

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

BÁO CÁO TÓM TẮT ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CẤP ĐẠI HỌC

Tên đề tài

NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG RỄ TƠ VÀ BIỂU HIỆN GEN LIÊN QUAN ĐẾN TỔNG HỢP FLAVONOID Ở CÂY THỔ NHÂN SÂM (*Talinum paniculatum* Gaertn.)

Mã số: DH2017-TN05-04

Chủ nhiệm đề tài: TS. Vũ Thị Như Trang

THÁI NGUYÊN, 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

BÁO CÁO TÓM TẮT ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CẤP ĐẠI HỌC

Tên đề tài

NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG RỄ TƠ VÀ BIỂU HIỆN GEN LIÊN QUAN ĐẾN TỔNG HỢP FLAVONOID Ở CÂY THỔ NHÂN SÂM (*Talinum paniculatum* Gaertn.)

Mã số: ĐH2017-TN05-04

Xác nhận của tổ chức chủ trì

(Ký, ghi rõ họ tên)

Chủ nhiệm đề tài

TS. Vũ Thị Như Trang

THÁI NGUYÊN, 2019

DANH SÁCH THÀNH VIÊN THAM GIA ĐỀ TÀI**I. Danh sách thành viên**

STT	Họ và tên	Đơn vị công tác
1	Chu Hoàng Mậu	Khoa sinh học, ĐH Sư phạm Thái Nguyên
2	Nguyễn Thu Hiền	Bộ môn Sinh học, ĐH Y Dược Thái Nguyên
3	Nguyễn Huy Hoàng	Bộ môn Sinh học, ĐH Y Dược Thái Nguyên
4	Bùi Thị Hà	Bộ môn Sinh học, ĐH Y Dược Thái Nguyên
5	Phó Thị Thúy Hằng	Bộ môn Sinh học, ĐH Y Dược Thái Nguyên

II. Đơn vị phối hợp thực hiện

1. Khoa Sinh học, Trường ĐH Sư phạm, ĐH Thái Nguyên
2. Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung

- Tên đề tài: “Nghiên cứu tạo dòng rễ tơ và biểu hiện gen liên quan đến tổng hợp flavonoid ở cây Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum* Gaertn.)”
- Mã số: ĐH2017-TN05-04
- Chủ nhiệm đề tài: TS. Vũ Thị Như Trang
- Tổ chức chủ trì: Trường Đại học Y Dược – Đại học Thái Nguyên
- Thời gian thực hiện: Từ tháng 01 năm 2017 đến tháng 12 năm 2018

2. Mục tiêu

Xây dựng được hệ thống tái sinh đa chồi *in vitro* và tạo được dòng rễ tơ nhằm tăng sinh khối phục vụ khai thác một số dược chất từ cây Thổ nhân sâm; Chiết rút và so sánh được hàm lượng flavonoid từ dòng rễ tơ với rễ cây Thổ nhân sâm trồng tự nhiên cùng thời điểm; Biểu hiện được gen *chalcone isomerase* (*GmCHI*) và tạo được dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen có hàm lượng flavonoid cao hơn cây đối chứng không chuyển gen.

3. Tính mới và sáng tạo

Kết quả nghiên cứu trong đề tài là cơ sở ứng dụng kỹ thuật tạo dòng rễ tơ và chuyển gen vào việc nâng cao hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học ở cây Thổ nhân sâm và một số loại cây dược liệu khác. Các dòng rễ tơ và dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen làm vật liệu cho chọn giống Thổ nhân sâm có hàm lượng flavonoid cao.

4. Kết quả nghiên cứu

4.1. Lá mầm là vật liệu nhận gen thích hợp trong kỹ thuật chuyển gen ở cây Thổ nhân sâm. Môi trường MS cơ bản + 50 ml/l nước dừa + 1,5 mg/l BAP là thích hợp cho sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ nách lá mầm.

Lần đầu tiên biểu hiện thành công gen *GmCHI* có nguồn gốc từ cây đậu tương ở cây Thổ nhân sâm. Từ 730 mẫu biến nạp tạo được 28 cây chuyển gen *GmCHI* trong điều kiện nhà lưới. Protein tái tổ hợp *GmCHI* đã được biểu hiện ở hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1-2.2 và T1-10 ở thể hệ T1 với hàm lượng lần lượt là 6,14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ và 4,29 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1-2.2 và T1-10 có hàm lượng flavonoid tổng số tăng 7,4 lần và 4,8 lần so với cây đối chứng không chuyển gen.

4.2. Mô lá là vật liệu thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm. Lây nhiễm mô lá bởi *A. rhizogenes* với $\text{OD}_{600} = 0,6$; nồng độ AS 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$; thời gian nhiễm khuẩn 10 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày; nồng độ cefotaxime 500 mg/l là những điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm và 5/7 dòng rễ tơ đã được tạo ra. Môi trường MS ở trạng thái lỏng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nuôi trong điều kiện lác là thích hợp cho sự tăng trưởng rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm. Dòng rễ tơ chuyển gen số 8 có hàm lượng flavonoid cao nhất (2,34 mg/g) tăng 520 % so với rễ bất định của cây Thổ nhân sâm.

5. Sản phẩm

5.1. Sản phẩm khoa học

- Số bài báo đăng trên Tạp chí quốc tế trong hệ thống ISI (SCI-E; SCImago: Q2): 01 bài

1. Thi Nhu Trang Vu, Thi Hong Trang Le, Phu Hiep Hoang, Danh Thuong Sy, Thi Thu Thuy Vu, Hoang Mau Chu (2018), “Overexpression of the *Glycine max* chalcone isomerase (*GmCHI*) gene in transgenic *Talinum paniculatum* plants”, *Turk J Bot*, 42, pp. 551 – 558 (SCI-E; SCImago: Q2).

- Số bài báo đăng trên Tạp chí quốc gia: 04 bài

1. Vũ Thị Như Trang, Hồ Mạnh Tường, Lê Văn Sơn, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2018), “Đặc điểm hình thái cây Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum*) và trình tự nucleotide vùng ITS, gen *rpoCl* và *rpoB*”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16(3), tr. 451- 458.

2. Vũ Thị Như Trang, Chu Hoàng Mậu (2018), “Sử dụng mã vạch *matK* để nhận diện mẫu Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum*) thu tại một số địa phương phía bắc Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ ĐH Thái Nguyên*, 184(08), tr. 101-106.

3. Vũ Thị Như Trang, Chu Hoàng Mậu (2017), “Nghiên cứu tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm Việt Nam (*Talinum paniculatum* Gaertn.)”, *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội*, 33, tr. 233 - 241.

4. Vũ Thị Như Trang, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2017), “Phát triển hệ thống tái sinh *in vitro* phục vụ chuyển gen ở cây Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum* Gaertn.)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ ĐH Thái Nguyên*, 161(01), tr. 73 - 79.

5.2. Sản phẩm đào tạo

- Là một phần số liệu của đề tài NCS:

Vũ Thị Như Trang, (2019), “Nghiên cứu biểu hiện gen *GmCHI* liên quan đến tổng hợp flavonoid và cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum*)”, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Thái Nguyên.

6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu

- Đề tài có thể được sử dụng làm tài liệu tham khảo trong học tập, giảng dạy phần sinh học.

- Sản phẩm của đề tài được sử dụng làm cơ sở ứng dụng nâng cao hàm lượng flavonoid trong cây Thổ nhân sâm bằng kỹ thuật chuyển gen phục vụ cho y dược học.

Ngày 20 tháng 9 năm 2019

Tổ chức chủ trì

(ký, họ và tên, đóng dấu)

Chủ nhiệm đề tài

(ký, họ và tên)

Vũ Thị Như Trang

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information

Project title: “*THE STUDY ON THE INDUCTION OF HAIRY ROOT AND THE EXPRESSION OF GmCHI GENE INVOLVED IN FLAVONOID SYNTHESIS IN TALINUM PANICULATUM*”.

Code number: DH2016 - TN05 - 04

Coordinator: MS. Vu Thi Nhu Trang

Implementing institution: Thai Nguyen University of Medicine and pharmacine

Duration: from 01-2017 to 12- 2018

2. Objective (s)

Establish an *in vitro* multi-shoot regeneration system and create hairy roots line to increase biomass for the extraction of some pharmaceuticals from *Talinum paniculatum*. Extract and compare the flavonoid content from the hairy roots line with the wild-type plants roots grown naturally at the same time. Overexpressed chalcone isomerase (*CHI*) in the *T. paniculatum* and created transgenic *T. paniculatum* lines with higher flavonoid content than the wild-type plants.

3. Creativeness and innovativeness

The research results of the dissertation will be the basis for applying the technique of creating hairy roots and transgenic plants to improve the pharmaceutical content in *T. paniculatum* and some other medicinal plants. The hairy roots and the transgenic *T. paniculatum* lines provide materials for selecting *T. paniculatum* varieties with high flavonoid content.

4. Research results

4.1. The cotyledonary and the lateral shoot bud explants are suitable material to create multiple shoots in *T. paniculatum*. The MS medium supplemented with 50 ml/l coconut water + 1,5 mg/l BAP is the suitable for shoot emergence and growth from axillary cotyledons. The MS medium supplemented with 50 ml/l coconut water + 2.0 mg/l BAP is the suitable for shoot emergence and growth from the lateral shoot bud explants.

The cotyledons are suitable materials to create *multiple shoot* for gene transfer in *T. paniculatum* plants. From a total of 730 samples, 28 *GmCHI* transgenic plants were survived in the greenhouse. Recombinant CHI protein was expressed successfully in two transgenic *T. paniculatum* lines of T1-2.2 and T1-10 in the T1 generation with contents of 6.14 µg/mg and 4.29 µg/mg, respectively.

Two transgenic *T. paniculatum* lines of T1-2.2 and T1-10, that contain 4.24 mg/g and 2.74 mg/g of flavonoid, respectively, which reflect increases of 7.4-fold and 4.8-fold, respectively, compared to that in wild-type plants.

4.2. Leaf tissue is a suitable material for transforming and inducing hairy roots in *T. paniculatum*. Density of bacteria corresponding to OD₆₀₀ value=0.6; concentration AS 100 µmol/l; Infection time of 10 minutes; 2 days of co-culture; cefotaxime concentrations of 500 mg/l are suitable conditions for inducing hairy roots from leaf tissue. In state of the liquid MS medium without growth regulator, shaking culture conditions are suitable for hairy roots growth in *T. paniculatum*. The transgenic hairy roots line 8 had the highest flavonoid content (2.34 mg/g), an increase of 520 % compared to the indeterminate root of the *T. paniculatum*.

5. Products

5.1. Science

1. Thi Nhu Trang Vu, Thi Hong Trang Le, Phu Hiep Hoang, Danh Thuong Sy, Thi Thu Thuy Vu, Hoang Mau Chu (2018), “Overexpression of the *Glycine max* chalcone isomerase (*GmCHI*) gene in transgenic *Talinum paniculatum* plants”, *Turk J Bot*, 42, pp. 551 - 558.
2. Thi Nhu Trang Vu, Manh Tuong Ho, Van Son Le, Thi Tam Nguyen, Hoang Mau Chu (2018), “Morphological characteristics of *Talinum paniculatum*, and nucleotide sequences of *ITS* region, *rpoC1* and *rpoB* genes”, *Journal of Biotechnology*, 16(3), pp. 451- 458.
3. Vu Thi Nhu Trang, Chu Hoang Mau (2018), “Use of *matK* DNA barcode for identification of *Talinum paniculatum* collected in northern provinces of Vietnam”, *Journal of Science and Technology – TNU*, 184(08), pp. 101-106.
4. Vu Thi Nhu Trang, Chu Hoang Mau (2017), “Establishment of hairy rootlines in Vietnamese fameflower plant (*Talinum paniculatum*), *VNU Journal of Science*, 33, pp. 233-241.
5. Vu Thi Nhu Trang, Nguyen Thi Tam, Chu Hoang Mau (2017), “The development *in vitro* regeneration system for gene transfer in *Talinum paniculatum* plants”, *Journal of Science and Technology – TNU*, 161(01), pp. 73-79.

5.2. Educase

- Is part of the data of the PhD:

Vu Thi Nhu Trang (2019), “*The study on the expression of GmCHI gene involved in flavonoid synthesis and induction of hairy root in Talinum paniculatum*”, Doctoral dissertation of Biology, College of Education, Thai Nguyen University

6. Transfer alternatives, application institutions, impacts and benefits of research results

- The topic can be used as a reference in learning, taught biology.
- The product of the topic is used as a basis for application overexpress flavonoid in *Talinum pniculatum* by genetic engineering for medicine.

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Thỏ nhân sâm (*Talinum paniculatum*) là loại cây thân thảo được biết đến với giá trị dược liệu cao. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Thỏ nhân sâm cho thấy, trong lá và rễ có rất nhiều các hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau như: alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, phytosterol, phytol; trong đó các phytol chiếm tỷ lệ cao (69,32 %). Từ lâu, Thỏ nhân sâm đã được sử dụng trong y học cổ truyền, đặc biệt là trong điều trị bệnh tiểu đường type 2, viêm da, rối loạn tiêu hóa, yếu sinh lý và rối loạn sinh sản. Galactogue trong lá có tác dụng chống viêm, kích thích tăng tiết sữa ở phụ nữ cho con bú và có khả năng chữa bệnh viêm loét. Rễ của cây Thỏ nhân sâm được sử dụng để thúc đẩy khả năng sinh sản và chữa các bệnh phụ khoa như bất thường trong chu kỳ kinh nguyệt. Steroid saponin trong rễ cây Thỏ nhân sâm có tác dụng phòng và chữa bệnh xơ vữa động mạch, đồng thời còn là nguyên liệu để tổng hợp nên hormone sinh dục.

Flavonoid là một hợp chất có vai trò quan trọng đối với con người như có tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ gan, kháng khuẩn, chống viêm, chống ung thư... Tuy nhiên, chưa thấy nghiên cứu về thu nhận flavonoid ở cây Thỏ nhân sâm vì hàm lượng flavonoid ở các loài thuộc chi *Talinum*, trong đó có cây Thỏ nhân sâm rất thấp. Vấn đề đặt ra là làm thế nào để nâng cao hàm lượng flavonoid ở các loài thuộc chi *Talinum* nói chung và cây Thỏ nhân sâm (*T. paniculatum*) nói riêng để có thể sử dụng trong chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Cho đến nay, đã có một số cách tiếp cận chủ yếu được áp dụng đối với cây dược liệu để làm tăng hàm lượng flavonoid. Đó là sử dụng phương pháp chọn lọc từ quần thể hoặc lai hữu tính hay đột biến thực nghiệm, từ đó chọn lọc các dòng cây có hàm lượng flavonoid cao. Tuy nhiên, đối với cây Thỏ nhân sâm chưa thấy công bố nào về ứng dụng phương pháp này để nâng cao hàm lượng flavonoid; nhưng việc ứng dụng công nghệ sinh học thực vật như chuyển gen và nuôi cấy mô tế bào thực vật ở cây dược liệu đã được quan tâm và mang lại hiệu quả cao trong thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó có flavonoid.

Ở thực vật, flavonoid được tổng hợp qua đường phenylpropanoid, chuyển phenylalanine thành 4-coumaroyl-CoA và sau đó 4-coumaroyl-CoA sẽ đi vào quá trình tổng hợp flavonoid. Có rất nhiều các enzyme tham gia vào con đường tổng hợp flavonoid như phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase, 4-Coumarate CoA ligase, chalcone synthase, chalcone isomerase... Trong đó, chalcone isomerase (CHI) là enzyme chìa khóa trong quá trình sinh tổng hợp flavonoid bằng việc xúc tác cho phân tử naringenin chalcone mạch hở được đóng vòng để hình thành các naringenin. Sau đó, hợp chất này sẽ được chuyển hóa thành nhiều loại flavonoid chính như flavanone, flavonol và anthocyanin. Do vậy, biểu hiện mạnh gen mã hóa enzyme CHI sẽ làm tăng hoạt độ của enzyme chìa khóa CHI và hàm lượng các loại flavonoid trong cây chuyển gen sẽ được cải thiện.

Ngoài ra, Thỏ nhân sâm là loài cây có rễ củ, nhiều hợp chất thứ cấp được tập trung ở rễ, trong đó có flavonoid. Do vậy, để tăng thu nhận flavonoid ở cây Thỏ nhân sâm, cách tiếp cận ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật bằng phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ nhằm tăng sinh khối cũng được quan tâm nghiên cứu. Khi mô thực vật (lá, đoạn thân, lá mầm...) bị lây nhiễm *Agrobacterium rhizogenes* thì T-DNA trong cấu trúc Ri-plasmid mang các gen *rol* và các gen mã hóa sinh tổng hợp auxin loại IAA sẽ được chuyển vào mô thực vật. Sự biểu hiện đồng thời của các gen *rol* và các gen tổng hợp auxin sẽ tạo nên kiểu hình rễ tơ ở mô tế bào thực vật được lây nhiễm *A. rhizogenes*.

Xuất phát từ những cơ sở trên chúng tôi đã chọn và tiến hành đề tài: “**Nghiên cứu tạo dòng rễ tơ và biểu hiện gen liên quan đến tổng hợp flavonoid ở cây Thỏ nhân sâm (*Talinum paniculatum* Gaertn.)**”.

2. Mục tiêu đề tài

- (i) Xây dựng được hệ thống tái sinh đa chồi *in vitro* ở cây Thổ nhân sâm;
- (ii) Tạo được dòng rễ tơ có hàm lượng flavonoid cao hơn rễ cây Thổ nhân sâm trồng tự nhiên cùng thời điểm;
- (iii) Biểu hiện được gen chalcone isomerase (CHI) và tạo được dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen có hàm lượng flavonoid cao hơn cây đối chứng không chuyển gen.

3. Nội dung nghiên cứu

(i) Nghiên cứu tái sinh đa chồi *in vitro* ở cây Thổ nhân sâm

- Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện khử trùng, các chất kích thích sinh trưởng đến sự tái sinh đa chồi, ra rễ *in vitro* và giá thể thích hợp đưa cây ra môi trường tự nhiên.

(ii) Tạo dòng rễ tơ *in vitro* và so sánh hàm lượng flavonoid ở các dòng rễ tơ với rễ cây Thổ nhân sâm trồng tự nhiên

- Nghiên cứu cảm ứng tạo dòng rễ tơ từ cây Thổ nhân sâm nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*;
- Nghiên cứu chiết rút flavonoid từ các dòng rễ tơ và rễ của cây Thổ nhân sâm trồng tự nhiên;
- So sánh hàm lượng flavonoid của các dòng rễ tơ so với rễ của cây Thổ nhân sâm trồng tự nhiên.

(iii) Nghiên cứu chuyển gen *GmCHI* và tạo dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen

- Nghiên cứu chuyển cấu trúc mang gen *GmCHI* vào cây Thổ nhân sâm thông qua nách lá mầm và tạo các dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen. Phân tích sự hợp nhất và sự biểu hiện của gen chuyển *GmCHI* ở cây Thổ nhân sâm chuyển gen;
- Phân tích, so sánh hàm lượng flavonoid tổng số trong các dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen và cây không chuyển gen.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Đề tài đã tham khảo và tổng kết 131 tài liệu, trong đó có 6 tài liệu tiếng Việt, 125 tài liệu tiếng Anh về ba vấn đề cơ bản, đó là: (1) Nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* ở cây Thổ nhân sâm; (2) Flavonoid và con đường tổng hợp flavonoid ở thực vật; (3) Enzyme CHI và biểu hiện gen mã hóa CHI.

Cây Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum* Gaertn.) chứa flavonoid và saponin có khả năng chống oxy hóa mạnh và được sử dụng trong điều trị một số bệnh như viêm nhiễm, dị ứng, loét dạ dày... Hiện nay chưa có công trình nghiên cứu công bố hàm lượng flavonoid trong cây Thổ nhân sâm, tuy nhiên, ở loài *Talinum triangulare* đã được xác định có hàm lượng flavonoid rất thấp (khoảng 0,897 mg/g lá tươi) (Afolabi và cs, 2014).

Flavonoid được tổng hợp qua đường phenylpropanoid và chalcone isomerase là enzyme chìa khóa cho sinh tổng hợp flavonoid bằng việc xúc tác cho phân tử naringenin chalcone mạch hở được đóng vòng để hình thành các naringenin. Để cải thiện hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học ở cây Thổ nhân sâm (trong đó có flavonoid), cho đến nay các nghiên cứu chủ yếu tiếp cận theo hướng tăng sinh khối tế bào, rễ tơ. Nghiên cứu của Zhao và cs (2009) đã chỉ ra vật liệu thích hợp và nồng độ các chất kích thích tăng trưởng tối ưu đến sự hình thành mô sẹo, cụm chồi, tỷ lệ ra rễ, tỷ lệ sống sót của cây con trong vườn ươm; Muhallil và cs (2013) đã nghiên cứu cảm ứng tạo rễ của cây Thổ nhân sâm từ mô lá với sự điều chỉnh chất kích thích tăng trưởng auxin trong nuôi cấy *in vitro*. Trong khi đó, Manuhara và cs (2012) đã nghiên cứu ảnh hưởng của việc sục khí và mật độ cấy đến sinh khối rễ tơ của cây Thổ nhân sâm trong bình bioreactor bằng cách biến nạp A.

rhizogenes vào mẫu lá của cây Thổ nhân sâm. Ở Việt Nam, hiện chưa tìm thấy công bố về tạo dòng rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm.

Ngoài cách tiếp cận cải thiện hàm lượng flavonoid bằng ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào tạo sinh khối để tăng thu nhận flavonoid, kỹ thuật biểu hiện mạnh gen mã hóa enzyme chia khóa CHI trong con đường tổng hợp flavonoid cũng được quan tâm nghiên cứu. Trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu biểu hiện mạnh gen *CHI* ở cây Cà chua (Muir và cs, 2001), Thuốc lá (Li và cs, 2006), Mướp đắng (Lin và cs 2014)... Kết quả thu được hàm lượng flavonoid tổng số, flavonol, anthocyanin tăng nhiều lần so với cây đối chứng không chuyển gen. Hiện nay, chưa tìm thấy công trình nghiên cứu chuyển gen *CHI* vào cây Thổ nhân sâm. Do vậy, hướng ứng dụng công nghệ tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme chia khóa trong con đường chuyển hóa tổng hợp flavonoid ở cây Thổ nhân sâm cần được quan tâm và tập trung nghiên cứu.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Hạt và mẫu cây Thổ nhân sâm được thu từ tháng 9/2015 đến tháng 3/2016 tại 5 địa phương: huyện Tân Yên, tỉnh Bắc Giang (BG); thành phố Thái Nguyên (TN1); huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên (TN2); thị xã Sơn Tây, Hà Nội (HT); huyện Hoành Bồ, tỉnh Quảng Ninh (QN). Tiến hành gieo trồng các mẫu Thổ nhân sâm phục vụ nhận diện và tạo nguyên liệu cho các phân tích hình thái và sinh học phân tử.

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

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CV58 mang vector chuyển gen *pCB301-GmCHI* được cung cấp bởi Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được mua từ những hãng nổi tiếng trên thế giới như hãng Fermentas, Bio-Neer, Invitrogen, như Trizol Reagents, kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis, ...; Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen vào cây Thổ nhân sâm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Các thí nghiệm phân tích cây chuyển gen được tiến hành tại phòng Công nghệ ADN ứng dụng, phòng Công nghệ Tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Phương pháp định danh mẫu cây Thổ nhân sâm bằng phương pháp hình thái so sánh theo Phạm Hoàng Hộ (1999), Đỗ Tất Lợi (2004), tra cứu trên <http://www.tropicos.org/Name/26200178> và phương pháp phân loại học phân tử dựa vào một số mã vạch DNA như vùng *ITS*, đoạn gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB*.

2.3.2. Các phương pháp nuôi cấy *in vitro*: (1) Phương pháp khử trùng hạt; Phương pháp tái sinh đa chồi ở cây Thổ nhân sâm; (3) Phương pháp nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm.

2.3.3. Phương pháp chuyển gen *GmCHI* vào cây Thổ nhân sâm qua nách lá mầm nhờ *A.tumefaciens* được tiến hành dựa trên nghiên cứu của Olhoft và cs (2006).

2.3.4. Phương pháp phân tích cây chuyển gen: Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng kỹ thuật PCR. Xác định sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI* vào hệ gen cây Thổ nhân sâm được thực hiện theo phương pháp Southern blot của Southern (1975). Phân tích sự biểu hiện của protein GmCHI tái tổ hợp ở cây Thổ nhân sâm chuyển gen bằng phương pháp điện di theo Laemmli (1970) và

Western blot. Định lượng protein GmCHI tái tổ hợp trong cây chuyển gen bằng ELISA theo phương pháp của Sun và cs (2006). Xác định hàm lượng flavonoid trong cây chuyển gen bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ theo Kalita và cs (2013).

2.3.5. Các phương pháp phân tích, xử lý số liệu: Các số liệu trong nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS để xác định các giá trị trung bình, phương sai, độ lệch chuẩn, sai số trung bình mẫu.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG TÁI SINH ĐA CHÒI *IN VITRO* Ở CÂY THỎ NHÂN SÂM

3.1.1. Kết quả định danh các mẫu Thổ nhân sâm

3.1.1.1. Đặc điểm hình thái các mẫu Thổ nhân sâm thu ở một số địa phương

Kết quả so sánh năm mẫu Thổ nhân sâm thu từ các địa phương (Tân Yên, tỉnh Bắc Giang; thành phố Thái Nguyên; huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên; thị xã Sơn Tây, Hà Nội; huyện Hoành Bồ, tỉnh Quảng Ninh) cho thấy, các mẫu Thổ nhân sâm giống nhau về hình thái, gồm rễ, thân, lá, hoa (Hình 3.1 A). Rễ Thổ nhân sâm là rễ củ, hình trụ và mang nhiều rễ con (Hình 3.1 B). Thân Thổ nhân sâm mọc thẳng, thân màu xanh, chia thành nhiều cành (Hình 3.1 A). Lá mọc so le, hình trứng ngược, hoặc hình thìa hoặc hình muống, không lông, không có lá bẹ, phiến lá dày, hơi thẫm, hai mặt đều bóng, đầu lá nhọn hoặc tù, phía cuống hẹp lại, cuống rất ngắn (Hình 3.1 C). Đầu cành xuất hiện cụm hoa hình chùy nhiều hoa nhỏ, đường kính 6 mm, 5 cánh hoa màu tím nhạt, hơn 10 nhị dài 2 mm, bầu hoa hình cầu, hoa có 2 lá đài (Hình 3.1 D). Quả nhỏ, khi chín có màu xám tro, đường kính ước 3 mm (Hình 3.1 E). Hạt Thổ nhân sâm rất nhỏ, màu đen nhánh hơi dẹt, trên mặt hơi có vân nổi (Hình 3.1 F).



Hình 3.1. Cây Thổ nhân sâm. A: cây Thổ nhân sâm; B: rễ củ; C: cành, lá; D: nụ và hoa; E: quả; F: hạt.

Sau khi đối chiếu các đặc điểm hình thái quan sát được ở các mẫu Thổ nhân sâm với các đặc điểm cây Thổ nhân sâm theo mô tả của Phạm Hoàng Hộ (1999), Đỗ Tất Lợi (2004) và đồng thời tra cứu trên <http://www.tropicos.org/Name/26200178> cho thấy các mẫu Thổ nhân sâm BG, TN1, TN2, HT, QN thuộc cùng loài *T. paniculatum*, chi *Talinum*, họ Rau sam (Portulacaceae).

Tuy nhiên, sử dụng phương pháp hình thái so sánh rất khó xác định được mẫu Thổ nhân sâm khi cây đang trong giai đoạn phát triển (chưa ra hoa) và dễ nhầm lẫn với loài *T. triangulare*. Vì vậy, để có thể tránh được sự nhầm lẫn với các thảo dược khác, cần kết hợp phương pháp hình thái so sánh với việc sử dụng mã vạch DNA trong nhận diện mẫu cây Thổ nhân sâm.

3.1.1.2. Đặc điểm trình tự nucleotide của vùng ITS và đoạn gen matK

Đặc điểm trình tự vùng ITS

Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1 % cho thấy ở cả 5 lần chạy chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng hơn 600 bp, tương ứng với kích thước dự kiến của vùng ITS. Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được vùng ITS có kích thước 643 bp. Bằng BLAST trong NCBI cho thấy vùng ITS phân lập từ 5 mẫu nghiên cứu (*ITS-TN1*, *ITS-TN2*, *ITS-BG*, *ITS-HT*, *ITS-QN*) có tỷ lệ tương đồng là 99 % với ba trình tự vùng ITS cùng loài *T. paniculatum*, mang mã số *JF508608*, *L78094*, *EU410357* trên GenBank; kết quả này đã khẳng định trình tự nucleotide phân lập được là vùng ITS thuộc loài *T. paniculatum*.

Đặc điểm trình tự đoạn gen *matK*

Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1 % cho thấy ở cả 5 lần chạy chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng hơn 800 bp tương ứng với kích thước dự kiến của đoạn gen *matK*. Kết quả giải trình tự nucleotide thu được đoạn DNA của cả 5 mẫu Thổ nhân sâm có kích thước 808 nucleotide. Bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự đoạn DNA phân lập từ 5 mẫu nghiên cứu (*matK-TN1*, *matK-TN2*, *matK-BG*, *matK-HT*, *matK-QN*) có tỷ lệ tương đồng 99 % với 3 trình tự gen *matK* cùng loài *T. paniculatum*, mang mã số *AY015274*, *KY952520*, *GQ434150* trên GenBank, kết quả này đã cho thấy trình tự nucleotide phân lập được là đoạn gen *matK* của loài *T. paniculatum*.

Như vậy, dựa vào dữ liệu phân tử hệ gen lục lạp trên GenBank và kết quả nhận diện các mẫu Thổ nhân sâm, có thể thấy sự kết hợp phương pháp hình thái so sánh các đặc điểm của rễ, thân, lá, hoa, quả, hạt với hai mã vạch DNA là vùng *ITS* và đoạn gen lục lạp *matK* đủ cơ sở xác định chính xác các mẫu Thổ nhân sâm trong tự nhiên.

3.1.2. Hệ thống tái sinh đa chồi *in vitro* ở cây Thổ nhân sâm

3.1.2.1. Kết quả khử trùng hạt

Kết quả ở bảng 3.1 cho thấy, điều kiện khử trùng tối ưu của hạt Thổ nhân sâm là dung dịch javel 60 % trong 10 phút (tỷ lệ bình không bị nhiễm là 92,23 %, tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 91,55 %, chồi mầm phát triển tốt).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của javel 60 % và HgCl₂ 0,1 % đến tỷ lệ nảy mầm của hạt sau 10 ngày nuôi cấy (n=30)

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ bình không bị nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)	Kích thước mầm sau 10 ngày (cm)	Hình thái mầm
<i>Ảnh hưởng của javel 60 % đến tỷ lệ nảy mầm của hạt</i>				
10	92,23 ^c	91,55 ^c	1,58 ^b	Mập, xanh bình thường
<i>Ảnh hưởng của HgCl₂ 0,1 % đến tỷ lệ nảy mầm của hạt</i>				
5	91,25 ^b	82,26 ^c	1,39 ^c	Mập, xanh bình thường

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.

3.2.1.2. Kết quả tạo đa chồi và ra rễ *in vitro* ở cây Thổ nhân sâm

3.2.2.1. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ nách lá mầm

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy, môi trường MS cơ bản bổ sung 1,5 mg/l BAP có khả năng tạo chồi và kích thích sinh trưởng chồi lớn nhất từ lá mầm, số chồi/mẫu đạt 1,68 (giai đoạn 2 tuần) và 1,78 (giai đoạn 4 tuần).

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ lá mầm (n=30)

Nồng độ BAP (mg/l)	Số mẫu tạo chồi	Số chồi/mẫu	% so với đối chứng	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi
Sau 2 tuần						
1,5	23,56 ^d	1,68 ^a	136,58	0,87 ^a	4,74 ^b	Mập, XBT
Sau 4 tuần						
1,5	24,12 ^d	1,78 ^a	132,83	2,88 ^c	6,14 ^a	Mập, XBT

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$; XBT: xanh bình thường.

Ảnh hưởng BAP, sự kết hợp BAP và IBA đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

Kết quả phân tích ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên được trình bày ở bảng 3.3.

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy môi trường MS cơ bản bổ sung 2 mg/l BAP có khả năng tạo chồi và kích thích sinh trưởng chồi lớn nhất, số chồi/mẫu đạt 3,04 (giai đoạn 2 tuần) và 3,24 (giai đoạn 4 tuần). So sánh kết quả ở bảng 3.2 và bảng 3.3 cho thấy sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên hiệu quả hơn sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ nách lá mầm ở cùng nồng độ BAP. Như vậy, BAP 2 mg/l là chất kích thích tăng trưởng thích hợp tạo đa chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên ở cây Thổ nhân sâm.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên (n=30)

Nồng độ BAP (mg/l)	Số chồi/mẫu	% so với ĐC	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi
Sau 2 tuần					
2,0	3,04 ^d	218,7	0,87 ^a	5,22 ^c	Mập, XBT
Sau 4 tuần					
2,0	3,24 ^c	216,00	2,88 ^b	6,52 ^a	Mập, XBT

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$; XBT: xanh bình thường.

Kết quả ảnh hưởng của IAA và NAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm in vitro

Kết quả phân tích ảnh hưởng của IAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của IAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm (n=30)

Nồng độ IAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
Sau 2 tuần			
0,5	80,17 ^d	5,13 ^d	0,92 ^b
Sau 4 tuần			
0,5	98,12 ^d	13,23 ^d	3,79 ^c

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.

Bảng 3.5 cho thấy, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l IAA cho tỷ lệ cây ra rễ cao nhất đạt 80,17 % tăng 2,66 lần (giai đoạn 2 tuần) và 98,12 % tăng 1,09 lần (ở giai đoạn 4 tuần) so với đối chứng. Vậy nồng độ IAA tối ưu kích thích ra rễ *in vitro* ở cây Thổ nhân sâm là 0,5 mg/l.

Kết quả phân tích ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ *in vitro* của cây Thổ nhân sâm ở bảng 3.6 cho thấy, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ cây ra rễ cao nhất đạt 58,33 % tăng 1,93 lần (giai đoạn 2 tuần) và 94,36 % tăng 1,05 lần (ở giai đoạn 4 tuần) so với đối chứng. Như vậy nồng độ NAA 0,5 mg/l là thích hợp kích thích ra rễ ở cây Thổ nhân sâm.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm (n=30)

Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
Sau 2 tuần			
0,5	58,33 ^c	3,21 ^c	0,31 ^a
Sau 4 tuần			
0,5	94,36 ^c	10,43 ^c	2,79 ^c

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.

Khi so sánh các chỉ tiêu về tỷ lệ ra rễ và số rễ ở cùng thời điểm của 2 nồng độ tối ưu 0,5 mg/l IAA và 0,5 mg/l NAA cho thấy IAA hiệu quả hơn NAA. Vậy chất kích thích ra rễ tối ưu ở cây Thổ nhân sâm là 0,5 mg/l IAA.

3.2. TẠO DÒNG RỄ TƠ TỪ CÂY THỔ NHÂN SÂM

3.2.1. Kết quả tạo dòng rễ tơ từ cây Thổ nhân sâm

3.2.1.1. Khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm

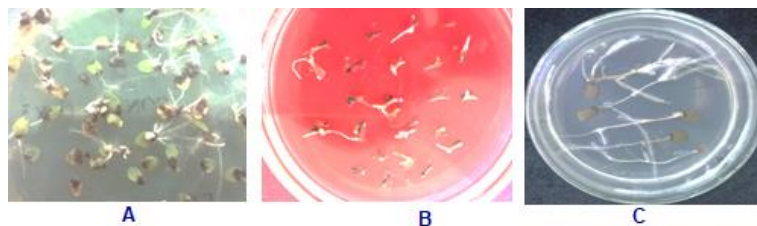
Kết quả khảo sát loại mô thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ được thể hiện qua bảng 3.7 và hình 3.4.

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm (n=150, sau 4 tuần)

Loại mô	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
Lá	65,9 ^c	3,45 ^c	3,25 ^c
Đoạn thân mang mắt chồi bên	55,6 ^a	1,89 ^a	1,59 ^a
Lá mầm	58,2 ^b	2,32 ^b	1,82 ^b

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.

Kết quả bảng 3.7 và hình 3.4 cho thấy, trong 3 loại mô khảo sát cho cảm ứng tạo rễ tơ thì mô lá cho tỷ lệ tạo rễ tơ cao nhất 65,9 % (4 tuần tuổi), thấp nhất là đoạn thân mang mắt chồi bên cho tỷ lệ tạo rễ tơ là 55,6 % (4 tuần tuổi). Đồng thời rễ tơ cũng sinh trưởng và phát triển tốt từ mô lá chuyển gen. Như vậy, mô lá của cây *in vitro* sau 4 - 6 tuần nuôi cấy là nguồn vật liệu thích hợp cho tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm.



Hình 3.4. Khảo sát vật liệu thích hợp để tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm sau 4 tuần biến nạp. A: rễ tơ được cảm ứng từ lá mầm, B: rễ tơ được cảm ứng từ đoạn thân mang mắt chồi bên, C: rễ tơ được cảm ứng từ mô lá.

3.2.1.2. Ảnh hưởng của mật độ *A. rhizogenes*, nồng độ AS, thời gian lây nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả tạo rễ tơ từ mô lá Thổ nhân sâm

Kết quả phân tích ảnh hưởng của mật độ *A. rhizogenes*, nồng độ AS, thời gian lây nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả tạo rễ tơ từ mô lá Thổ nhân sâm cho thấy, mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 0,6$; nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$; thời gian nhiễm khuẩn 10 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày; nồng độ cefotaxime 500 mg/l cho tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất (65,9 %) (Bảng 3.8).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes*, nồng độ AS, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả tạo rễ tơ từ mô lá Thổ nhân sâm (n=150, sau 4 tuần)

Ảnh hưởng của mật độ khuẩn		Ảnh hưởng của nồng độ AS		Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn		Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy	
OD ₆₀₀	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Nồng độ AS (μmol/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Thời gian nhiễm khuẩn (phút)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Thời gian đồng nuôi cấy (ngày)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)
0,2	23,42 ^a	50	43,23 ^b	5	45,23 ^d	1	36,12 ^d
0,4	34,56 ^c	75	47,32 ^c	10	65,9 ^e	2	65,9 ^e
0,6	65,9 ^c	100	65,9 ^d	15	40,07 ^c	3	23,34 ^c
0,8	43,24 ^d	125	45,14 ^c	20	34,12 ^b	4	14,12 ^b
1,0	29,43 ^b	150	40,10 ^a	25	12,51 ^a	5	4,12 ^a

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.

3.2.1.3. Nghiên cứu xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime

Kết quả xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime ở bảng 3.9 cho thấy, nồng độ cefotaxime tối ưu diệt khuẩn là 500 mg/l cho tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm là 93,76 % và tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là 65,9 %. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Manuhara và cs (2015).

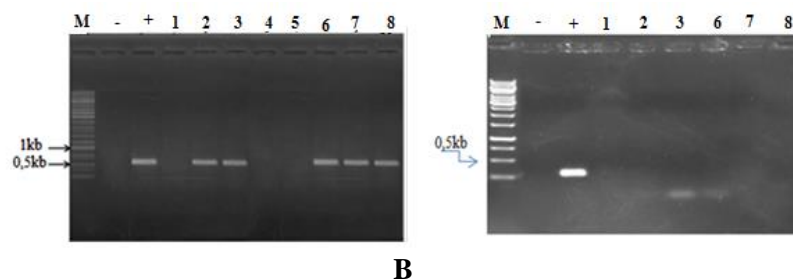
Bảng 3.9. Xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime sau 4 tuần

Nồng độ cefotaxime (mg/l)	Tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)
500	93,76 ^d	65,9 ^d

Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.

3.2.1.4. Phân tích dòng rễ tơ mang gen *rolC* bằng kỹ thuật PCR

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của hai cặp môi nhân gen *rolC* và gen *VirD2* cho thấy, đoạn gen *rolC* có kích thước khoảng 0,5 kb và đoạn gen *VirD2* có kích thước khoảng hơn 0,3 kb được khuếch đại ở giếng đối chứng dương (pRi plasmid 15834); các giếng chạy sản phẩm PCR của các dòng rễ tơ (5/7 dòng 2, 3, 6, 7, 8) (Hình 3.5 A) đều có sự hiện diện của một băng DNA duy nhất sáng rõ nét ở vị trí 520 bp (cùng vị trí với đối chứng dương gen *rolC*) và không có băng DNA ở vị trí 338 bp của gen *VirD2* (Hình 3.5 B); ngược lại với các giếng đối chứng dương, các giếng đối chứng âm và đối chứng rễ không chuyển gen (rễ bất định) đều không có băng vạch ở các vị trí 338 bp và 520 bp.



Hình 3.5. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn gen *rolC* (A) và đoạn gen *virD2* (B) M: Thang chuẩn 1kb; (-): nước; (+): sản phẩm PCR của Ri plasmid; 1. Rễ không chuyển gen; Các giếng từ 2 đến 8 (A): sản phẩm PCR nhân gen *rolC* của 7 dòng rễ tơ Thổ nhân sâm; Các giếng 2, 3, 6, 7, 8 (B): sản phẩm PCR nhân gen *virD2* của các dòng rễ tơ mang gen *rolC*.

3.2.1.5. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ Thổ nhân sâm

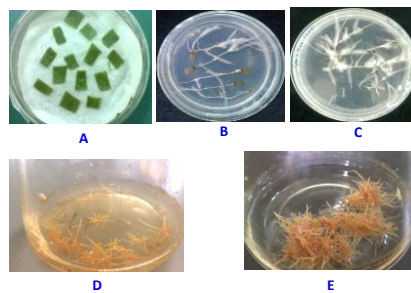
Trong ba trạng thái môi trường thử nghiệm gồm đặc, bán lỏng và lỏng thì rễ tơ trên môi trường lỏng nuôi lác cho tốc độ tăng trưởng cao nhất (4,11 g rễ tươi), tiếp sau là môi trường bán

lông (3,02 g rễ tươi) và cuối cùng là môi trường đặc (2,12 g rễ tươi) tăng lần lượt là 7,47; 5,49 và 3,85 lần so với khối lượng rễ ban đầu sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.10). Như vậy, môi trường lỏng nuôi cấy giúp rễ tơ Thổ nhân sâm tăng trưởng tốt nhất. Hình ảnh thể hiện kết quả nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm được thể hiện ở hình 3.6.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ Thổ nhân sâm

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

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.



Hình 3.6. Hình ảnh cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ Thổ nhân sâm

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

3.2.1.6. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số trong các dòng rễ tơ chuyển gen

Kết quả hàm lượng flavonoid trong năm dòng rễ tơ chuyển gen 2, 3, 6, 7, 8 và rễ bất định được thể hiện ở bảng 3.11.

Bảng 3.11. Hàm lượng flavonoid tổng số của năm dòng rễ tơ chuyển gen và rễ bất định

Các mẫu nghiên cứu	Hàm lượng flavonoid tổng số (mg/g)	Tăng so với đối chứng không chuyển gen (%)
Rễ bất định	0,45 ^a	100
Dòng 8	2,34 ^b	520

3.2.2. Thảo luận kết quả tạo dòng rễ tơ từ cây Thổ nhân sâm

Nuôi cấy sinh khối rễ tơ nhờ vi khuẩn *A. rhizogenes* để thu nhận các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học là một giải pháp hiệu quả, có thể khắc phục được những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống và phương pháp nuôi cấy tăng sinh khối tế bào. Đối với cây Thổ nhân sâm, nghiên cứu rễ tơ và ứng dụng kỹ thuật nhân nuôi tăng sinh khối rễ tơ đã được Manuhara và cs (2012) công bố. Ở Việt Nam, nghiên cứu tạo dòng rễ tơ từ thực vật và đặc biệt là ở cây Thổ nhân sâm còn rất mới mẻ. Trong nghiên cứu này, mô lá là vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm. Mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 0,6$; nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$; thời gian nhiễm khuẩn 10 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày; nồng độ cefotaxime 500 mg/l là những điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá cây Thổ nhân sâm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu Manuhara và cs (2015). Môi trường MS ở trạng thái lỏng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nuôi trong điều kiện lắc là thích hợp cho sự tăng trưởng rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm. Kết quả kiểm tra sự có mặt gen *rolC* bằng phương pháp PCR và sự vắng mặt của gen *virD2* đã khẳng định 5 dòng rễ tơ (dòng 2, 3, 6, 7, 8) được tạo ra từ cây Thổ nhân sâm, kết quả này phù hợp với

ngiên cứu của Thwe và cs (2016). Tuy nhiên, để sử dụng các dòng rễ tơ Thổ nhân sâm này trong sản xuất thu nhận flavonoid nói riêng và các chất chuyển hóa thứ cấp nói chung thì cần tiếp tục nghiên cứu, so sánh hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học giữa dòng rễ tơ với rễ của cây Thổ nhân sâm tự nhiên.

3.3. TẠO DÒNG THỔ NHÂN SÂM CHUYỂN GEN *GmCHI*

3.3.1. Kết quả chuyển gen *GmCHI* và tạo cây Thổ nhân sâm chuyển gen

3.3.1.1. Kết quả khảo sát vật liệu chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

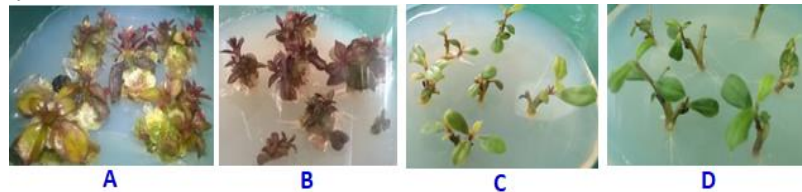
Kết quả tạo đa chồi từ lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi biến nạp *A. tumefaciens* được thể hiện qua bảng 3.12 và hình 3.7.

Bảng 3.12. Hiệu quả tạo đa chồi từ lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi lây nhiễm *A. tumefaciens* (n=150)

Vật liệu	Số chồi/ mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/ chồi	Chất lượng chồi
Sau 6 tuần				
Lá mầm	3,02 ^b	1,34 ^a	5,21 ^b	Mập
Đoạn thân	1,40 ^a	1,13 ^a	3,43 ^a	Gầy

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.

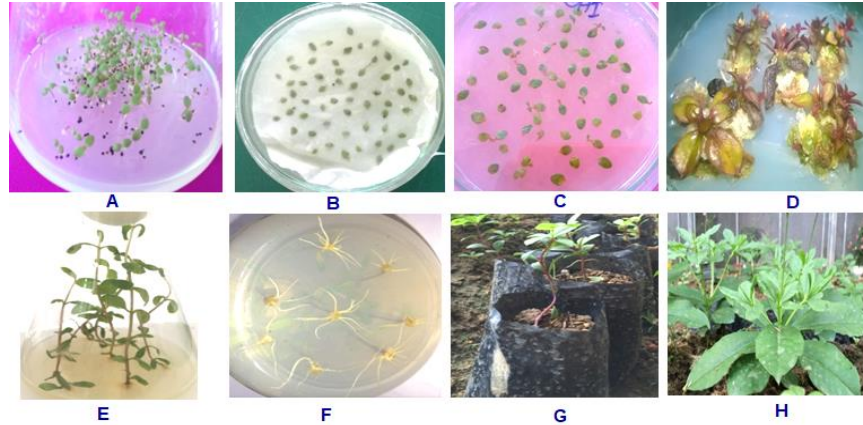
Kết quả ở bảng 3.12 và hình 3.7 cho thấy, hiệu quả tạo đa chồi từ lá mầm sau khi biến nạp *A. tumefaciens* cao gấp 2,15 lần (ở giai đoạn 6 tuần) so với đoạn thân mang mắt chồi bên. Đồng thời chồi được tạo ra từ lá mầm có chiều cao, số lá, chất lượng chồi tốt hơn so với chồi được tạo ra từ đoạn thân mang mắt chồi bên. Như vậy, lá mầm chính là vật liệu thích hợp tạo đa chồi phục vụ chuyển gen ở cây Thổ nhân sâm.



Hình 3.7. Hiệu quả tạo đa chồi từ lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi lây nhiễm *A. tumefaciens*. A, B: Sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ lá mầm được biến nạp *A. tumefaciens* sau 4 tuần và 6 tuần. C, D: Sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên được biến nạp *A. tumefaciens* sau 4 tuần và 6 tuần.

3.3.1.2. Chuyển cấu trúc mang gen *GmCHI* và tạo cây Thổ nhân sâm được chuyển gen

Kết quả chuyển cấu trúc mang gen *GmCHI* vào cây Thổ nhân sâm thông qua *A. tumefaciens* lây nhiễm qua nách lá mầm được thể hiện bảng 3.13 và hình 3.8. Bảng 3.13 cho thấy, trong 730 mẫu biến nạp qua các giai đoạn tái sinh và sinh trưởng chồi, chọn lọc bằng kháng sinh tạo được 18 dòng cây được chuyển gen *GmCHI* gồm 28 cây trong điều kiện nhà lưới, chiếm 2,46 %. Song song với thí nghiệm chuyển gen *GmCHI*, tiến hành hai lô đối chứng là ĐC0 và ĐC1. Ở lô ĐC1 thu được 35 cây sống sót ở vườn ươm.



Hình 3.8. Hình ảnh biếp nạp và tái sinh cây Thổ nhân sâm chuyển gen. A: hạt đã khử trùng nảy mầm trên môi trường GM; B: đồng nuôi cấy trong tối trên môi trường CCM; C: cảm ứng tạo chồi; D: tái sinh đa chồi sau 4 tuần; E, F: ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường RM; G: cây chuyển gen trồng trên giá thể; H: cây trồng trong vườn ươm ở điều kiện nhà lưới.

Bảng 3.13. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen *GmCHI* vào cây Thổ nhân sâm

Đối chứng và thí nghiệm	Tổng số mẫu biến nạp	Số mẫu tạo chồi	Số chồi kéo dài	Số chồi ra rễ	Số cây sống trên giá thể	Số cây sống sót trong nhà lưới
ĐC0	40	0	0	0	0	0
ĐC1	40	30	70	68	40	35
Thí nghiệm 3 lần	730	200	102	63	43	28

Ghi chú: ĐC0: các mẫu Thổ nhân sâm không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh; ĐC1: các mẫu Thổ nhân sâm không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh.

3.3.2. Kết quả phân tích cây Thổ nhân sâm chuyển gen

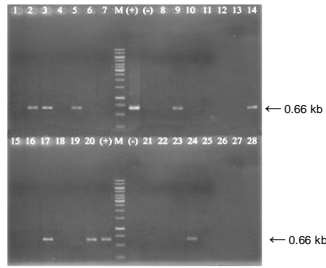
3.3.2.1. Xác định sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI* trong hệ gen cây Thổ nhân sâm thể hệ T0

Kết quả kiểm tra các cây Thổ nhân sâm được chuyển gen bằng PCR

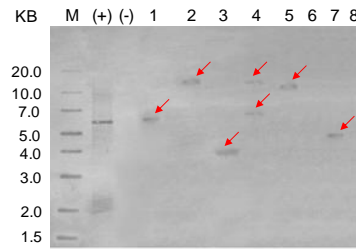
Kết quả phân tích PCR với cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R* ở hình 3.9 thu được đoạn DNA duy nhất với kích thước khoảng 0,66 kb tương ứng với kích thước gen *GmCHI* được chuyển vào cây Thổ nhân sâm ở 8 cây Thổ nhân sâm (T0-2.1, T0-2.2, T0-4, T0-7, T0-10, T0-12, T0-14 và T0-16).

Kết quả kiểm tra các cây Thổ nhân sâm được chuyển gen bằng Southern blot

Tám cây Thổ nhân sâm được chuyển gen ở thể hệ T0 dương tính với PCR là T0- 2.1; T0- 2.2; T0- 4; T0- 7; T0- 10; T0- 12; T0- 14; T0- 16 và cây đối chứng không chuyển gen đã được sử dụng để phân tích Southern blot, kết quả thể hiện ở hình 3.10. Kết quả ở hình 3.10 cho thấy, băng DNA xuất hiện ở 6 cây được chuyển gen T0- 2.1; T0- 2.2; T0- 4; T0- 7; T0- 10; T0- 14. Hiệu suất chuyển gen tính đến thời điểm phân tích lai Southern là $5/730 = 0,68\%$. Như vậy, có thể khẳng định gen chuyển *GmCHI* đã được gắn vào hệ gen của cây chuyển gen. Các cây Thổ nhân sâm chuyển gen cho kết quả lai Southern tiếp tục được chăm sóc và ưu tiên phát triển phục vụ những phân tích tiếp theo về khả năng hoạt động và biểu hiện mạnh của gen chuyển *GmCHI* trong cây chuyển gen.



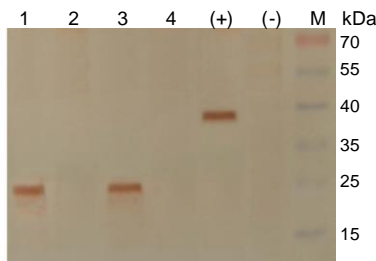
Hình 3.9. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *GmCHI* từ các cây Thổ nhân sâm được chuyển gen ở thể hệ T0 bằng cặp mồi *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R*



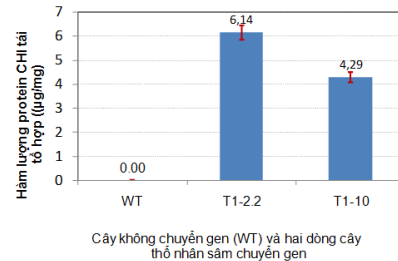
Hình 3.10. Kết quả phân tích cây Thổ nhân sâm chuyển gen bằng lai Southern ở các cây được chuyển gen dương tính với PCR với đoạn dò *GmCHI* được đánh dấu bằng biotin

3.3.2.2. Phân tích sự biểu hiện protein CHI tái tổ hợp trong các dòng Thổ nhân sâm chuyển gen ở thể hệ T1

Thu quả và hạt của 6 cây Thổ nhân sâm có kết quả dương tính với Southern blot ở thể hệ T0 (T0- 2.1; T0- 2.2; T0- 4; T0- 7; T0- 10; T0- 14) đem gieo trồng thì chỉ có hạt của 4 cây (T1- 2.2; T1- 4; T1- 10; T1- 14) nảy mầm và tạo 4 dòng cây chuyển gen T1. Kết quả lai Western phân tích biểu hiện protein tái tổ hợp của 4 dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen và cây đối chứng không chuyển gen trên hình 3.11 cho thấy, trên màng lai xuất hiện băng màu ở vị trí kích thước khoảng 25 kDa của 2 dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen T1- 2.2; T1- 10 ở thể hệ T1. Dòng T1- 4; T1- 14 và cây đối chứng không chuyển gen không xuất hiện băng protein. Điều đó chứng tỏ gen chuyển *GmCHI* đã được di truyền từ thể hệ T0 sang T1 ở 2 dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1 (T1- 2.2; T1- 10) và đã dịch mã tổng hợp protein *GmCHI* tái tổ hợp. Như vậy, hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn này đạt 0,27 % (2/730).



Hình 3.11. Kết quả phân tích Western blot từ 4 dòng Thổ nhân sâm chuyển gen thể hệ T1 và cây đối chứng không chuyển gen



Hình 3.12. Kết quả phân tích ELISA xác định hàm lượng protein tái tổ hợp CHI của hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen (T1- 2.2; T1- 10) và cây đối chứng không chuyển gen (WT)

Hàm lượng protein tái tổ hợp *GmCHI* trong cây của hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1- 2.2, T1- 10 được phân tích bằng phương pháp ELISA, kết quả được thể hiện ở hình 3.12. Biểu đồ ở hình 3.12 cho thấy hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen (T1- 2.2, T1- 10) tổng hợp protein tái tổ hợp *GmCHI* có hàm lượng lần lượt là 6,14 µg/mg và 4,29 µg/mg. Dòng T1- 2.2 có hàm lượng protein *GmCHI* cao hơn dòng T1- 10. Kết quả này đã chứng minh rằng ở hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen, protein *GmCHI* được tăng cường biểu hiện.

3.3.2.3. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số trong các dòng cây Thổ nhân sâm ở thể hệ T1

Kết quả xác định hàm lượng flavonoid trong hai dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen (T1- 2.2; T1- 10) và cây đối chứng được thể hiện ở bảng 3.14.

Bảng 3.14. Hàm lượng flavonoid tổng số của hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1- 2.2; T1- 10 và cây đối chứng không chuyển gen

Các mẫu nghiên cứu	Hàm lượng flavonoid tổng số (mg/g)	% so với đối chứng không chuyển gen
Các cây đối chứng không chuyển gen	0,57 ^a	100
Dòng T1- 2.2	4,24 ^c	743,86
Dòng T1- 10	2,74 ^b	480,70

Ghi chú: Giá trị ở mỗi cột với các chữ cái đi kèm giống nhau thể hiện không có sự sai khác với $p < 0,05$.

Bảng 3.14 cho thấy 2 dòng Thổ nhân sâm chuyển gen *GmCHI* ở thế hệ T1 (T1-2.2 và T1-10) có hàm lượng flavonoid là 4,24 mg/g và 2,74 mg/g tăng lần lượt là 743,86 % và 480,70 % so với cây đối chứng không chuyển gen. Kết quả này đã chứng minh sự biểu hiện mạnh gen *GmCHI* ở hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1-2.2 và T1-10 đã tác động làm tăng tổng hợp flavonoid ở các cây chuyển gen.

3.2.4. Thảo luận kết quả biến nạp và tạo dòng Thổ nhân sâm chuyển gen

Ở cây Thổ nhân sâm các hướng nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung vào nuôi cấy *in vitro* để tăng sinh khối mà chưa thấy công trình nghiên cứu thiết lập một phương pháp chuyển gen hiệu quả để cải thiện được hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây Thổ nhân sâm, trong đó có flavonoid. Nghiên cứu của chúng tôi chọn cách tiếp cận ứng dụng nguyên lý biểu hiện mạnh gen nhằm nâng cao hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp trong mục đích tăng cường hoạt động của enzyme chìa khóa tham gia vào con đường sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp ở thực vật. *GmCHI* mã hóa enzyme chìa khóa CHI phân lập từ cây đậu tương được lựa chọn chuyển vào cây Thổ nhân sâm. Thổ nhân sâm là thực vật hai lá mầm, kỹ thuật chuyển gen thông qua *A.tumefaciens* được sử dụng có hiệu quả khi lây nhiễm qua nách lá mầm (Olhoft và cs, 2006). Trong tổng số 730 mẫu biến nạp, tạo ra 28 cây Thổ nhân sâm được chuyển gen tương ứng với 18 dòng được chuyển gen sống sót. Kết quả phân tích tác động của enzyme tái tổ hợp đến sự tổng hợp flavonoid ở hai dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen T1 cho thấy, hàm lượng flavonoid tổng số của hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1- 2.2; T1- 10 lần lượt là 4,24 mg/g và 2,74 mg/g tăng 7,4 lần và 4,8 lần so với cây đối chứng không chuyển gen. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả trên thế giới. Li và cộng sự (2006) đã nghiên cứu chuyển gen *SmCHI* của loài *S. medusa* vào cây Thuốc lá, kết quả làm tăng hàm lượng flavonoid tổng số gấp 5 lần so với các cây không chuyển gen. Nghiên cứu chuyển gen *CHI* phân lập từ cây Dạ yên thảo chuyển vào Cà chua của Muir và cs (2001) đã tạo được các cây Cà chua chuyển gen có hàm lượng flavonol tăng đến 78 lần trong vỏ quả so với cây không chuyển gen... Như vậy có thể thấy, khi chuyển gen *CHI* phân lập từ loài này sang loài khác đã làm tăng hàm lượng flavonoid, flavonol và flavone ở cây chuyển gen và cách tiếp cận lựa chọn kỹ thuật biểu hiện mạnh gen *GmCHI* có nguồn gốc từ đậu tương làm tăng hàm lượng enzyme CHI tham gia tổng hợp flavonoid và dẫn đến tăng hàm lượng flavonoid ở cây Thổ nhân sâm là hợp lý.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Các mẫu Thổ nhân sâm thu tại một số địa phương được xác định thuộc cùng loài *T. paniculatum*, chi *Talinum*, họ Rau sam (Portulacaceae) bằng phương pháp hình thái so sánh kết hợp với phân tích mã vạch DNA.

1.2. Lá mầm là vật liệu nhận gen thích hợp trong kỹ thuật chuyển gen ở cây Thổ nhân sâm. Môi trường MS cơ bản + 50 ml/l nước dừa + 1,5 mg/l BAP là thích hợp cho sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ nách lá mầm.

Từ 730 mẫu biến nạp tạo được 28 cây chuyển gen *GmCHI* trong điều kiện nhà lưới. Protein tái tổ hợp GmCHI đã được biểu hiện ở hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1-2.2 và T1-10 ở thể hệ T1 với hàm lượng lần lượt là 6,14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ và 4,29 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1-2.2 và T1-10 có hàm lượng flavonoid tổng số tăng 7,4 lần và 4,8 lần so với cây đối chứng không chuyển gen.

1.3. Mô lá là vật liệu thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm. Lây nhiễm mô lá bởi *A. rhizogenes* với $\text{OD}_{600} = 0,6$; nồng độ AS 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$; thời gian nhiễm khuẩn 10 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày; nồng độ cefotaxime 500 mg/l là những điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm và 5/7 dòng rễ tơ đã được tạo ra. Môi trường MS ở trạng thái lỏng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nuôi trong điều kiện lác là thích hợp cho sự tăng trưởng rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm. Dòng rễ tơ chuyển gen số 8 có hàm lượng flavonoid cao nhất (2,34 mg/g) tăng 520 % so với rễ bất định của cây Thổ nhân sâm.

2. Đề nghị

2.1. Tiếp tục phân tích và đánh giá 2 dòng Thổ nhân sâm chuyển gen (T1- 2.2; T1- 10) ở các thể hệ T2, T3,... nhằm chọn được dòng Thổ nhân sâm chuyển gen có hàm lượng flavonoid cao và ổn định.

2.2. Tiếp tục phân tích và đánh giá 5 dòng rễ tơ (2, 3, 6, 7, 8) nhằm chọn được dòng rễ tơ có hàm lượng flavonoid cao và ổn định.