New Delhi, India: 1942p.

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

19. Nguyen Trung Thanh, Nguyen Van Ket, Paek Kee Yoeup, 2007. Effecting of medium composition on biomass and ginsenoside production in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., VNU Journal of Science, Natural Sciences and Technology, 23: 269-274.

20. Tripathi L. N., Tripathi J. N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Trop. J. Pharma. Res., 2: 243-253.

21. Vanhala L., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K. M., 1995. Virulence of different *Agrobacterium* strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus*. Plan Cell Rep., 14: 236-240.

22. Veena V., Taylor C. G., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 43: 383-403.

STUDY ON OBTAINING OF HAIRY ROOT OF *Panax vietnamensis* BY USING *rol* GENE TRANSFORMATION VIA *Agrobacterium rhizoge*nes

Ha Thi Loan[1], Duong Hoa Xo[1], Nguyen Quoc Binh[1], Nguyen Hoang Quan[1], Vu Thi Dao[1], Nathalie Pawlicki-Jullian[2], Eric Gontier[2]

[1]Biotechnology Center of Ho Chi Minh City
[2]Universite de Picardie Jules Verne, France

SUMMARY

Having the higher saponin content in comparison with other plants of the genus Panax, *Panax vietnamensis* has been considered as one of the most valuable medical plants in Vietnam. Using *Agrobacterium rhizogenes* to transfer *rol* gene to increase hairy root formation is a high potential method in producing secondary metabolites in this plant. The experiment was conducted on 2 different kinds of tissues of *in vitro* seedling including leaves and petioles. These tissues were used as source of infection. The purpose of this experiment is to induct hairy root by using *Agrobacterium rhizogenes* to transfer *rol* gene to these tissues. Leaves and petioles of *in vitro* plantlets were infected and incubated in 30 mins, then cultured for 72 hrs. The result showed that the hairy root induction rate and the number of roots were higher in petiole tissues compared with those in leaf tissues (14.8%, 2.8% and 3.3%, 1.6% respectively). Hairy root induction in petiole tissues was in 5 weeks and that in leaves tissues was in 6 weeks. The presence of *rol*C in produced hair roots was confirmed by PCR. Secondary metabolite analysis of transgenic plants also showed the presence of MR2, Rb1 and Rg1 which are typically active elements in*Panax vietnamensis.* Liquid culture with shaking is the most suitable condition for proper hairy root development. The success of promoting root formation in our study will be potential to produce saponin in industrial scale.

Keywords: Agrobacterium rhizogenes, Panax vietnamensis, rol genes, saponin.

Ngày nhận bài: 15-7-2013