

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

BÁO CÁO TỔNG KẾT 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

Chủ nhiệm đề tài: TS. Vũ Thị Như Trang

THÁI NGUYÊN, 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

BÁO CÁO TỔNG KẾT 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

MỤC LỤC

DANH SÁCH THÀNH VIÊN THAM GIA ĐỀ TÀI	i
MỤC LỤC.....	ii
DANH MỤC KÍ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	viii
THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	x
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu đề tài.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. CÂY THỔ NHÂN SÂM.....	4
1.1.1. Phân loại và đặc điểm sinh học của cây Thổ nhân sâm	4
1.1.2. Thành phần hóa học cây Thổ nhân sâm	4
1.1.3. Nghiên cứu định danh cây Thổ nhân sâm.....	5
1.2. NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY <i>IN VITRO</i> Ở CÂY THỔ NHÂN SÂM	8
1.2.1. Tái sinh <i>in vitro</i> ở cây Thổ nhân sâm.....	8
1.2.2. Nuôi cấy rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm	9
1.3. FLAVONOID VÀ TỔNG HỢP FLAVONOID Ở THỰC VẬT.....	15
1.3.1. Flavonoid.....	15
1.3.2. Con đường tổng hợp flavonoid ở thực vật	21
1.3.3. Enzyme CHI và biểu hiện gen mã hóa CHI.....	22
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	30
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	30
2.1.2. Chủng vi khuẩn và các loại vector	31
2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	31
2.2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu	31
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu	32

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	33
2.3.1. Phương pháp định danh mẫu cây Thổ nhân sâm	33
2.3.2. Các phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i>	35
2.3.3. Phương pháp chuyển gen <i>GmCHI</i> ở cây Thổ nhân sâm	39
2.3.4. Phương pháp phân tích cây chuyển gen.....	41
2.3.5. Các phương pháp phân tích, xử lý số liệu.....	44
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	45
3.1. NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG TÁI SINH ĐA CHỒI <i>IN VITRO</i> Ở CÂY THỔ NHÂN SÂM	45
3.1.1. Kết quả định danh các mẫu Thổ nhân sâm	45
3.1.2. Hệ thống tái sinh đa chồi <i>in vitro</i> ở cây Thổ nhân sâm	47
3.2. TẠO DÒNG RỄ TƠ TỪ CÂY THỔ NHÂN SÂM.....	56
3.2.1. Kết quả tạo dòng rễ tơ từ cây Thổ nhân sâm	56
3.2.2. Thảo luận kết quả tạo dòng rễ tơ từ cây Thổ nhân sâm	64
3.3. TẠO DÒNG THỔ NHÂN SÂM CHUYỂN GEN <i>GmCHI</i>	65
3.3.1. Kết quả chuyển gen <i>GmCHI</i> và tạo cây Thổ nhân sâm chuyển gen.....	65
3.3.2. Kết quả phân tích cây Thổ nhân sâm chuyển gen.....	68
3.3.3. Thảo luận kết quả tạo dòng Thổ nhân sâm chuyển gen <i>GmCHI</i>	74
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	77
1. Kết luận	77
2. Đề nghị.....	77
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	78
PHỤ LỤC.....	89

DANH MỤC KÍ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
AS	Acetosyringone	
BAP	Benzylaminopurine	
bp	base pairs	Cặp bazơ nito
CCM	Co-cultivation medium	Môi trường đồng nuôi cấy
cDNA	Complementary	DNA bổ sung
CHI	Chalcone isomerase	
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase	
CHS	Chalcone synthase	
4CL	4-Coumarate CoA ligase	
cs		Cộng sự
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide	
DFR	Dihydroxyflavonol 4- reductase	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
FAP	Fatty-acid-binding proteins	
F3H	Flavanone-3-hydroxylase	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm ELISA
FLS	Flavonol synthase	
FNS II	Flavone synthase II	
GA ₃	Gibberellic acid	Axit gibberellic
GM	Germination medium	Môi trường nảy mầm
<i>GmCHI</i>	<i>Glycine max</i> chalcone isomerase	Gen <i>GmCHI</i> phân lập từ cây đậu tương

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
IAA	Idole acetic acid	Axit idole acetic
IBA	Idolbutylic acid	Axit idolbutylic
IFS	Isoflavone synthase	
ITS	Internal transcribed spacers	
Kb	Kilo base	
kDa	Kilo Dalton	
LB	Luria Bertani	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
LDOX	Leucoanthocyanidin oxygenase	
L-Tyr	L-tyrosine	Axit amin L-tyrosine
mRNA	Messenger ribonucleic acid	RNA thông tin
MS	Murashige và Skoog, 1962	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy mô thực vật
NAA	Naphthaleneacetic acid	Axit naphthaleneacetic
OD	Optical density	Mật độ quang
Ori	Origin	Điểm khởi đầu sao chép
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
Ri-plasmid	Root inducing- plasmid	
RM	Rooting medium	Môi trường tạo rễ
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
Rol	Root locus	Gen rol
rpm	Revolutions per minute	Số vòng/ phút
scFv	Single-chain variable fragment	
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
SEM	Shoot elongation medium	Môi trường kéo dài chồi

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
SIM	Shoot induction medium	Môi trường cảm ứng tạo chồi
Taq polymerase	DNA Thermus aquaticus DNA polymerase	
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào thực vật
T0, T1		Các thế hệ cây chuyển gen
T0		Cây chuyển gen tái sinh từ chồi trong ống nghiệm
T1		Hạt của cây chuyển gen T0 nảy mầm thành cây T1
TL-DNA	Transfer left -DNA	Vùng biên trái đoạn DNA được chuyển vào thực vật
TR-DNA	Transfer right -DNA	Vùng biên phải đoạn DNA được chuyển vào thực vật
UV	Ultraviolet	Tia cực tím
<i>Vir</i>	<i>Virus interferon resistance</i>	Gen <i>vir</i>
vvm	<i>Volume volume minute</i>	Thể tích khí/thể tích chất lỏng/ phút
WT	Wild type	Cây không chuyển gen
<i>X-gal</i>	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-pyranoside</i>	
ZT	Zeatin	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thống kê các trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu	32
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của javel 60 % và HgCl ₂ 0,1 % đến tỷ lệ nảy mầm của hạt sau 10 ngày nuôi cấy	48
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ lá mầm	50
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên	51
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của tổ hợp 2 mg/l BAP và IBA đến sự phát sinh, sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên	53
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của IAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm	54
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm	55
Bảng 3.7. Kết quả khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm	56
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn <i>A. rhizogenes</i> , nồng độ AS, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả tạo rễ tơ từ mô lá Thổ nhân sâm	58
Bảng 3.9. Xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime sau 4 tuần	60
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ Thổ nhân sâm	62
Bảng 3.11. Hàm lượng flavonoid tổng số của năm dòng rễ tơ chuyển gen và rễ bất định	63
Bảng 3.12. Hiệu quả tạo đa chồi từ lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi lây nhiễm <i>A. tumefaciens</i>	65
Bảng 3.13. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen <i>GmCHI</i> vào cây Thổ nhân sâm	68
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	74

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Khung cơ bản của flavonoid	19
Hình 1.2. Khung cơ bản của hợp chất chalcone	20
Hình 1.3. Các dạng dị vòng C của major flavonoid, isoflavonoid, neoflavonoid	20
Hình 1.4. Cấu trúc chung của nhóm major flavonoid	20
Hình 1.5. Cấu trúc chung của nhóm aurone	21
Hình 1.6. Con đường phenylpropanoid	22
Hình 1.7. Cấu trúc và các vị trí amino acid hoạt động của enzyme CHI	23
Hình 1.8. Sự gắn kết của 2S - naringenin với các vị trí hoạt động của CHI	24
Hình 1.9. Mạng lưới liên kết hydro của phức hợp CHI - naringenin (được thể hiện bằng băng đường chấm màu hồng)	25
Hình 1.10. Hình ảnh phân tử nước nằm giữa (2S) - naringenin và Tyr 106 trong phức hợp CHI - naringenin	25
Hình 1.11. Vị trí các gen <i>GmCHI</i> trong bản đồ gen	27
Hình 2.1. Mẫu cây Thổ nhân sâm thu tại thành phố Thái Nguyên	30
Hình 2.2. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen <i>pCB301-GmCHI</i>	31
Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát	33
Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm chuyển gen <i>GmCHI</i> vào cây Thổ nhân sâm qua nách lá mầm	41
Hình 3.1. Cây Thổ nhân sâm	46
Hình 3.2. Hạt nảy mầm sau 10 ngày nuôi cấy	47
Hình 3.3. Ảnh hưởng của BAP, sự kết hợp BAP và IBA đến sự phát sinh, sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên	52
Hình 3.4. Khảo sát vật liệu thích hợp để tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm sau 4 tuần biến nạp	57
Hình 3.5. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn gen <i>rolC</i> (A) và đoạn gen <i>virD2</i> (B)	61
Hình 3.6. Hình ảnh cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ Thổ nhân sâm	62

Hình 3.7. Hiệu quả tạo đa chồi từ lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi lây nhiễm <i>A. tumefaciens</i>	66
Hình 3.8. Hình ảnh biếp nạp và tái sinh cây Thổ nhân sâm chuyển gen	67
Hình 3.9. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>GmCHI</i> từ các cây Thổ nhân sâm được chuyển gen ở thế hệ T0 bằng cặp mồi <i>CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R</i>	69
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 <i>GmCHI</i> được đánh dấu bằng biotin	70
Hình 3.11. Kết quả phân tích Western blot từ 4 dòng Thổ nhân sâm chuyển gen thế hệ T1 và cây đối chứng không chuyển gen	71
Hình 3.12. Kết quả phân tích ELISA xác định hàm lượng protein tái tổ hợp <i>GmCHI</i> của hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen (T1- 2.2; T1- 10) và cây đối chứng không chuyển gen	72
Hình 3.13. Hình ảnh các dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen ở thế hệ T1 và cây đối chứng không chuyển gen trồng trong vườn thực nghiệm	73

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 µg/mg và 4,29 µg/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 OD₆₀₀ = 0,6; nồng độ AS 100 µmol/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 *rpoC1* 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 Pharmaceine

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, Thổ 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 Thổ 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 Thổ 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

1.1. CÂY THỔ NHÂN SÂM

1.1.1. Phân loại và đặc điểm sinh học của cây Thổ nhân sâm

Theo Đỗ Tất Lợi (2004), cây Thổ nhân sâm (*T. paniculatum*) thuộc chi *Talinum*, họ Rau sam (Portulacaceae), bộ Cẩm chướng (Caryophyllales), phân lớp Cẩm chướng (Caryophyllidae), lớp hai lá mầm (Magnoliopsida) [3]. Thổ nhân sâm là loại cây cỏ mọc hằng năm, thân màu xanh, mọc thẳng, có thể cao tới 0,6 m, phía dưới chia cành. Lá mọc so le, hình trứng ngược, hoặc hình thìa, phiến lá dày, hơi thẫm, hai mặt đều bóng, đầu lá nhọn hoặc tù, phía cuống hẹp lại, cuống rất ngắn, lá dài 5-7 cm, rộng 2,5-3,5 cm. Vào mùa hạ ở đầu cành xuất hiện cụm hoa hình chùm nhiều hoa nhỏ, đường kính 6 mm, 5 cánh hoa màu tím nhạt, hơn 10 nhị dài 2 mm. Bầu hoa hình cầu. Quả nhỏ, khi chín có màu xám tro, đường kính ước 3mm. Hạt rất nhỏ, màu đen nhánh hơi dẹt, trên mặt hơi có vân nổi. Mùa ra hoa vào tháng 6-7-8, mùa quả vào tháng 9-10-11. Rễ củ hình trụ mang nhiều rễ con, bề ngoài màu nâu đen. Lúc mới được thu hoạch, bên trong củ màu trắng, phơi khô sẽ chuyển thành màu đen, hình dáng củ gần giống với củ Nhân sâm. Cây Thổ nhân sâm mọc hoang và được trồng nhiều nơi trong nước ta vì nhiều người nhầm là cây Nhân sâm. Tuy nhiên, giữa cây Thổ nhân sâm và cây Nhân sâm khác nhau về hình thái cũng như về họ thực vật. Ở một số tỉnh của Trung Quốc như Triết Giang, Giang Tô, An Huy..., cây Thổ nhân sâm cũng mọc hoang và được trồng làm cảnh, người ta gọi cây này với những tên Cao ly sâm, Thổ cao ly sâm... và cũng dùng nó làm thuốc bổ thay sâm [3]. Cây mọc rất khỏe, có thể trồng bằng hạt hoặc bằng một mẫu thân rễ. Cây phát triển nhanh, sau một năm có thể thu hoạch, để lâu năm thân rễ sẽ to hơn. Thông thường, dân địa phương trồng để lấy lá nấu canh [1], [3].

1.1.2. Thành phần hóa học cây Thổ nhân sâm

Cây Thổ nhân sâm chứa rất nhiều các thành phần hợp chất có hoạt tính sinh học được quan tâm sử dụng. Trong lá có galactogue, tannin [94] và 12 thành phần hợp chất: (1) hidrocacbon hentriacontane; (2) dotriacontane; (3) tritriacontane; (4) pentatriacontane; (5) heneicosanoic acid; (6) ester nonacosyl nonacosanoate; (7) urea; (8) 3-O- β -Dglucosyl- β -sitosterol; (9) β -sitosterol; (10) stigmasterol; (11)

pentacyclic triterpene 3-O-acetyl-aleuritolic acid; (12) kali nitrat [24]. Ngoài ra, theo Calthareeya và cs (2013) trong lá cây có 4 loại phytosterol đó là: β -sitosterol (10,6 %), stigmastanol (2,76 %), stigmasterol (0,85 %) và campesterol (0,8 %) và các hợp chất khác như phytol (69,32 %), α -tocopherol (0,99 %), acid béo (0,43-3,41 %) [10].

Theo Manuhara và cs (2012), rễ của cây Thổ nhân sâm giàu các hợp chất saponin steroid và có thể được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau trong y học [57]. Các chiết xuất từ rễ của Thổ nhân sâm có thể cải thiện khả năng sinh sản của chuột có lượng testosterone thấp tốt hơn nhiều so với chiết xuất từ rễ Nhân sâm Hàn Quốc. Các phân tích về thành phần hóa học chính trong rễ của cây Thổ nhân sâm tương tự với Nhân sâm Trung Quốc và Hàn Quốc, do đó Thổ nhân sâm đã được sử dụng thay thế cho Nhân sâm [94]. Phân tích GC/MS của dịch chiết xuất từ rễ cho thấy sự xuất hiện của 5 phytosterol đó là β -sitosterol (17,37 %), stigmasterol (4,23 %), stigmastan-3-ol (4,10 %), stigmast-22-en-3-ol (1,84 %) và campesterol (1,56 %); có 12 hợp chất là acid béo (0,50 % -11,32 %) và 2 hợp chất không rõ tên đã xác định được hàm lượng. Ngoài ra, trong lá và rễ còn có các hợp chất như: alkaloid (berberine, coptisine, piperine, palmatine, tetrahydropalmatine), flavonoid (chrysin, quercetin, rutin, kaempferol, cyadinin, genistein, diadzien), saponin (ginsenoside, vinaginsenoside-R5 và vinaginsenoside-R6), tannin (tatarol, ellagitannin, gallotamine, gallic acid, hexahydroxydiphenic acid [10]. Hiện nay, chưa có công trình nghiên cứu công bố hàm lượng flavonoid trong cây Thổ nhân sâm. Tuy nhiên, ở loài *Talinum triangulare* (*Talinum fruticosum*) cùng chi *Talinum* với cây Thổ nhân sâm đã được xác định có hàm lượng flavonoid rất thấp (khoảng 0,897 mg/g lá tươi) [8].

1.1.3. Nghiên cứu định danh cây Thổ nhân sâm

Thổ nhân sâm là loại câ thảo dược mọc tự nhiên khắp nơi trên thế giới, như Thái Lan, Nigeria, Mexico, Trung Quốc... [10], [23], [66]. Ở Việt Nam, Thổ nhân sâm vừa mọc tự nhiên, vừa là cây trồng để làm thuốc. Cây gặp nhiều ở các tỉnh như Hà Giang, Tuyên Quang, Thái Nguyên, Quảng Ninh, Hòa Bình, Bắc Giang, Lạng Sơn, Cao Bằng...[3]. Trước đây, để xác định được loại thảo dược đang sử dụng là cây Thổ nhân sâm thì chủ yếu dựa vào phương pháp hình thái so sánh. Phương pháp

phân loại này dựa vào sự khác biệt về hình thái của các cơ quan trong cơ thể thực vật, đặc biệt là cơ quan sinh sản [66], dựa vào đặc điểm của phấn hoa [67] hay dựa vào cấu trúc của hoa [85]... để nhận diện các loài trong chi *Talinum*. Tuy nhiên, phương pháp này gặp rất nhiều khó khăn khi cần xác định những mẫu Thổ nhân sâm đang trong giai đoạn phát triển (chưa ra hoa), hoặc khó nhận biết được mẫu vật do có nhiều điểm tương đồng với loài cùng chi (*T. triangulare*) [82], hoặc mẫu vật đã được chế biến một phần hay ở dạng bột [40]. Từ giữa những năm 1990, với sự phát triển mạnh mẽ của sinh học phân tử, phân loại học phân tử là phương pháp mới đang được ứng dụng rộng rãi và hiệu quả trong lĩnh vực phân loại học. Phương pháp này dùng để định danh loài dựa trên các dữ liệu thông tin về hệ gen nhân hoặc ngoài nhân hay các sản phẩm của chúng, cho mức độ chính xác cao và đặc biệt hữu dụng với các loài gần gũi mà những quan sát hình thái, sinh trưởng và phát triển chưa đủ cơ sở để định danh hoặc phân biệt loài [47].

Việc lựa chọn các gen hoặc các đoạn DNA để định danh loài phụ thuộc vào mục đích hoặc đối tượng nghiên cứu và là những vùng DNA bảo thủ, ít bị đột biến [31]. Căn cứ vào mức độ đột biến có thể xác định được mối quan hệ gần hay xa giữa các đối tượng nghiên cứu. Một chỉ thị DNA lý tưởng dùng để định danh loài cần có những yêu cầu sau: (i) Đoạn DNA chỉ thị phải đủ độ biến thiên để phân biệt giữa các loài nhưng cũng phải không khác nhau quá mức giữa các cá thể trong cùng loài; (ii) Hệ thống định danh bằng DNA phải được chuẩn hóa, với cùng một vùng DNA có thể được sử dụng cho các nhóm phân loại khác nhau; (iii) Đoạn DNA chỉ thị cần chứa đủ thông tin phát sinh loài để có thể dễ dàng định danh loài vào các nhóm phân loại (chi, họ,...); (iv) Có khả năng áp dụng với các mẫu vật thô, với vị trí cặp môi nhân gen có độ bảo thủ cao, dễ dàng thực hiện phản ứng khuếch đại và đọc trình tự DNA, điều này đặc biệt quan trọng khi DNA tách chiết từ mẫu phân tích là một hỗn hợp DNA của nhiều loài cần nhận dạng trong cùng một thời điểm; (v) Đoạn DNA chỉ thị cần có chiều dài vừa phải (400-800 bp) để có thể được khuếch đại từ DNA khuôn là các DNA bị đứt gãy [41]. Theo đó, một số mã vạch DNA đã được nghiên cứu và ứng dụng trong việc nhận dạng cây dược liệu như *ITS*, *matK*, *rpoC1*, *rpoB*... *ITS* là trình tự không mã hóa nằm ở hai bên của trình tự mã

hóa ribosome 5,8S bao gồm có *ITS1*, *ITS2* [90]. Để đánh giá được đa dạng di truyền trong các giống lúa mạch và giữa các giống lúa mạch với loài lúa mạch hoang dại Sharma và cs (2002) đã sử dụng trình tự vùng *ITS* [76]. Rowena và cs (2012) đã phân biệt được các loài trong cùng một chi và 96 % các giống trong cùng loài từ 78 loài khác nhau nhờ việc sử dụng mã vạch *ITS* [72]. Trong số các gen lục lạp, *matK* là một trong những gen tiến hoá nhanh nhất, có kích thước khoảng 1550 bp và mã hóa cho maturase liên quan đến quá trình loại bỏ các intron sau phiên mã. Do *matK* tiến hoá nhanh và có mặt hầu hết trong thực vật nên đã được sử dụng như một chỉ thị trong nghiên cứu mối quan hệ giữa các loài và phát sinh loài ở thực vật. Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu sử dụng gen *matK* để định danh một số loài như Cỏ biển [29], Bạch tật lê (*Tribulus terrestris*), *Aerva javanica*, *Haplophyllum robustum*, *Tribulus pentandrus*, *Tamarix aucherana*... [21]. Gen *rpoB*, *rpoC1* mã hóa hai trong 4 tiểu đơn vị của RNA polymerase lục lạp. Khi nghiên cứu họ *Dipterocarpaceae*, Tsumura và cs (1996) đã nhận thấy gen *rpoB* là thích hợp để nghiên cứu phát sinh loài. Hiện nay, gen *rpoB* được sử dụng nhiều trong nghiên cứu phát sinh loài và xác định các loài vi khuẩn, đặc biệt nghiên cứu các chủng có quan hệ gần gũi. Cùng với gen *16S rRNA*, *rpoB* được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để xác định loài vi khuẩn mới, do vậy gen này được đề xuất là chỉ thị barcode độc lập hoặc kết hợp với một số gen khác [87]. Madesis và cs (2012) khi nghiên cứu phân loại 25 giống cây họ Đậu ở Địa Trung Hải bằng việc sử dụng gen *rpoC1* và một số gen khác đã có nhận xét rằng, khi sử dụng kết quả phân tích gen *rpoC1* có khả năng xác định được 72 % trong tổng số giống cây họ Đậu nghiên cứu [55].

Trên thế giới, đã có một số công trình nghiên cứu sử dụng mã vạch DNA để định danh mẫu Thổ nhân sâm. Chen và cs (2010) đã so sánh hiệu quả sử dụng 7 mã vạch DNA (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, *ITS2* và *ITS*) để nhận diện một số loài cây dược liệu, trong đó có cây Thổ nhân sâm. Kết quả cho thấy, vùng *ITS2* có thể sử dụng như một mã vạch DNA chuẩn với tỷ lệ thành công là 92,7 % [12]. Liu và cs (2018) đã công bố kết quả giải trình tự toàn bộ hệ gen lục lạp của cây Thổ nhân sâm với kích thước là 156929 bp, trong đó có gen *matK*, *rpoC1* và *rpoB*. Kết quả này làm cơ sở thiết lập mã vạch DNA để định danh mẫu Thổ nhân sâm [53]. Ở

Việt Nam, hiện chưa có công trình nghiên cứu về ứng dụng mã vạch DNA để định danh các mẫu Thổ nhân sâm trong tự nhiên. Chính vì vậy, chúng tôi kết hợp cả phương pháp hình thái so sánh và phương pháp phân loại học phân tử để nhận diện mẫu Thổ nhân sâm thu thập tại một số địa phương.

1.2. NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY *IN VITRO* Ở CÂY THỔ NHÂN SÂM

1.2.1. Tái sinh *in vitro* ở cây Thổ nhân sâm

Đến nay, trên thế giới đã có một số thành công trong nghiên cứu tái sinh chồi ở cây Thổ nhân sâm (*T. paniculatum*). Zhang và cs (1995) đã nghiên cứu tái sinh cây từ tế bào trần phân lập từ lá và mô sẹo của cây Thổ nhân sâm. Kết quả cho thấy, các tế bào trần của phần thịt lá không có khả năng phân chia bình thường và sống lâu nhất là một tuần trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, các tế bào trần từ mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường P4 (K8p + 0,2 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l ZT + 50 ml/l nước dừa + 0,5 mol/l glucose) đã phân chia sau 3 ngày nuôi cấy, tần số phân chia là 36,7 % sau 7 ngày nuôi cấy. Tần số tái sinh của mô sẹo là 0,31 % trong môi trường lỏng và 0,34 % trong nuôi cấy hai lớp. Cây *in vitro* có nguồn gốc từ tế bào trần được trồng trong chậu hoặc cấy truyền tiếp trong ống nghiệm thu được cây trưởng thành sau khoảng 2 - 3 tháng [95]. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến sự hình thành mô sẹo và sự hình thành các cụm chồi từ các đoạn thân, lá và hạt của cây Thổ nhân sâm, Zhao Jun và cs (2009) đã nhận xét môi trường cảm ứng tạo mô sẹo tốt nhất của đoạn thân là MS + 1,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP, sau 5 ngày mô sẹo hình thành, tuy nhiên mô sẹo vẫn còn chưa ổn định và dễ vỡ. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo của đoạn thân có thể đạt 100 % sau khi nuôi cấy 15 ngày. Môi trường tối ưu của mô sẹo cảm ứng từ lá là MS + 1,0 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP. Sự hình thành mô sẹo được phát hiện đầu tiên sau 10 ngày và các mô sẹo được hình thành nhiều hơn sau 20 ngày. Môi trường tăng sinh tối ưu của các mô sẹo là MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA. Những cụm chồi có thể được tạo ra và sinh sôi từ đoạn thân trong môi trường MS + 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA. Trong môi trường MS không có chất kích thích sinh trưởng, tỷ lệ ra rễ là cao nhất. Các cây con phát triển tốt sau khi được cấy và tỷ lệ sống lên đến 90 % [96].

1.2.2. Nuôi cấy rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm

1.2.2.1. Cảm ứng tạo rễ tơ thông qua *A. rhizogenes*

Công nghệ tạo rễ tơ là hướng nghiên cứu nhằm tăng sinh khối *in vitro* đối với cây dược liệu để thu hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học. Rễ tơ là tên gọi dùng để chỉ các lông rễ được sản sinh ra mạnh mẽ tại vị trí bị nhiễm bởi vi khuẩn *A. rhizogenes*. Khi vi khuẩn *A. rhizogenes* nhiễm vào vết thương của thực vật, vùng T-DNA trong một plasmid lớn của *A. rhizogenes* (Ri-plasmid) sẽ chuyển vào các tế bào thực vật tại vị trí lây nhiễm [44]. Ri-plasmid được chia thành nhiều vùng như vùng gây độc (gọi tắt là vùng *vir*), vùng chuyển gene (T-DNA), vùng ori, vùng phiên mã... Chỉ có đoạn T-DNA của plasmid mới được chuyển vào hệ gen của thực vật và việc chuyển gen này thông qua sự hỗ trợ bởi các đoạn DNA trong vùng *vir* của Ri-plasmid. Vùng *vir* có kích thước khoảng 35 kb trong Ri-plasmid và mã hóa sáu locus phiên mã (*vir A, B, C, D, E, G*), có tác dụng kích thích cho sự cắt đoạn T-DNA (tại vùng biên trái và biên phải) để gắn vào hệ gen thực vật trong quá trình chuyển gen. Sự phiên mã của vùng *vir* được cảm ứng với nhiều hợp chất thuộc nhóm phenol, điển hình là AS - hợp chất được xác định là có vai trò làm tăng tần số của quá trình chuyển gen thông qua *Agrobacterium* ở nhiều loài thực vật do cảm ứng sự biểu hiện của gen *vir* ở mức độ cao. T-DNA ở Ri-plasmid bao gồm 2 vùng chính là vùng biên trái (TL-DNA) và biên phải (TR-DNA). Hai vùng này đều có kích thước khoảng 15 - 20 kb và được xen kẽ bởi một đoạn DNA, đoạn DNA này sẽ không được chuyển vào hệ gen của tế bào vật chủ. Vùng TR-DNA mang các gen mã hóa sinh tổng hợp auxin loại IAA (*tms1* và *tms2*), vùng TL-DNA bao gồm 18 khung đọc (ORFs) mang các gen *rolA, rolB, rolC* và *rolD*. Các gen *rolA, rolB* và *rolC* đóng vai trò quan trọng trong quá trình cảm ứng tạo rễ tơ ở mô tế bào thực vật. Sự biểu hiện đồng thời của ba gen này kết hợp với sự biểu hiện các gen mã hóa sinh tổng hợp auxin gây nên kiểu hình rễ tơ ở mô tế bào thực vật bị xâm nhiễm. Các rễ tơ có khả năng sinh trưởng và phát triển nhanh hơn rất nhiều so với rễ bình thường [42].

Nhiều chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng của thực vật được tích lũy trong rễ, tuy nhiên, việc thu rễ sẽ làm cây trồng chết, do đó nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi cấy rễ tơ ứng dụng ở một số loài cây thuốc để thu sinh khối là cần thiết. Nuôi

cây rễ tơ nhờ *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 tạo sinh khối tế bào thực vật (do tồn dư của các chất điều hòa sinh trưởng trong sinh khối tế bào nuôi cấy ảnh hưởng trực tiếp đến sản phẩm và sức khỏe người sử dụng). Đồng thời, rễ tơ có khả năng sinh trưởng nhanh, phát triển tốt trên môi trường không cần bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng và là cơ quan biệt hóa nên rễ tơ có sự di truyền ổn định hơn nuôi cấy tế bào huyền phù và mô sẹo [35].

Sự phát triển của kỹ thuật tạo dòng rễ tơ nhờ lây nhiễm vi khuẩn *A. rhizogenes* là một bước tiến quan trọng để sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp trong nuôi cấy *in vitro*. Loại nguyên liệu tạo rễ tơ, tuổi của nguyên liệu, chủng vi khuẩn, mật độ vi khuẩn và quy trình lây nhiễm... ảnh hưởng lớn đến tần số biến nạp cũng như sự tăng trưởng và năng suất của rễ tơ. Đồng thời tối ưu hoá môi trường nuôi cấy có thể làm tăng khả năng phát triển của rễ tơ và tạo ra các hợp chất có giá trị [46].

Một số chủng vi khuẩn hoang dại *A. rhizogenes* chứa Ri-plasmid thuộc loại agropine thường được sử dụng tạo rễ tơ ở cây dược liệu như A4, 15834, 1855, LBA 9402. Tuy nhiên, ở cây Kanhkina xám (*Cinchona officinalis*), một số chủng vi khuẩn biến đổi gen với Ri-plasmid được sửa đổi đã được sử dụng cho quá trình biến nạp tạo rễ tơ. Các tác giả đã phát triển một vector nhị phân gồm có T-DNA với cấu trúc biểu hiện (*CaMV35S* promoter) của hai gen mã hoá các enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp auxin, đó là tryptophan decarboxylase và strictosidine synthase của dứa cạn (*Catharanthus roseus*), cùng với gen chỉ thị *gus* và gen chọn lọc *hygromycin phosphotransferase*. Vector nhị phân này được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* LBA 9402 để thu được gen *tryptophan decarboxylase* và *strictosidine synthase* trong các dòng rễ tơ biến đổi gen của cây Kanhkina xám [28].

Loại mô thực vật được sử dụng cho quá trình lây nhiễm cũng đóng vai trò quan trọng quyết định hiệu suất chuyển gen. Sự thành công của quá trình lây nhiễm phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau của mô thực vật lây nhiễm như loài và tuổi của mô thực vật; với những mô còn non thì nhạy cảm hơn với sự nhiễm khuẩn. Các loại

mô thực vật phổ biến nhất được sử dụng để lây nhiễm là các đoạn trụ dưới lá mầm, lá mầm, cuống và lá non [74].

Sự lây nhiễm vi khuẩn vào tế bào thực vật được thực hiện bằng cách bổ sung trực tiếp huyền phù vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy hoặc bằng cách ngâm các mô thực vật trong huyền phù vi khuẩn [86]. Trước khi thực hiện lây nhiễm thì mô thực vật phải được làm tổn thương để làm tăng bề mặt tiếp xúc giữa vi khuẩn và mô thực vật. Trong một số thí nghiệm, AS được bổ sung vào môi trường lây nhiễm có tác dụng kích hoạt các gen *vir* của *A. rhizogenes* để tăng hiệu suất chuyển gen ngoại lai vào hệ gen của cây [42]. Nồng độ tối ưu của AS khác nhau tùy thuộc từng thí nghiệm. Đối với sự lây nhiễm của cây Hoa mắt mèo (*Torenia fournieri*) chỉ cần nồng độ AS thấp (10-30 μM) đã làm tăng hiệu suất chuyển gen. Ở cây Thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) hoặc cây Thuốc phiện (*Papaver somniferum*), nồng độ AS dao động từ 50 đến 150 μM . Thời gian đồng nuôi cấy khoảng hai đến ba ngày. Sau đó, các mẫu cấy được chuyển sang môi trường rắn có bổ sung kháng sinh để diệt khuẩn. Kháng sinh thường dùng để loại bỏ vi khuẩn là cefotaxime (250-500 mg/l và timentin (200-300 mg/l). Tiếp theo, các mẫu cấy được chuyển sang môi trường rắn không bổ sung kích thích sinh trưởng trong điều kiện 20-25°C ở trong tối và các rễ tơ đầu tiên xuất hiện sau vài tuần (thường 1-4 tuần). Rễ tơ được chuyển sang các bình nuôi lỏng không bổ sung kích thích sinh trưởng để thu sinh khối. Hình thái rễ tơ điển hình là một rễ chính được bao phủ bởi một số lượng lớn các lông rễ nhỏ li ti [48].

Trên thế giới, đã có rất nhiều công trình nghiên cứu tạo rễ tơ và nhân nuôi sinh khối rễ tơ để tăng cường sản xuất các hợp chất thứ cấp tự nhiên có trong rễ. Camptothecin là một hợp chất điều trị ung thư và kháng virus được chiết xuất từ cây Hạnh phúc (*Camptotheca acuminata*) và một số loài khác thuộc họ Apocynaceae, Olacaceae và Rubiaceae. Một số nghiên cứu được thực hiện để sản xuất camptothecin bằng việc nuôi cấy huyền phù tế bào. Tuy nhiên, sản lượng thu được thấp. Lorence và cs (2004) đã tiến hành nuôi cấy rễ tơ của cây Hạnh phúc từ lá mầm, lá thật được lây nhiễm bởi chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 và R-1000. Sau khi lây nhiễm, mô được nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung 3 % sucrose ủ trong tối 4 ngày liên tục ở 25°C. Tiếp theo các mô lây nhiễm được chuyển sang môi trường B5

rắn có bổ sung timentin (300 mg/l) ở 25°C, với 16 giờ chiếu sáng. Các rễ tơ xuất hiện sau 4-10 tuần lây nhiễm được chuyển sang môi trường B5 lỏng bổ sung 3 % sucrose, nuôi lắc 90-110 rpm. Kết quả các rễ tơ đã được hình thành và sản xuất camptothecin, 10-hydroxycamptothecin với hàm lượng tương đối cao lần lượt là 1,0 mg/g và 0,15 mg/g [54]. Nghiên cứu của Le Flem-Bonhomme và cs (2004) về cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Thuốc phiện (*Papaver somniferum* L.) với mục đích tăng hàm lượng alkaloid tổng số. Hai chủng *A. rhizogenes* (15834, LBA 9402) và một chủng *A. tumefaciens* [GV 3101 (PMP90RK, p35SGUS-2)] cùng với 4 môi trường nuôi cấy đã được thử nghiệm từ đoạn trụ dưới lá mầm của cây Thuốc phiện. Sau 5 tuần nhiễm với *A. rhizogenes* LBA 9402, rễ tơ xuất hiện trên 80 % mẫu cấy. Kiểm tra bằng PCR cho kết quả cả 6 dòng rễ tơ được chuyển gen thành công và hàm lượng alkaloid tổng số trong dòng rễ tơ chuyển gen (0,46 mg/g) cao hơn trong rễ không chuyển gen (0,32 mg/g). Rễ chuyển gen tích lũy codeine (0,18 mg/g) nhiều gấp ba lần so với rễ không chuyển gen (0,05 mg/g). Hơn nữa, trong môi trường nuôi cấy lỏng của rễ tơ đã xác định được hàm lượng của morphine và sanguinarine lần lượt là 0,255 mg/g và 0,014 mg/g [48]. Dhakulkar và cs (2005) đã nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Lôi thọ (*Gmelina arborea* Roxb.) để sản xuất hợp chất verbascoside bằng cách lây nhiễm với chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 hoang dại vào lá mầm. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ mẫu cấy hình thành rễ tơ là 32 %. Kiểm tra các dòng rễ tơ bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu *RolB* và phân tích các sản phẩm PCR bằng kỹ thuật Southern blot cho thấy 6 dòng rễ tơ được chuyển gen có khối lượng rễ tơ tăng gấp 7 lần sau 4 tuần nuôi cấy so với rễ cây non không chuyển gen. Đồng thời, rễ tơ có khả năng tổng hợp verbascoside, là một phenylpropanoid glycoside có giá trị về y học [16]. Chang và cs (2005) đã nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb.) để sản xuất gypenoside như một giải pháp thay thế saponin Nhân sâm. Mẫu lá non được dùng để lây nhiễm với *A. rhizogenes* ATCC 15834 có bổ sung thêm 20 μ M AS. Các mẫu lá được cấy chuyển sang môi trường MS rắn ở 25°C và nuôi trong điều kiện tối. Rễ tơ thường xuất hiện ở các mẫu cấy sau khi lây nhiễm 2 tuần. Các rễ đơn (chiều dài 15-20 mm) được cắt và chuyển sang môi trường MS rắn bổ sung

carbenicillin 300 mg/l để diệt khuẩn. Sau một khoảng thời gian (khoảng 7-10 ngày), rễ tơ phát triển nhanh chóng mà không bị nhiễm vi khuẩn lại được cấy chuyển sang môi trường mới. Kiểm tra kết quả bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *RolB* đã xác định quá trình chuyển gen thành công. Sinh khối rễ tơ khô phát triển trong môi trường MS sau 49 ngày là 7,3 g/l, hàm lượng gypenoside là 38 mg/g [11]. Một số công trình nghiên cứu tạo rễ tơ để cải thiện hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp tự nhiên như tăng hàm lượng glycyrrhizin tổng số trong rễ tơ của cây Cam thảo (*Glycyrrhiza glabra*) [61], tăng hàm lượng plumbagine trong rễ tơ cây *Plumbago rosea* [93], tăng hàm lượng saponin trong rễ tơ của rau Đẳng biển (*Bacopa monnieri*) [56], tăng hàm lượng anthraquinone tổng số trong rễ tơ cây Hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.) [83]...

Ở Việt Nam, đã có một số công trình nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ ở cây dược liệu với mục đích thu sinh khối. Hà Thị Loan và cs (2014) đã nghiên cứu tạo rễ tơ ở Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) từ lá và cuống lá nhờ *A. rhizogenes*. Kết quả 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 rễ/mẫu) cao hơn so với mẫu lá (1,6 rễ/mẫu). Thời gian để cuống lá cảm ứng tạo rễ là 5 tuần, trong khi đó với mẫu lá là trên 6 tuần. Kết quả phân tích rễ tơ 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 tơ sinh trưởng tốt trong môi trường nuôi lỏng lác và không bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng, do đó giúp giảm được những ảnh hưởng không mong muốn đến sức khỏe người sử dụng và tính an toàn của sản phẩm [2]. Ninh Thị Thảo và cs (2015) đã nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge.) từ lá, cuống lá, đoạn thân nhờ *A. rhizogenes* ATCC 15834. Kết quả cho thấy, mô lá là vật liệu thích hợp nhất để cảm ứng tạo rễ tơ Đan sâm. Mật độ vi khuẩn tối ưu cho cảm ứng tạo rễ là $OD_{600} = 0,2$. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *rolA* bằng phương pháp PCR khẳng định 4 dòng rễ tơ đã được cảm ứng thành công. Các dòng rễ tơ có khả năng tăng trưởng nhanh và ổn định khi nuôi cấy trong môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng. Tốc độ tăng trưởng của dòng rễ tơ A5.14 khi nuôi cấy trên môi trường B5 cao hơn khi nuôi cấy trên môi trường MS [4].

Như vậy, trong thời gian gần đây trên thế giới và Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu tạo rễ tơ ở thực vật. Sự thành công trong tạo dòng rễ tơ, nuôi cấy sinh khối rễ tơ và tăng cường sản xuất các hợp chất thứ cấp, sản xuất các protein tái tổ hợp có trong rễ tơ ở cây dược liệu đã đóng góp đáng kể cho công tác chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

1.2.2.2. Tình hình nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm

Đối với cây Thổ nhân sâm, có rất ít công bố về nghiên cứu tạo rễ tơ và nuôi cấy sinh khối rễ tơ. Nổi bật là ba công bố của Manuhara và cs trong các năm 2012, 2014, 2015. Năm 2012, Manuhara và cs đã nghiên cứu ảnh hưởng của việc sục khí, mật độ cấy đến sinh khối và hàm lượng saponin ở rễ tơ của cây Thổ nhân sâm trong bình bioreactor. Sau hai tuần biến nạp *A.rhizogenes*, rễ tơ dài 2-5 cm được cấy chuyển sang môi trường lỏng trong bình bioreactor. Kết quả cho thấy, mật độ cấy là 5g rễ tơ/l và tốc độ sục khí 0,25 vvm là điều kiện tốt nhất cho sản xuất sinh khối và hàm lượng saponin. Thời gian nuôi cấy rễ tơ 2 tuần trên môi trường bán lỏng cho khối lượng khô và hàm lượng saponin cao nhất [57]. Tiếp tục theo hướng này, Manuhara và cs (2014) đã xác định khoảng cách thời gian giữa các lần ngâm nước là 3 giờ, 6 giờ và 12 giờ, trong thời gian ngâm 1 phút, 3 phút, 5 phút và 7 phút đến sinh khối rễ tơ và hàm lượng saponin. Sự kết hợp tốt nhất đã được tìm thấy ở thời gian ngâm nước 5 phút và khoảng thời gian giữa các lần ngâm 12 giờ cho kết quả 3,67 g, tốc độ tăng trưởng là 0,027 g/ngày, diện tích điểm của saponin là 12,56 mm²/0,01g và bề dày của diện tích điểm là 4+ [58]. Đồng thời Manuhara và cs (2015) đã hoàn thiện quy trình nuôi cấy rễ tơ của *T. paniculatum* bằng cách kết hợp nghiên cứu điều kiện môi trường tối ưu với mật độ cấy ban đầu của rễ tơ *T. paniculatum* trong bình sục khí bioreactor. Điều kiện nuôi cấy đã được sử dụng trong nghiên cứu là sự kết hợp của tốc độ sục khí (0,25; 0,5 và 0,75 vvm) và mật độ cấy ban đầu (0,5; 1; 2 g/400 ml). Cho 400 ml môi trường MS lỏng có bổ sung IBA 2 mg/l vào bình bioreactor có thể tích 1000 ml, sau đó bổ sung nước vô trùng thông qua vi lọc (0,2 µm) với lưu lượng nước khác nhau. Rễ ngẫu nhiên được tạo ra từ mô lá của *T. paniculatum* trên môi trường MS rắn bổ sung 2 mg/l IBA đã được đưa vào mỗi bình bioreactor với mật độ cấy khác nhau. Môi trường nuôi cấy được duy trì

trong 14 ngày và phân tích mẫu môi trường hai ngày một lần để xác định hàm lượng đường, độ dẫn điện và độ pH của môi trường. Các kết quả cho thấy, sự kết hợp của tốc độ sục khí 0,5 vvm và mật độ cấy 1 g rễ/400 ml là điều kiện tốt nhất có thể làm tăng sinh khối rễ ngẫu nhiên, trong khi sự kết hợp của tốc độ sục khí là 0,75 vvm và mật độ cấy của 2g rễ/400 ml là điều kiện tốt nhất có thể làm gia tăng hàm lượng saponin [59]. Ở Việt Nam, hiện chưa tìm thấy công bố về tạo dòng rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm.

Đến nay, ở Việt Nam cũng như trên thế giới số lượng công trình nghiên cứu hệ thống tái sinh *in vitro* và tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm còn rất ít, đặc biệt việc tăng hiệu quả khai thác các hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây Thổ nhân sâm bằng công nghệ sinh học còn khá khiêm tốn. Chính vì vậy, việc tăng sinh khối Thổ nhân sâm và cải thiện hàm lượng các chất thứ cấp có hoạt tính sinh học, trong đó có flavonoid bằng các kỹ thuật hiện đại được chúng tôi quan tâm nghiên cứu.

1.3. FLAVONOID VÀ TỔNG HỢP FLAVONOID Ở THỰC VẬT

1.3.1. Flavonoid

1.3.1.1. Vai trò của flavonoid

Đối với thực vật

Flavonoid đóng vai trò rất quan trọng trong thực vật. Chúng hoạt động như các phân tử tín hiệu trong mối quan hệ cộng sinh giữa các loài thực vật và vi sinh vật, giúp quá trình hình thành nốt sần ở rễ cây họ Đậu. Đồng thời, flavonoid giống như là các chất phytoalexin, khi tích lũy tới một nồng độ nào đó sẽ ức chế sự phát triển của vi sinh vật (nấm, vi khuẩn, virus, tuyến trùng). Flavonoid còn là các chất chống oxy hóa, loại bỏ các gốc tự do và các kim loại độc hại cho cây. Khi nuôi cấy tế bào của Bạch quả *in vitro* trong điều kiện có đồng sulfat, kết quả flavonoid được tích lũy tăng 12 lần so với đối chứng. Tương tự, khi nuôi cấy mô sẹo của cây họ Đậu *ononisarvensis*, sự tích lũy flavonoid cũng tăng lên trong môi trường có đồng sulfat. Flavonoid tiết ra từ rễ cây kích thích sự nảy mầm của một số bào tử nấm trong đất có khả năng cộng sinh với rễ cây. Flavonoid được tích lũy với hàm lượng cao trong hạt có tác dụng bảo vệ hạt chống lại mầm bệnh và tham gia vào quá trình phát triển và ngủ nghỉ của hạt. Các sắc tố do flavonoid cấu tạo nên được phân bố trong các tế

bào biểu bì có khả năng hấp thụ tia UV-B bảo vệ mô khỏi bị hư hại, làm giảm sự xâm nhập tia UV-B vào các mô bên trong do đó không cản trở quá trình quang hợp. Flavonoid có mặt trong tất cả các bộ phận của các loài thực vật bậc cao, đặc biệt là ở hoa, tạo cho hoa những màu sắc rực rỡ để thu hút các loại côn trùng giúp cho sự thụ phấn của cây. Một số còn có hoạt tính sinh học và ảnh hưởng đến việc vận chuyển hormone auxin của thực vật, một số flavonoid khác lại có vai trò điều hòa quá trình phiên mã [9].

Đối với con người

Flavonoid có hoạt tính như chất chống oxy hoá, có tác dụng khử các gốc tự do và do đó ức chế các yếu tố gây bệnh. Hoạt tính này mạnh hay yếu phụ thuộc vào đặc điểm, cấu tạo hóa học của từng chất flavonoid cụ thể. Hoạt động chống oxy hóa của flavonoid được giải thích như sau: trong cơ thể con người có một số enzyme ngăn ngừa nhiều loại gốc tự do làm nguy hại tế bào. Tuy nhiên, vì số lượng gốc tự do trong cơ thể quá nhiều (như superoxide, peroxy, alkoxy và hydroxyl) nên phải nhờ đến các chất chống oxy hóa bổ sung từ ngoài vào cơ thể theo dạng thức ăn, nước uống... Khi đưa flavonoid vào trong cơ thể, chúng có khả năng giải phóng các điện tử trên mạch vòng của nhân thơm (vòng B) và hệ thống nối đôi liên hợp, làm triệt tiêu các gốc tự do hoạt động được hình thành trong quá trình bệnh lý (viêm nhiễm, ung thư, lão hóa...). Kết quả là hạn chế quá trình bệnh lý (ung thư, rối loạn tim mạch, hô hấp, viêm khớp và lão hóa sớm) do cắt đứt dây chuyền phản ứng oxy hóa. Ngoài ra, flavonoid còn kìm hãm sự phát triển của các gốc tự do nhờ có khả năng tạo phức với các ion kim loại chuyển tiếp như Fe^{2+} , Cu^{2+} ... để chúng không thể xúc tác cho phản ứng sinh ra các gốc tự do hoạt động như OH^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$. Gốc hydroxyl của vòng B là yếu tố quyết định phản ứng với các gốc tự do vì nó cung cấp hydro và một điện tử cho các gốc tự do hoạt động như hydroxyl, peroxy và peroxy nitrite để ổn định chúng và tạo ra một gốc flavonoid tương đối ổn định [77].

Một số flavonoid như catechin, apigenin, quercetin, naringenin, rutin và venoruton có tác dụng bảo vệ gan. Các bệnh mạn tính như tiểu đường, lao, ung thư có thể làm hại các tế bào gan. Dalton và cs (2000) đã nghiên cứu ở chuột đái tháo đường và thấy rằng sự biểu hiện của gen mã hóa glutamate-cysteine ligase bị giảm

ở trong gan chuột. Glutamate-cysteine ligase có vai trò xúc tác tổng hợp glutathion. Glutathion là một tripeptide nội sinh được tổng hợp trong tế bào từ 3 amino acid: cysteine, glutamate và glycine. Đây là chất chống oxy hóa mạnh để giải độc cho cơ thể và tăng cường hệ thống miễn dịch [14]. Anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside (là một loại flavonoid) đã được chứng minh làm tăng biểu hiện của gen *glutamate-cysteine ligase*, do đó làm giảm nồng độ của các gốc tự do ở gan. Hơn nữa, điều trị bằng anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside làm giảm sự peroxide hóa lipid và ngăn cản sự nhiễm mỡ gan [97].

Silymarin là một loại flavonoid đóng vai trò quan trọng trong điều trị viêm gan cấp, mạn tính và xơ gan. Silymarin gồm 3 chất chính: silibinin, silydianine và silychristine được chiết xuất từ quả và hạt của cây Kế sữa (hay còn gọi là Cúc gai) thuộc họ Compositae với 4 tác dụng đã được chứng minh. (1) Silymarin tăng cường tổng hợp RNA ribosom, giúp tăng tổng hợp protein nhằm thúc đẩy phục hồi các tế bào bị tổn thương và kích thích sự phát triển các tế bào gan mới; (2) Silymarin giúp ổn định màng tế bào gan và ngăn chặn chất độc từ ngoài nhiễm vào trong tế bào gan. Trong nhiều nghiên cứu thử nghiệm trên chuột, silymarin có tác dụng bảo vệ mô gan từ sự nhiễm độc của các chất gây độc ở gan như paracetamol, rượu, CCl₄...; (3) Silymarin là chất chống oxy hóa có thể vô hiệu hóa gốc tự do gây hại như lipoperoxid (chất được sinh ra nhiều khi gan bị viêm, bị tổn thương); (4) Silymarin làm giảm sự hình thành các sợi collagen, do đó ngăn cản quá trình xơ gan [77].

Một số flavonoid bao gồm apigenin, galangin, flavone, flavonol glycoside, isoflavone, flavanone và chalcone đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn mạnh [13]. Chúng có khả năng kháng nhiều loại vi khuẩn khác nhau như *E.coli*, *salmonella typhy*, *anti-bacterium*... nhờ khả năng ức chế và tiêu diệt. Cơ chế hoạt động chống vi khuẩn của flavonoid có thể liên quan đến khả năng làm bất hoạt các chất kết dính vi khuẩn, enzyme, các protein vận chuyển của màng tế bào ... Các flavonoid lipophilic cũng có thể phá vỡ các màng tế bào vi khuẩn [77].

Viêm là một đáp ứng bảo vệ cơ thể của hệ miễn dịch trước sự tấn công của một tác nhân bên ngoài (vi sinh vật, tác nhân hóa, lý) hoặc của tác nhân bên trong (hoại tử do thiếu máu cục bộ, bệnh tự miễn). Các bạch cầu theo mạch máu xâm

nhập vào mô, tiết các chất prostaglandin, cytokine làm tăng giãn mạch, bài tiết chất nhầy, kích thích thần kinh và sự co cơ trơn. Phần lớn tác dụng chống viêm của flavonoid là dựa trên sự tổng hợp các cytokine trung gian làm tăng sự kết dính của bạch cầu trong máu đến các vị trí bị thương tích. Một số flavonoid là chất ức chế sản xuất prostaglandin và leukotrien thông qua ức chế enzyme cyclooxygenase lipooxygenase, do đó làm giảm các triệu chứng viêm [77].

Trái cây và rau cải là những thực phẩm có chứa flavonoid đã được chứng minh là chất chống ung thư hiệu quả. Sử dụng hành tây hoặc táo là hai nguồn thực phẩm chính có chứa quercetin, có liên quan tỷ lệ nghịch với ung thư tuyến tiền liệt, phổi, dạ dày và vú. Ngoài ra, những người uống rượu vang cũng giảm nguy cơ mắc ung thư phổi, nội mạc tử cung, thực quản, dạ dày và ruột kết. Vai trò của việc ăn rau quả có tác dụng phòng chống ung thư đã được chứng minh bằng thực nghiệm. Từ đó, các nhà khoa học đã đưa ra lời khuyên đối với việc bảo vệ sức khỏe cộng đồng có thể đạt được bằng việc tăng cường sử dụng những thực phẩm này [77].

Các cơ chế phân tử cơ bản của hoạt động chống ung thư của flavonoid được đề xuất là (1) làm giảm sự biểu hiện của protein đột biến p53, (2) ngăn cản chu kỳ tế bào, (3) ức chế tyrosine kinase; (4) ức chế protein gây sốc nhiệt; (5) có khả năng gắn kết với thụ thể estrogen; (6) ức chế sự biểu hiện của protein Ras [77].

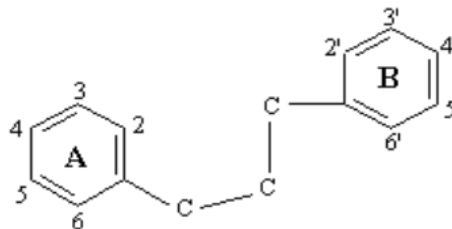
Các đột biến gen p53 là những bất thường di truyền phổ biến nhất trong các bệnh ung thư ở người. Sự ức chế biểu hiện của p53 có thể ngăn cản sự phát triển của các tế bào ung thư trong giai đoạn G2-M của chu kỳ tế bào. Flavonoid đã được chứng minh là có thể làm giảm sự biểu hiện của protein p53 đột biến đến mức gần như không thể phát hiện được trong các tế bào ung thư vú của con người. Tyrosine kinases là một họ các protein nằm trong hoặc gần màng tế bào có vai trò quan trọng trong các quá trình sinh trưởng, chuyển hóa, phân chia và tồn tại của tế bào. Đột biến di truyền làm cho các enzyme này gia tăng số lượng quá mức và có khả năng tự kích hoạt trong tế bào dẫn đến sự tăng trưởng và nhân đôi một cách mất kiểm soát của các tế bào liên quan. Đây là tiền đề của việc hình thành các tế bào ung thư. Thuốc ức chế hoạt tính của tyrosine kinase được cho là các chất chống ung thư hiệu quả mà không có tác dụng phụ gây độc cho tế bào giống như hóa trị liệu thông

thường. Quercetin là hợp chất ức chế tyrosine kinase đầu tiên được thử nghiệm ở người. Các protein gây sốc nhiệt tạo thành một phức hợp với p53 đột biến, cho phép tế bào khối u tránh được sự chết theo chương trình của tế bào. Protein sốc nhiệt cũng cho phép cải thiện sự sống của tế bào ung thư do các stress của cơ thể. Flavonoid có khả năng ngăn cản sản xuất protein sốc nhiệt trong một số dòng tế bào ác tính, bao gồm ung thư vú, ung thư ruột kết và ung thư ruột già [77].

Gần đây, một số nghiên cứu đã chỉ ra flavanol epigallocatechin-3-gallate ức chế tổng hợp acid béo và mỡ trong các tế bào ung thư tuyến tiền liệt, ngăn cản sự tăng trưởng và chết tế bào. Sử dụng các phytoestrogen, bao gồm isoflavone và flavonoid khác, có khả năng chống lại nguy cơ ung thư tiền liệt tuyến bằng khả năng chống oxy hoá, loại trừ các gốc tự do [77]. Ngoài ra, các kết quả thực nghiệm cho thấy một số flavonoid có tác dụng chống ung thư thông qua khả năng hoạt hoá các enzyme trong gan có nhiệm vụ chuyển hoá các chất gây ung thư. Những sản phẩm chuyển hoá thường có tính gây ung thư thấp hơn [92].

1.3.1.2. Cấu trúc hóa học của flavonoid

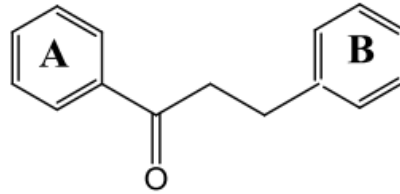
Flavonoid là một trong những nhóm hợp chất phong phú và đa dạng nhất trong tự nhiên. Các flavonoid được khám phá bởi một nhà sinh hóa nổi tiếng của thế kỉ 20, Albert Szent-Gyorgyi (1893-1986). Cho đến nay đã xác định được hơn 4.000 loại flavonoid [62]. Flavonoid chủ yếu có màu vàng, ngoài ra một số flavonoid có màu xanh, tím đỏ và cũng có một số khác lại không màu. Flavonoid là các chất thuộc nhóm hợp chất phenolic đa vòng. Cấu trúc hóa học của flavonoid dựa trên cơ sở bộ khung 15 nguyên tử C gồm hai vòng benzen liên kết với một đường thẳng có 3C (C6-C3-C6) (Hình 1.1) [77].



Hình 1.1. Khung cơ bản của flavonoid

(Nguồn: *Shashank và cs (2013) [77]*)

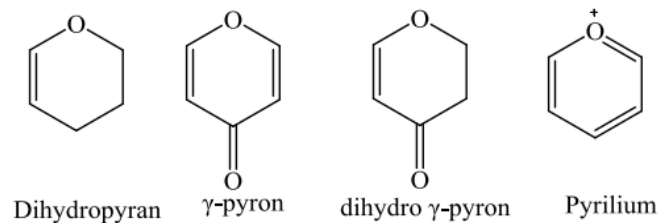
Trong một số trường hợp, ở một đầu mạch 3 carbon có một nhóm chức carbonyl, chúng được xem là dẫn xuất 1,3-diphenylpropan-1-one, hợp chất này là dihydrochalcone được phân lập từ nấm *Stinkhorn* (Hình 1.2).



Hình 1.2. Khung cơ bản của hợp chất chalcone

(Nguồn: *Shashank và cs (2013) [77]*)

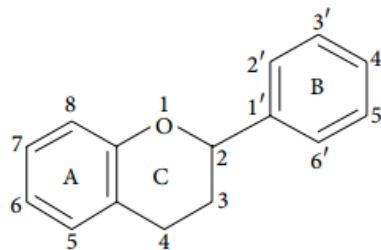
Hoặc 3 carbon đóng vòng với vòng A và tạo nên dị vòng có oxi (vòng C), dị vòng C có thể là dihydropyran, γ -pyron, dihydro- γ -pyron, pyrilium (Hình 1.3).



Hình 1.3. Các dạng dị vòng C của major flavonoid, isoflavonoid, neoflavonoid

(Nguồn: *Shashank và cs (2013) [77]*)

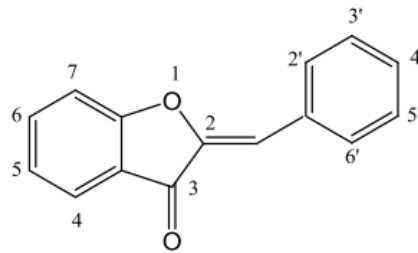
Như vậy, đa số các loại flavonoid (major flavonoid, isoflavonoid, neoflavonoid) có cấu trúc chung là vòng phenyl-benzopyran liên kết với vòng aryl (vòng B) có thể ở các vị trí 2, 3 hoặc 4 của vòng benzopyran (Hình 1.4).



Hình 1.4. Cấu trúc chung của nhóm major flavonoid

(Nguồn: *Shashank và cs (2013) [77]*)

Trong một số trường hợp, dị vòng 6 cạnh còn được thay thế bằng dị vòng 5 cạnh (furan) như aurone và auronol (Hình 1.5).



Hình 1.5. Cấu trúc chung của nhóm aurone

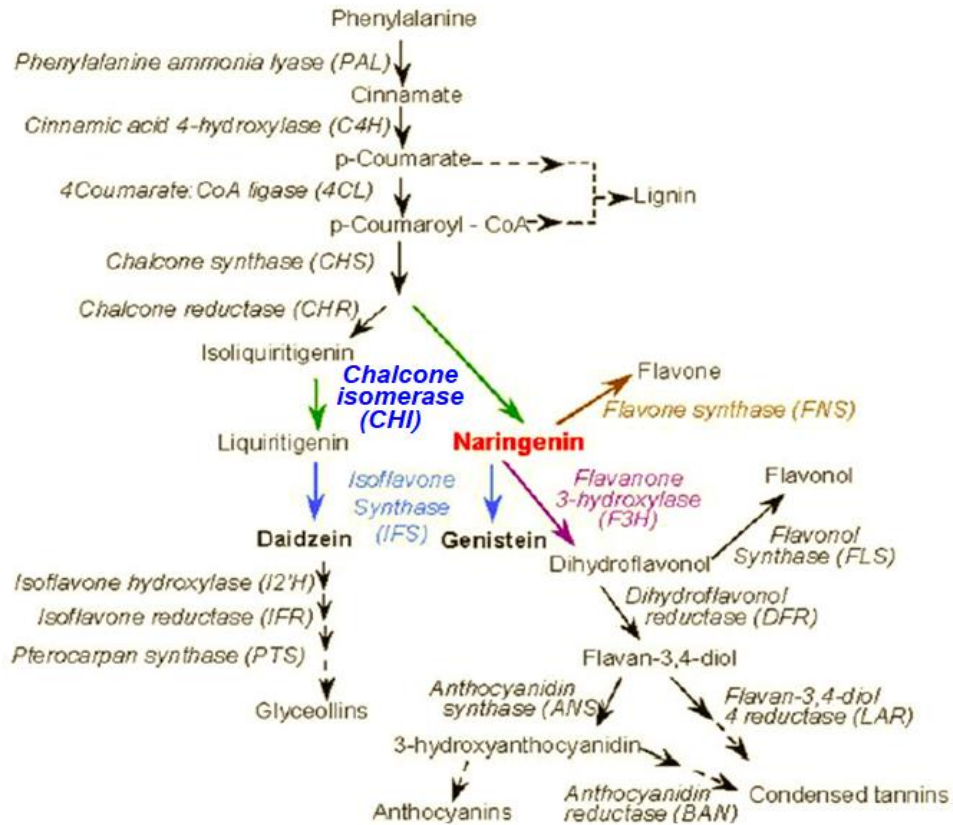
(Nguồn: *Shashank và cs (2013) [77]*)

Như vậy, dựa vào vị trí của gốc aryl (vòng B) và các mức độ oxi hóa của mạch 3C người ta chia flavonoid ra làm 3 loại chính. Đó là: (1) Euflavonoid là các flavonoid có gốc aryl (vòng B) ở vị trí C-2 gồm có flavonol, flavone, flavanon, flavanol, anthocyanidin; (2) Isoflavonoid là các flavonoid có gốc aryl (vòng B) ở vị trí C-3 gồm có isoflavone, isoflavanone, isoflavanol, isoflavane; (3) Neoflavonoid là các flavonoid có gốc aryl (vòng B) ở vị trí C-4 gồm có 4-arylcoumarin, neoflavene; Ngoài ra còn có biflavonoid và triflavonoid là các flavonoid có dị vòng 6 cạnh (vòng C) hoặc là mở, như trong chalcone, hoặc thay thế bằng một dị vòng 5 cạnh, như trong aurone (aurone và auronol) [25].

1.3.2. Con đường tổng hợp flavonoid ở thực vật

Con đường sinh tổng hợp flavonoid là một trong những lĩnh vực được nghiên cứu nhiều nhất của các hợp chất phenolic ở thực vật. Flavonoid được chia thành các phân nhóm (flavanone, flavon, flavonol, leucoanthocyanidin, anthocyanin và isoflavonoid) và tập trung chủ yếu ở hoa, quả và lá [77]. Hợp chất flavonoid được tổng hợp theo con đường phenylpropanoid, đây chính là con đường tổng hợp thứ cấp chủ yếu của thực vật bậc cao (Hình 1.6). Nguyên liệu đầu tiên là amino acid L-phenylalanine (L-Phe) hoặc trong vài trường hợp là L-tyrosine (L-Tyr) được chuyển hóa thành 4-coumaroyl CoA (hoặc một este thiol tương ứng với sự xuất hiện của 4-hydroxycinnamate khác). Sau đó, những este này được sử dụng như là tiền chất để tổng hợp các hợp chất như: flavonoid, lignin, lignan, coumarin, furanocoumarin và stilbene [20]. Các giai đoạn của con đường phenylpropanoid được xúc tác bởi hệ

thống các enzyme chủ chốt như: phenylalanine ammonia- lyase (PAL), cinnamate 4-hydroxylase (C4H), 4-coumarate CoA ligase (4CL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavone synthase II ((FNS II), flavanone-3-hydroxylase (F3H), flavonol synthase (FLS), dihydroxyflavonol 4-reductase (DFR), leucoanthocyanidin oxygenase (LDOX), isoflavone synthase và isoflavone reductase (IFS), các enzyme này được mã hóa bởi hệ thống gen tương ứng [7].



Hình 1.6. Con đường phenylpropanoid (phản ứng xúc tác bởi CHI màu xanh)

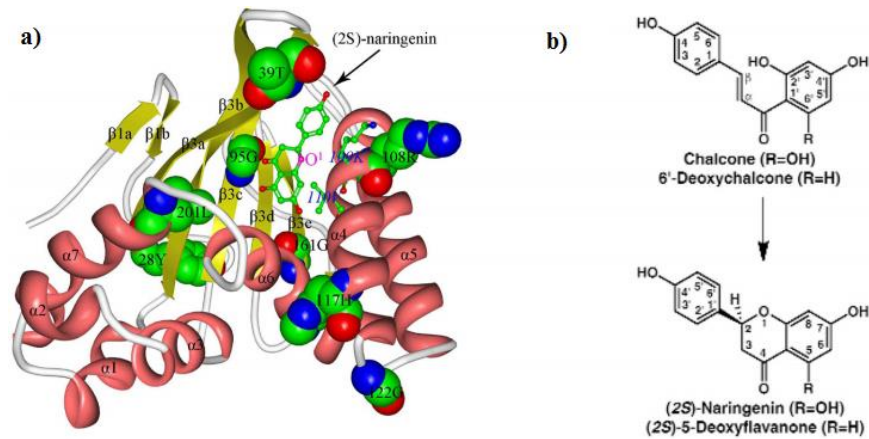
(Nguồn: Oliver và cs (2005) [70])

1.3.3. Enzyme CHI và biểu hiện gen mã hóa CHI

1.3.3.1. Enzyme CHI

CHI là một protein enzyme, gồm khoảng 220 amino acid, được phân lập từ hầu hết các loài thực vật bậc cao. CHI có cấu trúc gồm 7 chuỗi xoắn α và 7 phiến gấp β [91]. Cấu trúc tổng thể của MtCHI của cây *Medicago truncatula* giống như một bó hoa lộn ngược với một phiến gấp β lớn được tạo nên bởi năm phiến gấp β nhỏ đó là β 3a, β 3b, β 3c, β 3d, β 3e và bảy chuỗi α (α 1- α 7) đóng vai trò là lõi enzyme. Hai phiến gấp β nhỏ (β 1a, β 1b) ở phía đối diện của tấm β lớn (Hình 1.7) [33].

Cơ sở dữ liệu của PSI-BLAST cho thấy, trình tự các chuỗi CHI chỉ tìm thấy ở các cây thực vật bậc cao, kết quả này ngụ ý rằng cấu trúc không gian ba chiều và hoạt động enzyme là duy nhất ở giới thực vật [33]. So sánh trình tự amino acid của CHI từ nhiều loại thực vật hạt kín cho thấy có sự tương đồng cao, từ 49 % đến 82 %. Các phiến gấp β 3a, β 3b và các chuỗi xoắn α 4 và α 6 trong cấu trúc không gian bậc ba là những vùng bảo thủ của CHI. Đáng chú ý, những yếu tố cấu trúc này tạo thành một trung tâm hoạt động trên bề mặt của enzyme [91].



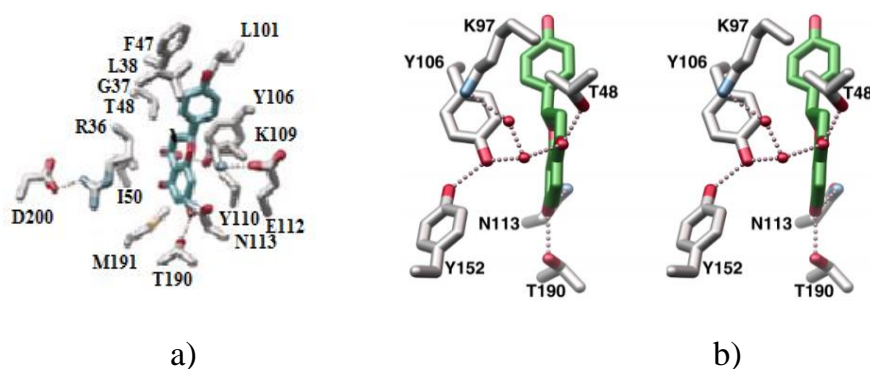
Hình 1.7. Cấu trúc và các vị trí amino acid hoạt động của enzyme CHI

(a): Cấu trúc của MtCHI (*M. truncatula*) từ Ngân hàng dữ liệu protein. Các chuỗi α được đánh dấu màu đỏ nhạt và phiến gấp β được đánh dấu màu vàng. Amino acid hoạt động (màu xanh) có cấu trúc phân tử được thể hiện trên protein và vị trí của (2S)-naringenin; (b): phân tử naringenin chalcone mạch hở được đóng vòng tạo thành (2S)-naringenin.

(Nguồn: Joseph và cs (2000) [33])

CHI phân lập từ thực vật được phân thành hai loại chính là loại I và loại II. CHI loại I có thể xúc tác cho 6-hydroxychalcone tạo thành 5-hydroxyflavanone (2S-naringenin) và được tìm thấy trong hầu hết các loại thực vật (thực vật họ Đậu cũng như không thuộc họ Đậu) [73]. CHI loại II chủ yếu tìm thấy trong cây họ Đậu, có thể xúc tác cho cả 6-hydroxychalcone tạo thành 5-hydroxyflavanone (2S-naringenin) và xúc tác cho 6-deoxychalcone tạo thành 5-deoxyflavanone (2S-liquiritigenin). Sau đó, 5-deoxyflavanone sẽ được chuyển hóa thành isoflavone và các dẫn xuất của flavone [78].

Vị trí liên kết của (2S)-naringenin trong cấu trúc CHI đã giúp cho việc xác định trung tâm hoạt động của enzyme (Hình 1.7). Mặc dù đã sử dụng hỗn hợp cơ chất là (2S)-naringenin và (2R)-naringenin trong phản ứng, nhưng chỉ có phân tử (2S)-naringenin gắn với trung tâm hoạt động của CHI. Trung tâm hoạt động của CHI phần lớn là amino acid không phân cực từ phiến gấp β 3a (Arg 36, Gly 37, Leu 38), phiến gấp β 3b (Phe 47, Thr 48, Ile 50), chuỗi xoắn α 4 (Tyr 106, Lys 109, Val 110, Asn 113) và chuỗi xoắn α 6 (Thr 190, Met 191) (Hình 1.8) [34].



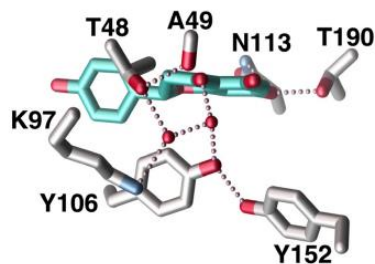
Hình 1.8. Sự gắn kết của 2S - naringenin với các vị trí hoạt động của CHI
 (a): Hình ảnh các gốc amino acid trong trung tâm hoạt động của CHI, (2S)-naringenin và phân tử nước. Liên kết hydro được thể hiện bằng đường chấm nhỏ;
 (b): Hình ảnh mô tả liên kết giữa trung tâm hoạt động của CHI và cơ chất (naringenin chalcone mạch hở hoặc 7,4'-dihydroxyflavanone).

(Nguồn: Joseph và cs (2000), (2001)[33], [34])

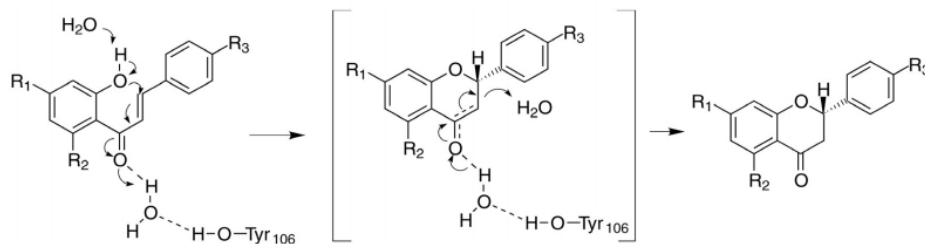
Các nguyên tử carbon *methylene* không bão hòa (không no) của Arg 36 được định vị bằng tương tác tĩnh điện giữa các nhóm guanidinium với Glu 200. Ngoài ra, các nguyên tử carbon *methylene* của Lys 109 cũng được cố định bởi sự tương tác tĩnh điện giữa nhóm amino và Glu 112. Ngoại trừ Thr 190 và Met 191, các liên kết giữa amino acid với (2S)-naringenin giống hệt nhau của các CHI từ các loài thực vật khác nhau. Mặc dù các liên kết van der Waals chiếm ưu thế trong sự tương tác giữa CHI và (2S)-naringenin, tuy nhiên vẫn có hai tập hợp mạng lưới liên kết hydro tồn tại.

Sự tương tác giữa enzyme và cơ chất xảy ra đầu tiên là giữa nhóm hydroxyl của Thr 190 với nhóm 7-hydroxyl của (2S)-naringenin; liên kết thứ hai là liên kết của một phân tử nước với nhóm axeton của naringenin (Hình 1.8). Việc kiểm tra

cấu trúc phức hợp CHI-naringenin cho thấy một mạng lưới liên kết hydro ở đáy của khe hở được tạo thành do liên kết của phân tử nước với nhóm axeton của (2S)-naringenin (Hình 1.9). Trong số 5 amino acid (Thr 48, Ala 49, Lys 97, Tyr 106 và Tyr 152) góp phần vào mạng lưới này, chỉ có Thr 48 và Tyr 106 được bảo tồn trong tất cả các CHI. Phân tử nước nằm giữa (2S)-naringenin và Tyr 106, trong đó tyrosine kích hoạt nước, để nó hoạt động như một acid. Khi đó, nước đóng vai trò là chất cho electron và kết hợp với một liên kết đôi giữa carbon-carbon của (2S)-naringenin có vai trò là một chất nhận electron của phản ứng cộng Michael. Kết quả phân tử chalcone-naringenin mạch hở được đóng vòng để tạo thành naringenin mạch vòng (Hình 1.10). Trong cơ chế này, hình dạng bổ sung và các tính năng tĩnh điện giữa trung tâm hoạt động của CHI và cấu tạo của cơ chất trước phản ứng hình thành (2S)-naringenin, cũng như phân cực của nhóm axeton của chalcone tạo điều kiện cho phản ứng cộng Michael, đẩy nhanh tốc độ phản ứng 10^7 lần [34].



Hình 1.9. Mạng lưới liên kết hydro của phức hợp CHI - naringenin (được thể hiện bằng bằng đường chấm màu hồng (Nguồn: *Joseph và cs (2001)[34]*)



Hình 1.10. Hình ảnh phân tử nước nằm giữa (2S) - naringenin và Tyr 106 trong phức hợp CHI - naringenin

(Nguồn: *Joseph và cs (2001)[34]*)

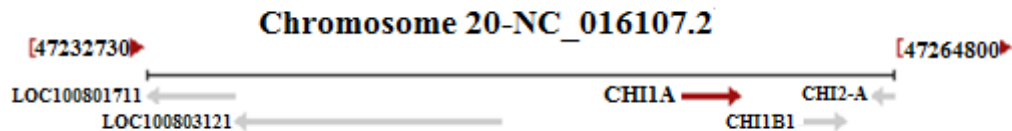
1.3.3.2. Gen *CHI*

Shimada và cs (2003) đã phân lập các gen từ cây họ Đậu *Lotus japonicus*, kết quả đã xác định được 4 gen *CHI* (*cDNA*), đó là *CHI1*, *CHI2*, *CHI3* và một *CHI* giả định (*CHI4*) có kích thước khoảng 15 kb. Trong đó gen *CHI2* có chuỗi amino acid suy diễn tương đồng với *CHI* của các cây không phải họ Đậu, do đó *CHI2* thuộc *CHI* loại I. Còn *CHI1* và *CHI3* tạo ra sản phẩm là isoflavone thuộc *CHI* loại II đặc trưng của cây họ Đậu. Đáng chú ý, *CHI* cùng loại từ các loài khác nhau cho thấy mức độ tương đồng là 70 %, trong khi trình tự của các loại *CHI* khác nhau thuộc cùng một loài chỉ có khoảng 50 % tương đồng [78].

Số gen *CHI* phụ thuộc vào loài và trong hầu hết các loài thực vật, chỉ có một vài gen *CHI*, trong khi *CHS* lại có nhiều gen mã hóa. Nhìn chung, các loài cây họ Đậu có nhiều gen *CHI* hơn là các loài thực vật khác. Ở các loài cây không phải họ Đậu, chỉ có một gen duy nhất mã hóa enzyme *CHI* [78]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, trong các cây họ Đậu, số gen *CHI* thay đổi từ một gen trong loài đậu *M. truncatula* đến hai gen trong *Madia sativa* và *Glycyrrhiza echinata*, lên đến bốn gen trong *L. japonicus* và năm gen trong *Glycine max* [65]. Do số lượng gen *CHI* tăng mà các nghiên cứu gần đây lại chia gen *CHI* thành các phân họ: *CHI* (bao gồm *CHI1* và *CHI2*), *CHIL* và *FAP* (gồm *FAPa1*, *FAPa2* và *FAPa3*). Hai gen *LangCHIL* trong hệ gen của loài đậu *Lupinus angustifolius* là tương đồng với hai gen *GmCHI4* (A và B) được phân lập từ đậu tương. Dastmalchi và cs (2015) đã xác định mười hai gen *GmCHI* ở đậu tương thuộc bốn phân họ dựa trên các trình tự amino acid tương đồng và các cơ chất đặc hiệu của protein *CHI* [15]. Ở hầu hết các loài thực vật, gen *CHI* có bốn exon và ba intron [78].

Tìm hiểu gen *CHI* trên GenBank cho thấy kích thước của gen *CHI* phân lập từ một số loài thực vật đã được công bố. Druka và cs (2003) đã xác định trình tự gen *CHI* (mã số *AF474922*) ở Lúa với kích thước là 1160 bp, đoạn mã hóa có 702 bp mã hóa cho phân tử protein gồm 233 amino acid [18]. Ralston và cs (2005) đã phân lập và xác định trình tự các gen *GmaCHI 1A* (*AY595413*), *Gma1B1* (*AY595414*), *Gma1B2* (*AY595419*), *Gma2* (*AY595415*), *Gma3* (*AY595416*), *Gma4* (*AY595417*) của đậu tương. Các gen này có kích thước lần lượt là 1157 bp, 809 bp, 786 bp, 902

bp, 1037 bp và 952 bp. Đoạn mã hóa của các gen này có kích thước lần lượt là 657 bp, 681 bp, 681 bp, 681 bp, 846 bp và 630 bp. Phân tử protein do các gen này mã hóa có mã số trên GenBank lần lượt là AAT94358, AAT94359, AAT94364, AAT94360, AAT94361, AAT94362 và có số lượng amino acid lần lượt là 218, 226, 226, 226, 281, 209 amino acid (Hình 1.11) [71].



Hình 1.11. Vị trí các gen *GmCHI* trong bản đồ gen

Các gen *GmCHI* nằm trên NST số 20 trong hệ gen của đậu tương, từ vị trí nucleotide 47255707 đến vị trí nucleotide 47258145.

(Nguồn: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?LinkName=nucore_gene&from_uid=51039621)

1.3.3.3. Nghiên cứu biểu hiện gen *CHI*

Để khẳng định cho quan điểm cho rằng *CHI* đóng một vai trò quan trọng trong con đường tổng hợp flavonoid, Forkmann và cs (1980) đã nghiên cứu thể đột biến gen *CHI* ở hoa Cẩm chướng nhận thấy rằng hoa có màu vàng do tích lũy naringenin-chalcone-2'-glucoside, trong khi dạng hoang dại có màu trắng hoặc màu đỏ [26]. Ở Hành tây, đột biến gen làm xuất hiện sớm mã kết thúc ở gen *CHI* đã làm cho enzyme CHI được tổng hợp bị mất hoạt tính, dẫn đến giảm đáng kể hàm lượng quercetin [38]. Fatemeh và cs (2016) đã nghiên cứu sự biểu hiện gen *CHI* ở cây Dạ yến thảo với bốn màu hoa khác nhau: đỏ, hồng, trắng và xanh. Kết quả cho thấy hoa màu đỏ có sự biểu hiện của gen *CHI* cao nhất và hàm lượng flavonoid tổng số cao hơn so với các màu hoa còn lại [22]. Đồng thời để nghiên cứu chức năng sinh học của *CHI*, đã có một số công trình nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen *CHI* ở một số loài thực vật. Muir và cs (2001) nghiên cứu chuyển gen *CHI* được phân lập từ Dạ yến thảo và được gắn vào vector pBBC50 của virus khảm Súp lơ (CaMV) vào Cà chua, kết quả là dòng Cà chua biến đổi gen sản xuất flavonol tăng đến 78 lần trong vỏ trái cây so với cây không chuyển gen, chủ yếu là do sự tích tụ của rutin, đồng

thời không có sự khác biệt về kiểu hình giữa dòng biến đổi gen và đối chứng không chuyển gen. Qua 4 thế hệ kiểm tra thấy rằng gen chuyển di truyền ổn định qua các thế hệ [64]. Li và cs (2006) phân lập gen *SmCHI* ở loài *Saussurea medusa* (*Asteraceae*). Vùng mã hóa của gen gồm 699 bp và protein suy diễn gồm 232 amino acid với khối lượng phân tử dự đoán là 24 kDa. Gen *SmCHI* đã được chuyển vào cây Thuộc lá và đã tạo được cây Thuộc lá chuyển gen có hàm lượng flavonid tổng số tăng gấp 5 lần so với dạng hoang dại chủ yếu là do tăng tích tụ các rutin [49]. Kim và cs (2007) đã nghiên cứu chức năng của *CHI* được phân lập từ nốt sần ở rễ của cây Nhót. Ở thể đột biến TT5 của cây *Arabidopsis*, gen *CHI* bị đột biến dẫn đến không sản xuất được enzyme CHI, làm cho chalcone naringenin không được chuyển thành naringenin, kết quả là hạt có màu vàng do thiếu proanthocyanidin. Khi biểu hiện quá mức gen *CHI* phân lập từ nốt sần của rễ cây Nhót ở thể đột biến TT5, kết quả là màu vỏ hạt bình thường đã được phục hồi. Ở dòng cây biến đổi gen, naringenin được sản xuất như ở cây không chuyển gen, trong khi nó không có ở các đột biến TT5 [39]. Lin và cs (2014) đã nghiên cứu vai trò của *CHI* trong cây Mẫu đơn đối với cơ chế tạo màu hoa. Gen *Ps-CH11* được phân lập từ cây hoa Mẫu đơn, kích thước là 924 bp, đoạn mã hóa dài 654 bp mã hóa một peptide gồm 217 amino acid có khối lượng phân tử dự đoán 23,3 kDa. Gen *Ps-CH11* biểu hiện cao nhất trong cánh hoa, mức độ vừa phải trong đài hoa, mức thấp trong lá và lá non và mức thấp nhất trong nhị hoa. Chuyển gen *Ps-CH11* vào Thuộc lá thông qua *Agrobacterium* đã thu được cây chuyển gen ở thế hệ T₁ có hàm lượng flavonol và flavone tăng gấp 3 lần so với cây không chuyển gen [52]. Lim và cs (2016) đã nghiên cứu và thấy rằng Cà chua trong tự nhiên có hàm lượng anthocyanin rất thấp. Nhưng ở Cà chua tím chuyển gen, hàm lượng anthocyanin cao hơn nhiều so với cây không chuyển gen, bởi sự biểu hiện mạnh của hai gen mã hóa nhân tố phiên mã *Delila* (*Del*) và *Roseal* (*Ros1*) từ cây hoa Mồm chó (*Snapdragons*). Tuy nhiên, nhân tố phiên mã *Del/Ros1* (*DR*) được chuyển vào Cà chua không thể điều hòa tất cả các gen nội sinh quan trọng, đặc biệt là gen *CHI*. Trong nghiên cứu này, gen *CHI* từ Hành tây được gắn vào *DR* của Cà chua để tăng cường sản xuất anthocyanin trong cả vỏ và thịt quả. Kết quả thu được cây chuyển gen có hàm lượng anthocyanin

tăng 400 lần trong vỏ cà chua và 260 lần trong thịt so với cây không chuyển gen. Trong khi dòng cây Cà chua chỉ mang DR có hàm lượng anthocyanin tăng 100 lần trong vỏ và 80 lần trong thịt Cà chua so với cây không chuyển gen. Hơn nữa, sự biểu hiện *CHI/DR* đã làm tăng hàm lượng flavonol tổng số trong thịt Cà chua lên đến 200 lần so với Cà chua không chuyển gen. Như vậy, sự kết hợp *CHI* với *DR* có thể làm tăng đáng kể hàm lượng anthocyanin và flavonol trong quả Cà chua [51]. Từ kết quả của những thực nghiệm trên có thể rút ra nhận xét rằng, kỹ thuật tăng cường biểu hiện gen *CHI* có thể được sử dụng như một phương pháp hữu ích để nâng cao hàm lượng flavonoid trong cây chuyển gen.

Trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu biểu hiện mạnh gen *CHI* ở cây Thuốc lá, Cà chua, Mướp đắng... Kết quả thu được hàm lượng flavonoid tổng số, flavonol, anthocyanin tăng nhiều lần so với cây đối chứng không chuyển gen. Cây Thổ nhân sâm và các loài thuộc chi *Talinum* chứa nhiều hợp chất thứ cấp có giá trị dược học, trong đó có flavonoid, nhưng hàm lượng rất thấp. 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 chìa khóa trong con đường chuyển hóa tổng hợp flavonoid ở cây Thổ nhân sâm cần được quan tâm và tập trung nghiên cứu.

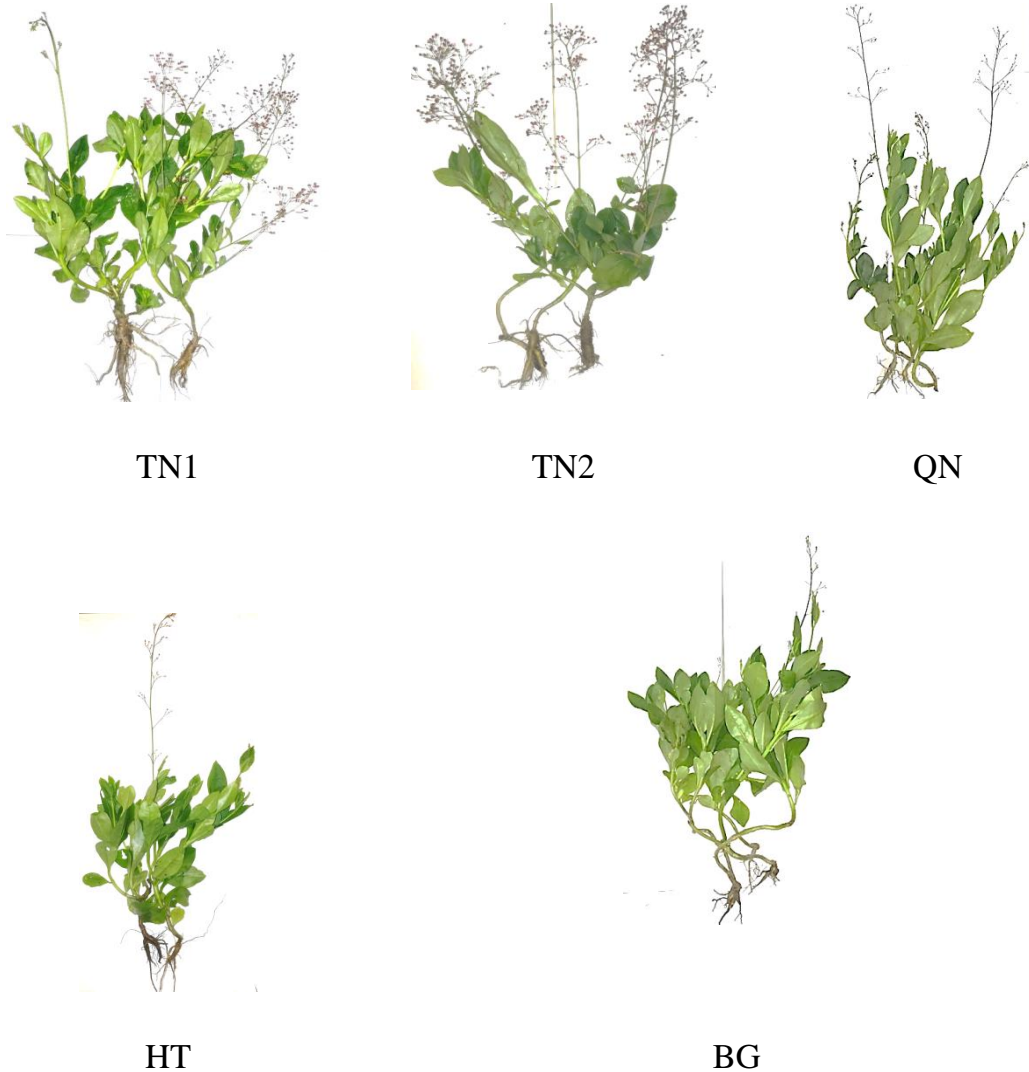
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu thực vật

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) (Hình 2.1)

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.

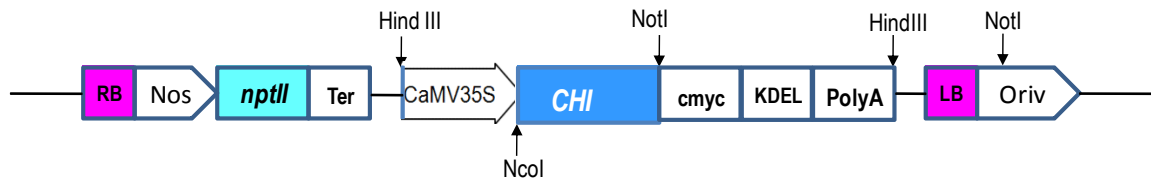


Hình 2.1. Mẫu cây Thổ nhân sâm thu tại thành phố Thái Nguyên (TN1)

2.1.2. Chủng vi khuẩn và các loại vector

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. Gen *GmCHI* trong cấu trúc *pCB301-GmCHI* được phân lập từ mRNA của giống đậu tương DT26 có kích thước 657 bp mã hóa 218 amino acid có mã số trên GenBank là LT594994.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT594994.1>) [5]. Cấu trúc *35S-GmCHI-cmyc-KDEL* trong vector *pCB301* được thể hiện ở hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen *pCB301-GmCHI*

nptII: gen kháng kanamycine; *CaMV35S*: promoter 35S; *CHI*: gen mã hóa chalcone isomerase phân lập từ cây đậu tương; *c-myc*: trình tự nucleotide mã hóa peptid c-myc; *KDEL*: trình tự nucleotide mã hóa peptide KDEL. *LB*: bờ trái; *RB*: bờ phải.

(Nguồn: Lê Thị Hồng Trang và cs (2016) [6])

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

2.2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Tinh sạch sản phẩm PCR được thực hiện theo kit GeneJET PCR Purification của hãng Fermentas, Mỹ. Các hoá chất: bacto pepton, yeast extract, agarose, sucrose, glucose, trypton, X-gal, KCl, Tris HCl, EDTA, NaOH, MgSO₄, MgCl₂, Glycerol, CaCl₂; các loại kháng sinh kanamycine, rifamycine, cefotaxime, carbenicilline,... của các hãng Fermentas, Invitrogen, Sigma, Amersham và một số hãng khác.

Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac300 (Bio-Rad, Mỹ), máy soi DNA (Mini-transilluminator, Bio-Rad, Mỹ), máy Voltex

(Mimishaker, IKA, Đức), máy ly tâm, máy xung điện Plulser, máy xác định hàm lượng nucleic acid NanoDrop, cùng với các thiết bị hiện đại khác.

Các loại môi được sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Thống kê các trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu

Cặp môi	Trình tự nucleotide 5' → 3'	Kích thước đoạn DNA (bp) dự kiến	Tài liệu tham khảo
<i>ITS-F/ITS-R</i>	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGT TCG	665	[40]
	TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTT ACT		
	GATCCCAGCATCACAATTCC		
<i>matK-F/ matK-R</i>	ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC	808	[40]
	CTCCTCTGTAAAGAATTC		
<i>rolC-F/ rolC-R</i>	ATGGCTGAAGACGACCTGTGT	520	[40]
	TTAGCCGATTGCAAACCTTGCA		
<i>virD-F/ virD-R</i>	ATGCCCCGATCGAGCTCAAG	338	[40]
	GACCCAAACATCTCGGCTG		
<i>CHI-NcoI-F/ CHI-NotI-R</i>	CATGCCATGGATGGCAACGATCAGC GCGGTT	657	[5]
	TTGCGGCCGCGACTATAATGCCGTG GCTC		

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

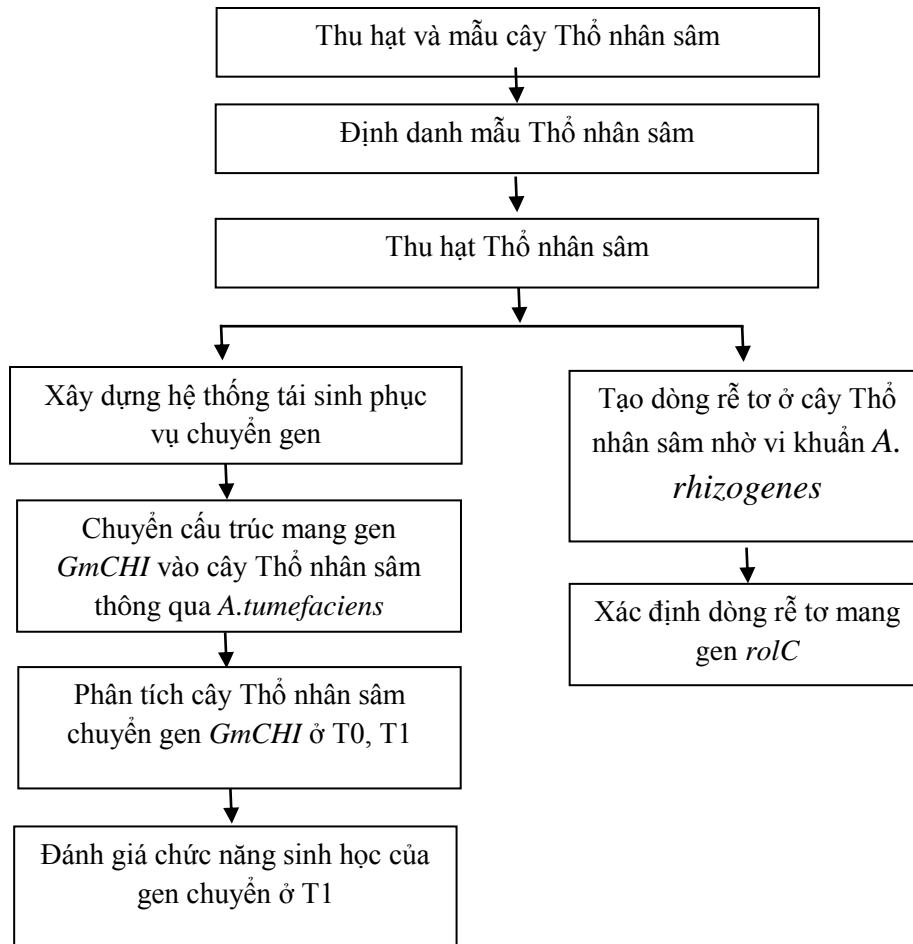
Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen vào cây Thổ nhân sâm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

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.

Đề tài được hoàn thành tại Bộ môn Sinh học, khoa Khoa học cơ bản, trường Đại học Y Dược - Đại học Thái Nguyên.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm được tiến hành theo sơ đồ mô tả ở hình 2.3.



Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát

Các phương pháp nghiên cứu được trình bày theo 5 nhóm chính: (1) nhóm phương pháp định danh các mẫu Thổ nhân sâm; (2) nhóm phương pháp nuôi cấy *in vitro*; (3) nhóm phương pháp tạo cây chuyển gen; (4) nhóm phương pháp phân tích cây chuyển gen; (5) nhóm phương pháp phân tích, xử lý số liệu.

2.3.1. Phương pháp định danh mẫu cây Thổ nhân sâm

Định danh mẫu cây Thổ nhân sâm dựa vào phương pháp hình thái so sánh và phương pháp phân loại học phân tử.

Phương pháp hình thái so sánh: Tại mỗi địa phương, thu 5 cây Thổ nhân sâm non và thu hạt của 5 cây Thổ nhân sâm khác đem trồng tại vườn Thực nghiệm khoa

Sinh học, trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên. Đặc điểm hình thái của cây Thổ nhân sâm được quan sát trực tiếp và mô tả đặc điểm rễ, thân lá, hoa, quả, hạt. Nhận diện mẫu cây Thổ nhân sâm theo mô tả của Phạm Hoàng Hộ (1999) [1], Đỗ Tất Lợi (2004) [3] và tra cứu trên <http://www.tropicos.org/Name/26200178> tại Bộ môn Thực vật học, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

Phương pháp phân loại học phân tử dựa vào một số mã vạch DNA như vùng *ITS* và đoạn gen *matK*. Lá non của tất cả các cây Thổ nhân sâm trong vườn Thực nghiệm được sử dụng cho tách chiết DNA bằng phương pháp CTAB theo Shanghai-Marooof và cs (1984) [75]. DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8 %.

Trình tự nucleotide của các cặp mồi *matK-F/matK-R*, *ITS-F/ITS-R* sử dụng trong PCR được tổng hợp theo Kress và cs (2005) [40] được thể hiện ở bảng 2.1.

Chu trình nhiệt của PCR đối với cặp mồi *ITS-F/ITS-R* là 94°C trong 5 phút, lặp lại 40 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn mồi ở 58°C trong 1 phút và tổng hợp ở 72°C trong 1 phút; sau 40 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 phút, lưu giữ ở 4°C. Chu trình nhiệt của PCR với cặp mồi *matK-F/matK-R* là 95° trong 2 phút, lặp lại 35 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 52°C trong 30 giây và tổng hợp ở 72°C trong 45 giây; sau 35 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 phút, lưu giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1 %. Sản phẩm PCR từ gel điện di được tinh sạch bằng bộ Kit QiAquick Gel Extraction (Qiagen, Đức). Sản phẩm này được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp bằng thiết bị tự động ABI PRISM 3500 XL (Applied Biosystems, Mỹ) theo nguyên lý của Sanger với bộ kit BigDye terminator cyclers v3.1. Trình tự nucleotide được so sánh với các trình tự đã có trên GenBank bằng phần mềm BLAST trong NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Trình tự DNA sau khi đọc được hiệu chỉnh với sự trợ giúp của phần mềm Bioedit v7.0.5.2.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phương pháp Neighbor-Joining nhờ phần mềm Mega 7 [43].

2.3.2. Các phương pháp nuôi cấy *in vitro*

2.3.2.1. Phương pháp khử trùng hạt

Để có được cây sạch bệnh trong ống nghiệm, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu quy trình khử trùng hạt *Thỏ nhân sâm* bằng cồn 70 % trong khoảng thời gian 1 phút, rửa sạch lại bằng nước cất, sau đó khử trùng hạt bằng dung dịch javel 60 % với các khoảng thời gian 5 - 10 - 15 - 20 phút và HgCl_2 0,1 % với khoảng thời gian 3 - 5 - 7 - 9 phút. Tiếp tục rửa sạch hạt bằng nước cất vô trùng 8 - 10 lần, sau đó cấy lên môi trường nảy mầm GM (Phụ lục 1). Số mẫu hạt đưa vào cấy 50 - 60 hạt/bình. Tất cả các thao tác khử trùng hạt được thực hiện trong box cấy. Sau khi cấy hạt, bình tam giác được đặt trên giá của phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật với điều kiện chiếu sáng theo quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, nhiệt độ phòng $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng 2000 lux. Theo dõi khả năng sinh trưởng phát triển của hạt trên môi trường MS cơ bản. Thí nghiệm lặp lại 3 lần và tính trung bình của 3 lần gieo hạt.

2.3.2.2. Phương pháp tái sinh đa chồi ở cây *Thỏ nhân sâm*

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ nách lá mầm

Lá mầm 2 tuần tuổi được gây tổn thương bằng mũi kim nhọn ở nách lá, sau đó cấy lên môi trường MS cơ bản, bổ sung 50 ml/l nước dừa và 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l BAP. Sự phát sinh chồi và sinh trưởng của chồi được đánh giá bằng các chỉ tiêu về số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi, chất lượng chồi sau 2 tuần và 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng BAP và ảnh hưởng kết hợp giữa BAP và IBA đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

Đoạn thân có kích thước 1,0 - 1,5 cm mang mắt chồi bên sau 6 - 8 tuần nuôi cấy được gây tổn thương bằng dao chẻ dọc qua giữa 2 mắt chồi bên, dùng kim châm gây tổn thương ở mắt chồi bên, sau đó cấy lên môi trường MS cơ bản, bổ sung 50 ml/l nước dừa và 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l, 2,5 mg/l, 3,0 mg/l BAP và kết hợp giữa BAP (nồng độ tối ưu) với 0,2 mg/l; 0,4 mg/l; 0,6 mg/l; 0,8 mg/l; 1,0 mg/l; 1,2 mg/l IBA. Sự phát sinh và sinh trưởng của chồi được đánh giá bằng các

chỉ tiêu về số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi, chất lượng chồi sau 2 tuần và 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của IAA và NAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm

Sử dụng chồi tái sinh sau 4 - 6 tuần nuôi cấy *in vitro* có kích thước 1,0 - 1,5 cm cấy lên môi trường MS cơ bản, bổ sung IAA và NAA với các nồng độ lần lượt là 0,3 mg/l; 0,5 mg/l; 0,7 mg/l; 0,9 mg/l; 1,1 mg/l. Khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm được đánh giá bằng số lượng rễ/chồi, chiều dài rễ sau 2 tuần và 4 tuần nuôi cấy.

Ra cây trên giá thể

Chọn cây Thổ nhân sâm sau 8 tuần nuôi cấy *in vitro* có bộ rễ dài, khỏe, lá xanh để đưa ra môi trường tự nhiên. Tiêu chuẩn cây con: kích thước trung bình cây khoảng 5 cm. Rễ dài khoảng 3 - 4 cm. Số lá đạt 8 - 10 lá.

Phương pháp ra cây, trước khi đưa cây con ra trồng ngoài tự nhiên tiến hành huấn luyện để cây quen dần với điều kiện môi trường bên ngoài bằng cách: Đặt bình cây ra điều kiện ánh sáng và nhiệt độ tự nhiên, không cho ánh sáng chiếu trực tiếp vào bình nuôi cây. Thời gian này kéo dài khoảng 7 ngày, tăng dần cường độ chiếu sáng vào những ngày cuối để tăng nhanh khả năng thích nghi của cây. Sau đó, các bình cây được mở nắp, đổ nước vào ngâm 15 phút, lắc nhẹ để thạch rời ra khỏi rễ, dùng panh gấp nhẹ các cây ra khỏi bình không để dập nát. Rửa sạch phần thạch và đường bám vào vì chúng thường là môi trường thích hợp cho nấm bệnh phát triển hoặc côn trùng tấn công. Sau đó, ngâm cây trong chậu nước sạch để tránh hiện tượng mất nước rồi đem trồng vào giá thể. Các giá thể sử dụng trong thí nghiệm bao gồm: đất thịt trung bình, đất thịt pha cát 2:1, đất thịt trung bình + trấu hun (2:1), đất thịt trung bình + cát + trấu hun (2:1:1).

Chế độ chăm sóc cây con trên các giá thể, trong 2 - 3 ngày đầu tưới nước sạch bằng cách phun sương 4 lần/ngày (giữ độ ẩm giá thể khoảng 75 % - 80 %). Sau đó, tưới nước bằng bình phun 2 - 3 lần/ngày. Sau khi cây sống, ra rễ mới, lá mới có thể đưa ra ngoài nhà lưới. Các công thức được bố trí với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 60 cây/công thức. Đánh giá kết quả sau khi ra cây 45 ngày. Theo dõi tỷ lệ cây sống, khả năng sinh trưởng của cây (chiều cao cây, kích thước lá, màu sắc lá).

2.3.2.3. Phương pháp nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm

Thí nghiệm khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm

Hầu hết các mô và cơ quan thực vật gồm lá mầm, thân, lá hay cuống lá đều có khả năng nhiễm *A. rhizogenes* và cảm ứng hình thành rễ tơ. Tuy nhiên, hiệu quả biến nạp gen cảm ứng tạo rễ tơ phụ thuộc vào sự tương tác giữa *A. rhizogenes* với từng loại mô, từng loại tế bào [50], [89]. Vì vậy, thí nghiệm được thực hiện nhằm xác định mẫu phù hợp cho hiệu suất tạo rễ tơ cao. Theo đó, lá mầm hai tuần tuổi được gây tổn thương bằng mũi kim nhọn ở nách lá. Lá và đoạn thân mang mắt chồi bên được tách ra từ cây Thổ nhân sâm sau nuôi cấy *in vitro* 6-8 tuần, các mảnh lá được cắt với kích thước khoảng 1 cm², đoạn thân có kích thước 1,0 -1,5 cm mang mắt chồi bên được gây tổn thương bằng dao chẻ dọc qua giữa 2 mắt chồi bên, dùng kim châm gây tổn thương ở mắt chồi bên. Sau đó các mẫu vật được sử dụng làm vật liệu lây nhiễm. Sự phát sinh và sinh trưởng của rễ tơ được đánh giá bằng tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ, số rễ/mẫu, chiều dài rễ, tỷ lệ rễ tơ sinh trưởng phát triển tốt sau 4 tuần.

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn A. rhizogenes, nồng độ AS, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ mô lá Thổ nhân sâm

Chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 gốc được cấy ria trên môi trường LB đặc, nuôi trong tủ ấm 28°C trong 48 giờ. Lấy một khuẩn lạc nuôi phục hồi trong 20 ml LB lỏng, nuôi lắc 110 rpm ở 28°C qua đêm. Nhân nuôi thu sinh khối: lấy 5ml dịch khuẩn phục hồi cho vào 45 ml LB lỏng, nuôi lắc 110 rpm ở 28°C trong 4 - 5 giờ và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm (OD₆₀₀), OD₆₀₀ đạt 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 là có thể sử dụng cho biến nạp [37]. Các môi trường nuôi khuẩn đều không bổ sung kháng sinh do vector pRi 15834 không có gen kháng kháng sinh. Dịch khuẩn được ly tâm 4000 rpm, ở 4°C trong 10 phút thu sinh khối, loại bỏ môi trường nuôi cấy. Cặn khuẩn được hòa tan trong môi trường ½ MS lỏng có bổ sung AS với các nồng độ 50 µmol/l; 75 µmol/l; 100 µmol/l; 125 µmol/l; 150 µmol/l tạo dịch huyền phù vi khuẩn. Mẫu cấy (mô lá) được cắt, tạo vết thương bởi dao cấy và được nhúng vào dịch khuẩn trong khoảng thời gian 5 - 10 - 15 - 20 - 25 phút. Sau đó chuyển mẫu cấy lên

giấy thấm đã khử trùng, thấm khô và cấy lên môi trường MS cơ bản trong khoảng thời gian 1 - 2 - 3 - 4 - 5 ngày nuôi trong điều kiện tối. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes*, nồng độ AS, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ mô lá Thổ nhân sâm được đánh giá bằng tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime

Kết thúc giai đoạn đồng nuôi cấy, mẫu cấy được chuyển sang môi trường diệt khuẩn MS cơ bản có bổ sung kháng sinh cefotaxime 350 mg/l; 400 mg/l; 450 mg/l; 500 mg/l; 550 mg/l; 600 mg/l; 650 mg/l trong điều kiện tối. Xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime được đánh giá bằng các chỉ tiêu tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm, tỷ lệ mẫu sống sót và tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm phân tích dòng rễ tơ chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

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 và sự vắng mặt của gen *VirD2* trong rễ tơ để khẳng định tế bào thực vật đã chuyển gen không bị nhiễm vi khuẩn trên bề mặt tế bào (Bảng 2.1) [17], [84], [88]. DNA của rễ tơ được tách chiết bằng phương pháp CTAB theo Shanghai-Marouf và cs (1984) [75]. DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8 %. Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích hỗn hợp là 25 µl gồm 1 µl DNA tổng số (hay Ri plasmid), 2 µl dNTPs 2 mM; 0,5 µl DreamTaq DNA polymerase (1unit/µl); 1 µl mỗi mồi với nồng độ 10 pmol; 1,5 µl DreamTaq buffer và bổ sung nước cất vô trùng để đủ thể tích. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *rolC* là biến tính ban đầu ở 95°C trong 2 phút, 30 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây và 72°C trong 60 giây) và 10 phút kéo dài ở 72°C [84]. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *virD2* 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 %. Gel sau đó sẽ được ngâm với dung dịch nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV.

Thí nghiệm nghiên cứu trạng thái môi trường tối ưu để nuôi cấy sinh khối rễ tơ

Sau khi xác định được dòng rễ tơ chuyển gen nhờ kỹ thuật PCR, lựa chọn dòng rễ tơ sinh trưởng, phát triển tốt nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản với các trạng thái môi trường khác nhau (đặc, bán lỏng, lỏng) để khảo sát khả năng tăng trưởng của rễ tơ *Thỏ nhân sâm*. Môi trường đặc là môi trường có chứa 8 g agar/l, môi trường bán lỏng chứa 4 g agar/l và môi trường lỏng không chứa agar nuôi lắc 90 rpm ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Chỉ tiêu theo dõi là khối lượng rễ tươi và khối lượng rễ khô sau 4 tuần nuôi cấy (khối lượng rễ khô được xác định bằng cách rễ tơ sau khi thu sinh khối được sấy ở nhiệt độ 45°C đến khối lượng không đổi [27]).

2.3.3. Phương pháp chuyển gen *GmCHI* ở cây *Thỏ nhân sâm*

2.3.3.1. Khảo sát vật liệu thích hợp tạo đa chồi sau khi biến nạp *A. tumefaciens* vào cây *Thỏ nhân sâm*

Chuẩn bị nguyên liệu chuyển gen: Vật liệu được sử dụng để lây nhiễm *A. tumefaciens* là lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên. Theo đó, lá mầm hai tuần tuổi được gây tổn thương bằng mũi kim nhọn ở nách lá. Đoạn thân mang mắt chồi bên được tách ra từ cây *Thỏ nhân sâm* sau nuôi cấy *in vitro* 6-8 tuần có kích thước 1,0 - 1,5 cm, được gây tổn thương bằng dao cẻ dọc qua giữa 2 mắt chồi bên, dùng kim châm gây tổn thương ở mắt chồi bên. Sau đó các mẫu vật được sử dụng làm vật liệu lây nhiễm.

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn A. tumefaciens: Nuôi chủng *A. tumefaciens* C58 chứa vector chuyển gen *pCB301-GmCHI* trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin (50 mg/l) và rifamycin (50 mg/l) trong tủ ôn nhiệt 28°C , nuôi lắc 150 rpm, trong 48 giờ. Lấy 4 ml dịch huyền phù tế bào vi khuẩn này nuôi phục hồi trong 25 ml LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin và rifamycin ở 28°C , nuôi lắc 150 rpm trong 3 - 4 giờ. Lấy dịch huyền phù vi khuẩn nuôi cấy lần 2 ly tâm với tốc độ 5000 rpm trong 15 phút ở 4°C . Loại bỏ dịch nổi và hòa tan tế bào lắng vào trong môi trường $\frac{1}{2}$ MS lỏng và pha loãng cho tới mật độ tế bào vi khuẩn $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$ là đạt số lượng tế bào tối ưu để biến nạp.

Nhiễm vi khuẩn và đồng nuôi cấy: Lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn có bổ sung AS 100 $\mu\text{mol/l}$ trong 10 phút, sau

đó thấm khô và cấy trên môi trường đồng nuôi cấy đặc CCM không bổ sung kháng sinh (Phụ lục 1). Quá trình đồng nuôi cấy diễn ra trong tối ở 25⁰C trong 2 ngày.

Diệt khuẩn và tạo đa chồi: Lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi lây nhiễm được rửa bằng dung dịch ½ MS có bổ sung cefotaxim 500 mg/l. Thấm khô mẫu bằng giấy thấm khử trùng, dùng panh và dao cắt bỏ phần chồi chính xuất hiện trên các mảnh lá mầm, cấy mẫu trên môi trường tạo cụm chồi SIM đặc lần 1 (Phụ lục 1). Sau thời gian 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường SIM đặc lần 2 (Phụ lục 1). Sự phát sinh chồi và sinh trưởng của chồi được đánh giá bằng các chỉ tiêu về số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi, chất lượng chồi sau 2 tuần và 4 tuần nuôi cấy.

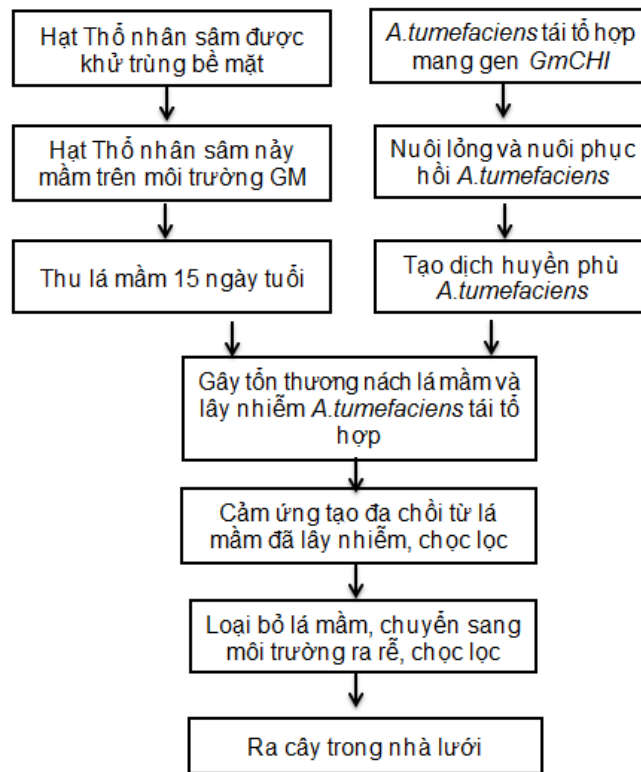
Kéo dài chồi: Sau 3-4 tuần các cụm chồi sống sót trên môi trường chọn lọc được chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM (Phụ lục 1).

Tạo rễ: Khi các chồi phát triển đạt kích thước 4 - 5 cm thì cấy chuyển sang môi trường tạo rễ RM (Phụ lục 1) để tạo cây hoàn chỉnh.

Ra cây: Những cây tái sinh hoàn chỉnh có bộ rễ khỏe, lá xanh, đẹp sẽ được chuyển ra giá thể trong bầu đất mùn + trấu hun với tỷ lệ 1:1. Sau khoảng 1 - 2 tuần, các cây sống sót được trồng trong nhà lưới. Tính toán thời gian biến nạp và tái sinh để thời điểm ra cây trùng với thời tiết mùa xuân.

2.3.3.2. Chuyển gen *GmCHI* vào cây Thổ nhân sâm thông qua *A. tumefaciens*

Sơ đồ thí nghiệm chuyển gen *GmCHI* vào lá mầm Thổ nhân sâm được mô tả tổng quát trong hình 2.4 và thành phần môi trường tái sinh phụ lục 1.



Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm chuyển gen *GmCHI* vào cây Thổ nhân sâm qua rách lá mầm

2.3.4. Phương pháp phân tích cây chuyển gen

2.3.4.1. Kỹ thuật PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *GmCHI*

Phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R* (Bảng 2.1) để xác định sự có mặt của gen *GmCHI* trong cây chuyển gen, kiểm tra kết quả bằng điện di trên gel agarose 1 % với kích thước dự kiến khoảng 0,66 kb.

2.3.4.2. Kỹ thuật Southern blot xác định sự hợp nhất của gen chuyển *GmCHI* vào hệ gen cây Thổ nhân sâm

Đánh giá kết quả hợp nhất của gen chuyển *GmCHI* vào hệ gen của cây Thổ nhân sâm chuyển gen được thực hiện theo phương pháp Southern blot của Southern (1975) [80] theo các bước cơ bản sau:

(1) Tách chiết DNA tổng số của cây chuyển gen cần phân tích, đạt nồng độ 10 µg mẫu DNA tổng số. Sau đó tiến hành tinh sạch DNA tổng số để phục vụ cho phản ứng cắt enzyme giới hạn.

- (2) Thực hiện phản ứng cắt DNA bằng enzyme giới hạn với thành phần gồm 5 μ l enzyme *NotI* (10u/ μ l), 5 μ l buffer 10X, 30 μ l DNA 30 μ g/ μ l, 10 μ l nước khử ion. Phản ứng ở 37°C để qua đêm.
- (3) Điện di sản phẩm cắt DNA tổng số trên gel agarose 1 %, ở điện thế thấp trong thời gian 6 giờ.
- (4) Chuyển lên màng nitrocellulose hay còn gọi là blotting: Màng lai được cắt vừa với bản gel và đặt dưới bản gel, một cột giấy được đặt phía dưới nhằm tạo áp lực thẩm thấu trong khi dung dịch chuyển màng thấm truyền từ trên thông qua các tấm giấy lọc được cấp từ khay đựng buffer. Quá trình chuyển màng hoàn tất sau 3 giờ với bản gel dày dưới 5 mm, hoặc qua đêm. Sau đó màng lai được rửa với dung dịch 2X SSC và tiến hành lai với mẫu dò.
- (5) Tổng hợp mẫu dò (probe): Sản phẩm PCR nhân gen *GmCHI* bằng cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R* được tinh sạch để làm khuôn cho phản ứng tổng hợp mẫu dò theo hướng dẫn của bộ Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit DNA.
- (6) Tiền lai và lai: Màng lai được cố định bằng dung dịch tiền lai (200 μ l/cm²) trong 4 giờ ở 44°C trong ống lai. Sau đó đổ bỏ dung dịch tiền lai, bổ sung dung dịch lai (60 μ l/cm²), lai qua đêm ở 44°C.
- (7) Rửa màng: Màng lai được rửa 2 lần với đệm rửa 2x ở nhiệt độ phòng, 1 lần với đệm rửa 1x ở 65°C trong 15 phút, 2 lần với đệm rửa 0,1x ở 65°C trong thời gian 15 phút.
- (8) Hiện màng: Phức hợp enzyme streptavidin-AP có khả năng gắn bám đặc hiệu với gốc biotin trên mẫu dò. Ngoài ra, enzyme alkaline phosphatase có khả năng phân hủy BCIP-T (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt) thành hợp chất có màu tím đen. Nhờ vậy có thể phát hiện mẫu dò gắn với đoạn DNA cần nghiên cứu trên màng lai. Quy trình này được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit Biotin Chromogenic Detection Kit (hãng Themoscience).

2.3.4.3. Phân tích sự biểu hiện của protein *GmCHI* tái tổ hợp ở cây *Thỏ nhân sâm* chuyển gen bằng *Western blot*

Các cây chuyển gen cho kết quả lai Southern được sử dụng cho phân tích sự biểu hiện protein *GmCHI* tái tổ hợp bằng *Western blot*. Protein tổng số được chiết

rút từ 0,5 g mẫu nghiền trong nitor lỏng và hoà tan trong 1 ml PBS + Tween 0,05 %, ly tâm 13000 rpm trong 15 phút. Điện di biến tính protein trên gel polyacrylamide - SDS 10 % và chuyển protein từ gel điện di lên màng lai nitrocellulose bằng máy Pierce G2 Fast Blotter (25 V, 1,3 mA trong 20 phút). Màng chứa protein kháng nguyên c-myc được phủ bằng 5 % sữa tách béo pha trong dung dịch PBS và Tween 0,05 % trong 16 giờ. Lai kháng thể 1 bằng cách ngâm màng trong 15 ml dung dịch PBS 5 % sữa tách béo có chứa kháng thể sơ cấp anti-c-Myc monoclonal với độ pha loãng 700 lần, lắc trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Ngâm màng trong 15 ml dung dịch PBS + 5 % sữa tách béo có chứa kháng thể thứ cấp anti-mouse IgG có gắn HRP (Horse Radish Peroxidase) trong 2 giờ để tiến hành lai với kháng thể thứ 2. Hiện màu trong dung dịch có chứa cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) hoặc DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), hiển thị kết quả dưới ánh sáng thường [45].

Hiệu suất chuyển gen ở mỗi giai đoạn được tính bằng số dòng cây dương tính với PCR, hoặc dương tính với Southern blot, hoặc với Western blot trong tổng số mẫu biến nạp theo công thức sau:

$$\text{Hiệu suất chuyển gen (\%)} = \frac{\text{Số dòng cây chuyển gen}}{\text{Tổng số mẫu biến nạp}} \times 100$$

2.3.4.4. Phân tích định lượng protein GmCHI tái tổ hợp trong cây chuyển gen bằng ELISA

Kỹ thuật ELISA định lượng protein GmCHI tái tổ hợp được tiến hành theo phương pháp của Sun và cs (2006) [81]. Dịch chiết protein tổng số từ cây Thổ nhân sâm chuyển gen T1 được pha loãng đến nồng độ 200 µg/ml, lấy 100 µl mẫu tra vào đĩa microplate, mỗi mẫu lặp lại 3 lần. Lượng protein tái tổ hợp được xác định bằng sử dụng kháng thể 1 kháng cmyc, kháng thể 2 là kháng thể kháng chuột IgG cộng hợp HRP và cơ chất màu là dung dịch TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine). Kết quả đo màu ở bước sóng 630 nm cho phép xác định nồng độ protein tái tổ hợp gắn đuôi c-myc. Đối chứng dương là protein scFv được pha loãng bằng dung dịch coating buffer. Dây pha loãng protein scFv gắn đuôi c-myc

được tra vào các giếng với lượng 25; 50; 100; 200; 400 ng/giếng để gián tiếp dựng đường chuẩn định lượng.

2.3.4.5. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số trong cây Thổ nhân sâm bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ

Flavonoid trong cây Thổ nhân sâm chuyển gen T1 được chiết bằng methanol, sau đó cho phản ứng với $AlCl_3$ rồi đem đo quang phổ ở bước sóng 415 nm theo Kalita và cs (2013) [36]. Đường chuẩn quercetin được xây dựng bằng cách phân tích dãy chuẩn có nồng độ từ 10 $\mu g/ml$ đến 100 $\mu g/ml$. Đường chuẩn mô tả sự phụ thuộc của độ hấp thụ phân tử (trục tung) vào nồng độ dung dịch chuẩn tương ứng ($\mu g/ml$). Mẫu cây Thổ nhân sâm tươi được nghiền mịn, trộn đồng nhất. Cân một lượng khoảng 0,1 - 0,5 g mẫu (tương đương 10 mg quercetin). Lắc đều, siêu âm 30 phút và định mức bằng methanol đến vạch của bình định mức 100 ml. Lấy chính xác 0,5 ml dịch chiết hoặc dãy chuẩn; 1,5 ml MeOH; 0,1 ml dung dịch $AlCl_3$ 0,1 %; 0,1 ml dung dịch kali acetat 1M; 2,8 ml nước cất, lắc đều rồi tiến hành đo quang phổ tại bước sóng 415 nm trên máy UV-VIS.

Kết quả được tính toán theo công thức:

$$C_m = \frac{A_m}{A_c} \cdot C_c \cdot k \frac{V}{m}$$

Trong đó: C_m : nồng độ của mẫu phân tích được tính bằng μg đương lượng quercetin/g mẫu tươi ($\mu g/g$); C_c : nồng độ quercetin trong dung dịch chuẩn làm việc ($\mu g/ml$); A_m ; A_c : độ hấp thụ của mẫu và của dung dịch chuẩn; V : thể tích cuối (ml); m : khối lượng mẫu (g); k : hệ số pha loãng.

Sau khi xác định được hàm lượng flavonoid tổng số trong các mẫu nghiên cứu, tiến hành đổi đơn vị từ $\mu g/g$ thành mg/g .

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. Phân tích so sánh các trị số trung bình theo phép kiểm định Duncan của phần mềm SPSS với $p < 0,05$. Các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái khác nhau (a, b, c, d, e...) trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê, còn các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau trong cùng một cột biểu thị không sai khác có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Duncan với $p < 0,05$.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

3.1.1. Kết quả định danh các mẫu Thổ nhân sâm

Các mẫu cây Thổ nhân sâm thu thập tại một số địa phương phía Bắc Việt Nam được định danh bằng phương pháp hình thái so sánh và phân loại học phân tử. Chỉ tiêu hình thái được lựa chọn là đặc điểm cơ quan dinh dưỡng (rễ, thân, lá) và cơ quan sinh sản (hoa, quả, hạt); đối chiếu, so sánh với mô tả về cây Thổ nhân sâm theo Phạm Hoàng Hộ (1999) và Đỗ Tất Lợi (2004). Tiêu chí phân tử được xác định dựa trên tỷ lệ tương đồng của vùng *ITS* và đoạn gen *matK* phân lập từ mẫu thu thập so với các trình tự cùng loài, các loài cùng chi, các chi cùng họ trên GenBank.

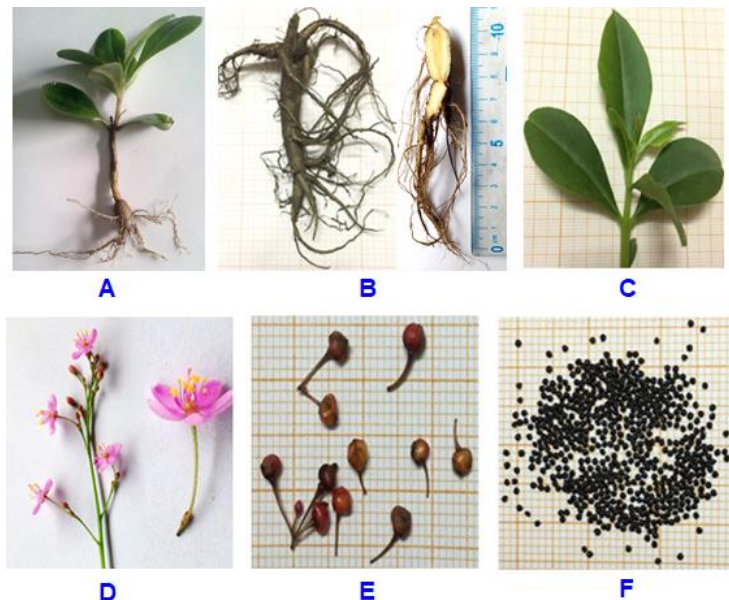
3.1.1.1. Đặc điểm hình thái các mẫu Thổ nhân sâm thu ở một số địa phương

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 Hoàn Bò, 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), bề mặt ngoài màu nâu đen, lúc mới thu hoạch bên trong củ màu trắng, nhưng khi phơi khô chuyển màu đen, hình dáng giống củ Nhân sâm. 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 chùm 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).

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) [1], Đỗ Tất Lợi (2004) [3] và đồng thời tra cứu trên <http://www.tropicos.org/Name/26200178>

cho thấy các mẫu Thổ nhân sâm BG, TN1, TN2, HT, QN thu tại thành phố Thái Nguyên; huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên; thị xã Sơn Tây, Hà Nội; huyện Hoàn Bò, tỉnh Quảng Ninh thuộc cùng loài *T. paniculatum*, chi *Talinum*, họ Rau sam (Portulacaceae), bộ Cẩm chướng (Caryophyllales), phân lớp Cẩm chướng (Caryophyllidae), lớp Hai lá mầm (Magnoliopsida), ngành Thực vật có hoa; Mộc lan; Hạt kín (Magnoliophyta).

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.



Hình 3.1. Cây Thổ nhân sâm

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

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

Đặc điểm trình tự vùng *ITS*

DNA tổng số được tách chiết từ lá non của 5 mẫu Thổ nhân sâm được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi *ITS-F/ITS-R*. Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được vùng *ITS* có kích thước 643 bp. Bằng phần mềm 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* [68], *L78094* [32], *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*

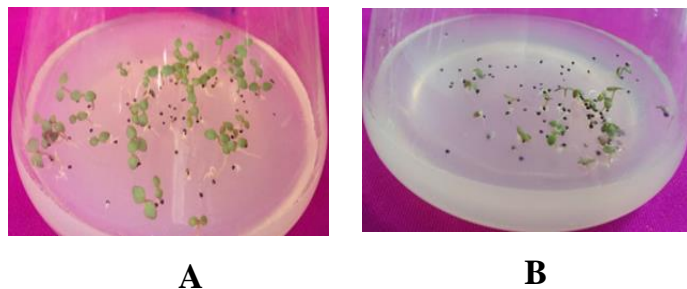
DNA tổng số được tách chiết từ lá non của 5 mẫu Thổ nhân sâm được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi *matK-F/matK-R*. Kết quả giải trình tự nucleotide thu được đoạn DNA của cả 5 mẫu Thổ nhân sâm có kích thước 808 nucleotide. Bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự đoạn DNA phân lập từ 5 mẫu 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* [19], *KY952520* [79], *GQ434150* [12] 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

Sau khi khử trùng hạt bằng dung dịch javel 60 % và HgCl_2 0,1 % ở các khoảng thời gian khác nhau, kết quả được thể hiện ở hình 3.2 và bảng 3.1.



Hình 3.2. Hạt nảy mầm sau 10 ngày nuôi cấy

A: hạt nảy mầm sau khi khử trùng bằng dung dịch javel 60 % trong 10 phút; B: hạt nảy mầm sau khi khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1 % trong 5 phút.

Kết quả ở hình 3.2 (A) và bảng 3.1 cho thấy, thời gian khử trùng trong javel 60% tăng lên đã làm giảm khả năng nhiễm của hạt, cao nhất ở thời gian xử lý hạt 20 phút cho tỷ lệ bình không bị nhiễm là 94,52 %. Tuy nhiên, tỷ lệ nảy mầm của hạt lại tỷ lệ nghịch với thời gian khử trùng. Khi thời gian khử trùng càng cao thì tỷ lệ hạt không nảy mầm càng lớn. Ở thí nghiệm không xử lý, tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất là 94,04 %; thấp nhất là 30,33 % ở thời gian khử trùng hạt 20 phút. Chồi phát triển tốt ở thời gian khử trùng hạt 5-10 phút (chồi mập, dài, có màu xanh bình thường). Thời gian xử lý mẫu càng cao thì chồi mầm có sức sống giảm, chồi gầy, màu vàng. Như vậy, thời gian khử trùng hạt tối ưu ở nồng độ javel 60 % là 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 (chồi mập, màu xanh bình thường, kích thước chồi là 1,58 cm).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của javel 60 % và $HgCl_2$ 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>				
Không xử lý	6,02 ^a	94,04 ^c	1,62 ^b	Mập, xanh bình thường
5	66,66 ^b	92,21 ^c	1,59 ^b	Mập, xanh bình thường
10	92,23 ^c	91,55 ^c	1,58 ^b	Mập, xanh bình thường
15	92,46 ^c	76,24 ^b	1,25 ^a	Gầy, ngắn, vàng
20	94,52 ^c	30,33 ^a	1,17 ^a	Gầy, ngắn, vàng
<i>Ảnh hưởng của $HgCl_2$ 0,1 % đến tỷ lệ nảy mầm của hạt</i>				
3	68,32 ^a	83,15 ^c	1,40 ^c	Mập, xanh bình thường
5	91,25 ^b	82,26 ^c	1,39 ^c	Mập, xanh bình thường
7	94,22 ^c	40,51 ^b	0,78 ^b	Gầy, ngắn, vàng
9	95,32 ^c	34,14 ^a	0,52 ^a	Gầy, ngắn, vàng

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 hình 3.2 (B) và bảng 3.1 cho thấy, thời gian khử trùng trong HgCl_2 0,1 % tăng lên đã làm giảm khả năng nhiễm của hạt, cao nhất ở thời gian xử lý hạt 9 phút cho tỷ lệ bình không bị nhiễm là 95,32 %. Tuy nhiên, tỷ lệ nảy mầm của hạt lại tỷ lệ nghịch với thời gian khử trùng. Khi thời gian khử trùng càng cao thì tỷ lệ hạt không nảy mầm càng lớn. Ở thí nghiệm không xử lý, tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất là 94,04 %; thấp nhất là 34,14 % ở thời gian khử trùng hạt 9 phút. Khi thời gian khử trùng từ 9 phút trở lên thì tỷ lệ hạt không nảy mầm càng cao. Thời gian xử lý mẫu ảnh hưởng đến hình thái chồi mầm. Chồi phát triển tốt ở thời gian xử lý dưới 5 phút (chồi mập, dài, có màu xanh bình thường). Thời gian xử lý mẫu càng cao thì chồi mầm có sức sống giảm, chồi gầy, màu vàng (trên 5 phút). Căn cứ vào bảng kết quả nghiên cứu trên thì thời gian xử lý mẫu 5 phút thu được kết quả cao nhất: tỷ lệ khử trùng hạt thành công là 91,25 %, tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 82,26 %, chồi mầm phát triển tốt (chồi mập, màu xanh bình thường, kích thước chồi là 1,39 cm).

Khi so sánh 2 khoảng thời gian khử trùng tối ưu là javel 60 % 10 phút và HgCl_2 0,1% 5 phút, kết quả cho thấy khử trùng bằng javel 60 % có hiệu quả cao hơn HgCl_2 0,1 %, trong khi hiệu quả làm giảm khả năng nhiễm của hạt là tương đương (Bảng 3.1). Tuy nhiên, thủy ngân là kim loại nặng rất độc, nên điều kiện khử trùng tối ưu được lựa chọn với hạt Thổ nhân sâm là dung dịch javel 60 %, thời gian khử trùng 10 phút.

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

Hiệu quả chuyển gen vào mô thực vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như loại mẫu nuôi cấy, hệ số tái sinh đa chồi của mẫu, chủng vi khuẩn, mật độ vi khuẩn và quy trình lây nhiễm..., trong đó hệ số tái sinh đa chồi của mẫu sau khi lây nhiễm vi khuẩn là một yếu tố quan trọng. Do đó, để làm tăng hiệu suất chuyển gen, việc đánh giá hiệu quả tái sinh đa chồi của mẫu nuôi cấy là rất cần thiết. Lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên của cây Thổ nhân sâm được khảo sát cùng với sự bổ sung các chất kích thích tăng trưởng như BAP, IBA ở thời điểm trước và sau khi lây nhiễm

khuẩn *A. tumefaciens*. Chỉ tiêu đánh giá bao gồm: số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi, chất lượng chồi.

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

Kết quả phân tích ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ nách lá mầm được trình bày ở bảng 3.2.

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						
0	14,12 ^a	1,23 ^a	100	0,72 ^a	3,01 ^a	Gầy, vàng
0,5	18,23 ^b	1,43 ^a	116,26	0,79 ^a	4,21 ^b	Gầy, vàng
1,0	20,45 ^c	1,52 ^a	123,57	0,81 ^a	4,57 ^b	Gầy, vàng
1,5	23,56 ^d	1,68 ^a	136,58	0,87 ^a	4,74 ^b	Mập, XBT
2,0	21,11 ^c	1,49 ^a	121,14	0,78 ^a	5,22 ^c	Mập, XBT
Sau 4 tuần						
0	14,45 ^a	1,34 ^a	100	1,92 ^a	5,68 ^a	Gầy, vàng
0,5	18,68 ^b	1,57 ^a	117,16	2,59 ^b	5,89 ^a	Gầy, vàng
1,0	21,01 ^c	1,60 ^a	119,40	2,61 ^b	5,96 ^a	Gầy, vàng
1,5	24,12 ^d	1,78 ^a	132,83	2,88 ^c	6,14 ^a	Mập, XBT
2,0	21,56 ^c	1,59 ^a	118,65	2,67 ^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 ở bảng 3.2 cho thấy môi trường MS cơ bản bổ sung 0,5-2,0 mg/l BAP có số chồi tăng so với đối chứng từ 16,26 % đến 36,58 % (ở giai đoạn 2 tuần) và 17,16 % đến 32,83 % (ở giai đoạn 4 tuần); chiều cao của chồi tăng từ 9,72 % đến 20,83 % (giai đoạn 2 tuần tuổi) và 34,89 % đến 50 % (giai đoạn 4 tuần tuổi). Trong đó, môi trường có bổ sung 1,5 mg/l BAP có khả năng tạo chồi và kích thích sinh trưởng chồi lớn nhất, số chồi/mẫu đạt 1,68 (giai đoạn 2 tuần) và 1,78 (giai đoạn 4 tuần); kích thước của chồi đạt

0,87 cm (giai đoạn 2 tuần) và 2,88 cm (giai đoạn 4 tuần). Khi nồng độ BAP cao hơn 1,5 mg/l thì hệ số nhân chồi và chiều cao chồi giảm dần.

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 và hình 3.3.

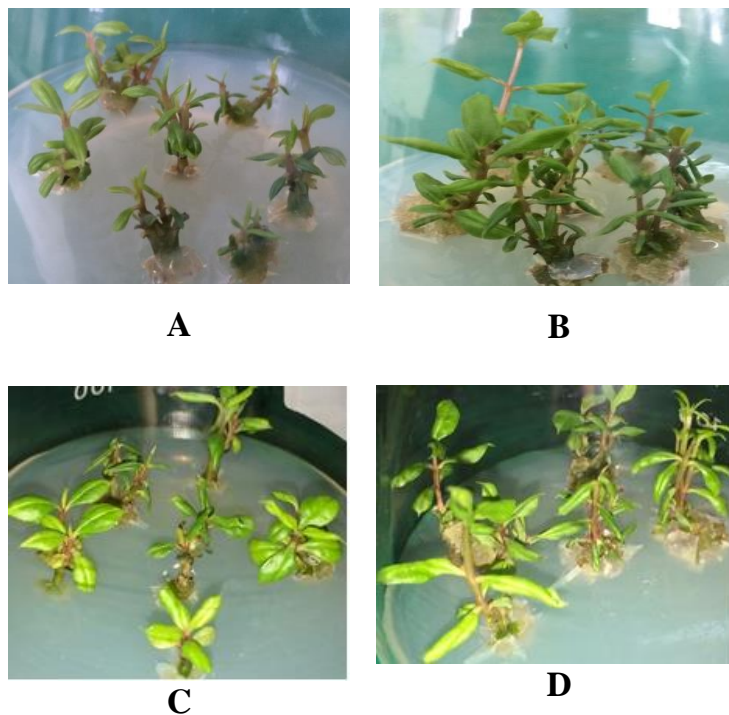
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên (n=30)

Nồng độ BAP (mg/l)	Số chồi/mẫu	% so với ĐC	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi
Sau 2 tuần					
0	1,39 ^a	100	0,72 ^a	3,01 ^a	Gầy, vàng
0,5	1,86 ^a	133,8	0,79 ^a	4,21 ^b	Gầy, vàng
1,0	2,29 ^b	164,7	0,82 ^a	4,57 ^b	Gầy, vàng
1,5	2,43 ^b	174,8	0,83 ^a	4,74 ^b	Mập, XBT
2,0	3,04 ^d	218,7	0,87 ^a	5,22 ^c	Mập, XBT
2,5	2,84 ^c	204,3	0,85 ^a	5,03 ^b	Mập, XBT
3,0	2,81 ^c	202,1	0,82 ^a	4,92 ^b	Gầy, vàng
Sau 4 tuần					
0	1,50 ^a	100	1,92 ^a	5,68 ^a	Gầy, vàng
0,5	2,15 ^b	143,33	2,59 ^b	5,89 ^a	Gầy, vàng
1,0	2,49 ^b	166,00	2,61 ^b	5,96 ^a	Gầy, vàng
1,5	2,86 ^b	190,60	2,79 ^b	6,14 ^a	Mập, XBT
2,0	3,24 ^c	216,00	2,88 ^b	6,52 ^a	Mập, XBT
2,5	2,91 ^b	194,00	2,64 ^b	6,22 ^a	Mập, XBT
3,0	2,86 ^b	190,60	2,44 ^b	5,91 ^a	Gầy, vàng

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 ở bảng 3.3 và hình 3.3 A, B cho thấy môi trường MS cơ bản bổ sung 0,5 - 3,0 mg/l BAP cho số chồi tăng so với đối chứng từ 33,8 % đến 118,7 % (ở giai

đoạn 2 tuần) và 43,33 % đến 116,0 % (ở giai đoạn 4 tuần); chiều cao của chồi tăng từ 9,7 % đến 20 % (giai đoạn 2 tuần) và 27 % đến 50 % (giai đoạn 4 tuần). Trong đó, môi trường có 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), hệ số nhân chồi tăng 118,7 % so với đối chứng; kích thước trung bình của chồi đạt 0,87 cm (giai đoạn 2 tuần) và 2,88 cm (giai đoạn 4 tuần) tăng 20 % đến 50 % so với đối chứng.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của BAP, sự kết hợp BAP và IBA đến sự phát sinh, sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

A, B: Ảnh hưởng của 2,0 mg/l BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên sau 2 tuần và 4 tuần. C, D: ảnh hưởng của 2,0 mg/l BAP kết hợp 0,8 mg/l IBA đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên sau 2 tuần và 4 tuần.

Khi nồng độ BAP cao hơn 2,0 mg/l thì hệ số nhân chồi và chiều cao chồi giảm dần. 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. Vậy đoạn thân mang mắt chồi bên là vật liệu thích hợp để tạo đa chồi ở cây Thổ nhân sâm.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của tổ hợp 2 mg/l BAP và IBA đến sự phát sinh, sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên (n=30)

Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ IBA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi
Sau 2 tuần					
2,0	0	3,04 ^b	0,87 ^a	5,22 ^a	Mập, xanh bình thường
	0,2	2,26 ^a	0,69 ^a	5,43 ^a	Mập, xanh bình thường
	0,4	2,45 ^a	0,91 ^a	5,65 ^a	Mập, xanh bình thường
	0,6	2,56 ^a	0,92 ^a	5,77 ^a	Mập, xanh bình thường
	0,8	2,78 ^a	0,95 ^a	5,97 ^a	Mập, xanh bình thường
	1,0	2,52 ^a	0,90 ^a	5,23 ^a	Gầy, vàng
	1,2	2,25 ^a	0,86 ^a	5,19 ^a	Gầy, vàng
Sau 4 tuần					
2,0	0	3,24 ^b	2,88 ^a	6,52 ^a	Mập, xanh bình thường
	0,2	2,32 ^a	2,87 ^a	6,19 ^a	Mập, xanh bình thường
	0,4	2,54 ^a	2,96 ^a	6,25 ^a	Mập, xanh bình thường
	0,6	2,65 ^a	2,99 ^a	6,29 ^a	Mập, xanh bình thường
	0,8	2,95 ^a	3,10 ^a	6,38 ^a	Mập, xanh bình thường
	1,0	2,84 ^a	3,01 ^a	6,33 ^a	Gầy, vàng
	1,2	2,35 ^a	2,97 ^a	6,27 ^a	Gầy, vàng

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 3.4 và hình 3.3 C, D cho thấy, môi trường bổ sung 2 mg/l BAP kết hợp với IBA ở các nồng độ từ 0,2 - 1,2 mg/l làm cho chiều cao của chồi có tăng hơn so với đối chứng (đối chứng là môi trường có bổ sung 2 mg/l BAP, không bổ sung IBA) nhưng không nhiều. Tuy nhiên, số lượng chồi/mẫu giảm so với đối chứng, đồng thời chồi gầy và có màu vàng. Như vậy, 2 mg/l BAP là chất kích thích

tăng trưởng thích hợp tạo đa chồi ở cây Thổ nhân sâm.

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	30,12 ^a	1,65 ^a	0,21 ^a
0,3	76,67 ^d	4,16 ^c	0,78 ^b
0,5	80,17 ^d	5,13 ^d	0,92 ^b
0,7	71,13 ^c	3,85 ^b	0,70 ^b
0,9	68,56 ^c	3,72 ^b	0,65 ^b
1,1	50,67 ^b	3,51 ^b	0,61 ^b
Sau 4 tuần			
0	89,91 ^a	9,12 ^a	2,01 ^a
0,3	95,45 ^c	10,31 ^b	2,89 ^b
0,5	98,12 ^d	13,23 ^d	3,79 ^c
0,7	94,43 ^c	11,97 ^c	3,33 ^b
0,9	93,45 ^b	11,01 ^c	3,12 ^b
1,1	92,34 ^b	10,45 ^b	2,98 ^b

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

Bảng 3.5 cho thấy, khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy 0,3 - 1,1 mg/l IAA thì khả năng tạo rễ của cây Thổ nhân sâm đều cao hơn đối chứng. Ở 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. Số rễ là 5,13 (giai đoạn 2 tuần) cao gấp 3,11 lần và 13,23 (giai đoạn 4 tuần) cao gấp 1,45 lần so với đối chứng. Nhưng tỷ lệ này giảm khi bổ sung nồng độ IAA cao

hơn 0,5 mg/l. 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 được trình bày ở bảng 3.6.

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	30,12 ^c	1,65 ^a	0,21 ^a
0,3	45,83 ^d	2,01 ^b	0,25 ^a
0,5	58,33 ^e	3,21 ^c	0,31 ^a
0,7	16,66 ^b	2,31 ^b	0,18 ^a
0,9	14,33 ^b	1,67 ^a	0,16 ^a
1,1	9,67 ^a	1,12 ^a	0,12 ^a
Sau 4 tuần			
0	89,91 ^b	9,12 ^a	2,01 ^a
0,3	90,12 ^b	9,56 ^b	2,21 ^b
0,5	94,36 ^c	10,43 ^c	2,79 ^c
0,7	89,68 ^b	9,97 ^b	2,32 ^b
0,9	88,23 ^b	9,01 ^a	1,98 ^a
1,1	85,45 ^a	8,89 ^a	1,77 ^a

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

Bảng 3.6 cho thấy, khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy NAA nồng độ từ 0,3 - 1,1 mg/l thì khả năng tạo rễ của cây Thổ nhân sâm chênh lệch không nhiều so với đối chứng. Ở 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; số rễ đạt 3,21 rễ (giai đoạn 2 tuần) cao gấp 1,94 lần và 10,43 rễ (giai đoạn 4 tuần) cao gấp 1,14 lần so với đối chứng. Nhưng tỷ lệ này giảm hơn so với đối chứng khi bổ sung nồng độ NAA cao hơn 0,5 mg/l. Vậy nồng độ tối ưu NAA kích thích ra rễ ở cây Thổ nhân sâm là 0,5 mg/l.

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. Ở nồng độ 0,5 mg/l IAA cho tỷ lệ cây ra rễ đạt 80,17 % (giai đoạn 2 tuần) cao hơn 1,37 lần và 98,12 % (ở giai đoạn 4 tuần) cao hơn 1,04 lần so với 0,5 mg/l NAA ở cùng thời điểm; số rễ/chồi là 5,13 (giai đoạn 2 tuần) cao hơn 1,60 lần so với NAA (3,21 rễ/chồi). Vật chất kích thích ra rễ tối ưu ở cây Thổ nhân sâm là 0,5 mg/l IAA.

Như vậy, vật liệu thích hợp để tạo đa chồi ở cây Thổ nhân sâm là đoạn thân mang mắt chồi bên. Môi trường MS cơ bản bổ sung 2,0 mg/l BAP thích hợp cho sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên. Chất kích thích ra rễ tối ưu ở cây Thổ nhân sâm là 0,5 mg/l IAA. Giá thể tốt nhất cho cây Thổ nhân sâm ra môi trường tự nhiên là đất thịt trung bình + trấu hun (2:1).

3.2. TẠO DÒNG RỄ TỪ CÂY THỔ NHÂN SÂM

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

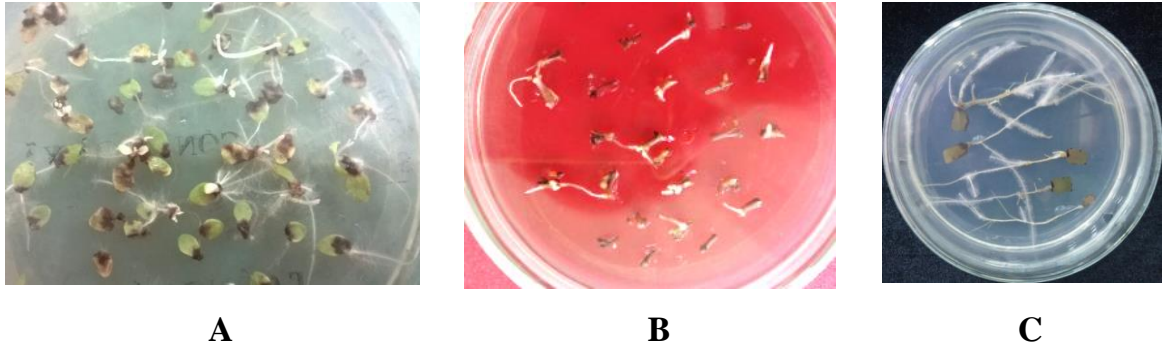
3.2.1.1. Khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ từ cây Thổ nhân sâm

Sau 4 tuần lây nhiễm với vi khuẩn *A. rhizogenes* tại mật độ khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 0,6$; nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$; thời gian lây nhiễm 10 phút, thời gian đồng nuôi cây 2 ngày, nồng độ cefotaxime diệt khuẩn 500 mg/l [60], kết quả khảo sát loại mô thích hợp cho cảm ứng tạo rễ từ được thể hiện qua bảng 3.7 và hình 3.4.

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

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

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



Hình 3.4. Khảo sát vật liệu thích hợp để tạo rễ tơ ở cây Thỏ 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.

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 chuyên 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 Thỏ nhân sâm.

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 Thỏ nhân sâm

Mật độ *A. rhizogenes* là một trong những thành tố có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ của thực vật. Để xác định được ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá Thỏ nhân sâm, tiến hành nhiễm khuẩn mô lá trong 10 phút, bổ sung AS 100 $\mu\text{mol/l}$, thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày ở các mật độ vi khuẩn khác nhau. Kết quả ở **bảng 3.8** cho thấy sự khác nhau về tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau khi mô lá Thỏ nhân sâm được nhiễm *A. rhizogenes* ở các mật độ vi khuẩn khác nhau tương ứng với các giá trị OD_{600} là 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0. Tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất khi mật độ vi khuẩn có giá trị $\text{OD}_{600} = 0,6$ (65,9 %). Ở mật độ vi khuẩn thấp hơn ($\text{OD}_{600} = 0,2; 0,4$) hay cao hơn ($\text{OD}_{600} = 0,8; 1,0$) cho tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tơ thấp hơn. Do vậy, mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $\text{OD}_{600} = 0,6$ là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá Thỏ nhân sâm.

AS là một loại phenol được tiết ra từ thực vật bị tổn thương, có tác dụng dẫn dụ vi khuẩn *A. rhizogenes* xâm nhập vào tế bào thực vật tại nơi tổn thương. Vì vậy, AS được bổ sung vào môi trường lây nhiễm để nâng cao hiệu quả xâm nhập của vi khuẩn vào mô lá Thổ nhân sâm. Để xác định được ảnh hưởng nồng độ AS đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá, tiến hành nhiễm khuẩn mô lá trong 10 phút, mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 0,6$; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày ở các nồng độ AS khác nhau. **Bảng 3.8** cho thấy, bổ sung AS với các nồng độ khác nhau thì ảnh hưởng khác nhau đến tỷ lệ tạo rễ tơ ở mô lá Thổ nhân sâm. Tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất là 65,9 % khi nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$. Ở nồng độ AS thấp hơn (50 $\mu\text{mol/l}$; 75 $\mu\text{mol/l}$) hay cao hơn (125 $\mu\text{mol/l}$; 150 $\mu\text{mol/l}$) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ thấp hơn. Do vậy, nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$ là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá Thổ nhân sâm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu Manuhara và cs (2015) [60].

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 ($\mu\text{mol/l}$)	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 ^e	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 $p < 0,05$.

Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm *A. rhizogenes* đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ ở mô lá Thổ nhân sâm đã được nghiên cứu. Tiến hành nhiễm khuẩn mô lá ở các khoảng thời gian khác nhau, mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 0,6$; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày, nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$. Kết quả **bảng 3.8** cho thấy, ở các khoảng thời gian nhiễm khuẩn khác nhau, tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là khác nhau. Thời gian nhiễm khuẩn 10 phút thu được tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ cao nhất (65,9 %). Ở thời gian ngâm thấp hơn (5 phút) hay cao hơn (15-20-25 phút) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ thấp hơn, thời gian ngâm càng cao thì tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ càng thấp, có thể do thời gian ngâm lâu làm cho mẫu lá bị nát và hỏng.

Đồng nuôi cấy là khoảng thời gian vi khuẩn đã bám vào mẫu mô có điều kiện tăng sinh số lượng trên môi trường rắn. Sự chuyển đoạn T-DNA vào hệ gen thực vật cũng xảy ra vào giai đoạn này. **Bảng 3.8** cho thấy, ở các khoảng thời gian đồng nuôi cấy khác nhau, tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là khác nhau. Thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày thu được tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ cao nhất (65,9 %). Ở thời gian đồng nuôi cấy thấp hơn (1 ngày) hay cao hơn (3, 4, 5 ngày) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ thấp hơn, có thể là do khi thời gian đồng nuôi cấy ngắn vi khuẩn xâm nhập vào ít nên quá trình biến nạp có thể không hoàn toàn, nhưng nếu thời gian đồng nuôi cấy dài hiệu quả chuyển gen lại giảm do lượng vi khuẩn phát sinh lớn sẽ gây hại trực tiếp đến mô lá Thổ nhân sâm.

3.2.1.3. Nghiên cứu xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime

Bổ sung kháng sinh vào môi trường nuôi cấy thường ít được sử dụng do kháng sinh có trong môi trường sẽ làm chậm sinh trưởng của mô và tế bào. Tuy nhiên, một số tế bào thực vật dễ bị nhiễm và để ngăn chặn sự phát triển của các vi sinh vật này, cần thiết phải bổ sung kháng sinh. Trong nghiên cứu này, kháng sinh được sử dụng để diệt khuẩn sau khi biến nạp là cefotaxime. Cefotaxime là kháng sinh được sử dụng phổ biến vì chi phí rẻ, có tác dụng loại trừ chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ra khỏi môi trường và mô nuôi cấy sau khi biến nạp. Kết quả xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime được thể hiện ở **bảng 3.9**.

Bảng 3.9 cho thấy, tăng nồng độ cefotaxime làm giảm khả năng nhiễm của quá trình biến nạp, cao nhất ở nồng độ 650 mg/l cho tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm là

100 % và khi không bổ sung cefotaxime trong quá trình chuyển gen thì tỷ lệ nhiễm của các mẫu cấy là 100 %. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ lại tỷ lệ nghịch với nồng độ cefotaxime. Khi nồng độ cefotaxime càng cao thì tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ càng thấp. Ở thí nghiệm không bổ sung cefotaxime thì tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cao nhất 70,1 %, nhưng 100 % mẫu bị nhiễm.

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 (%)
0	0	70,1 ^e
350	45,6 ^a	68,6 ^d
400	78,54 ^b	66,23 ^d
450	87,25 ^c	66,01 ^d
500	93,76 ^d	65,9 ^d
550	96,23 ^e	49,23 ^c
600	97,23 ^e	45,12 ^b
650	100	32,24 ^a

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

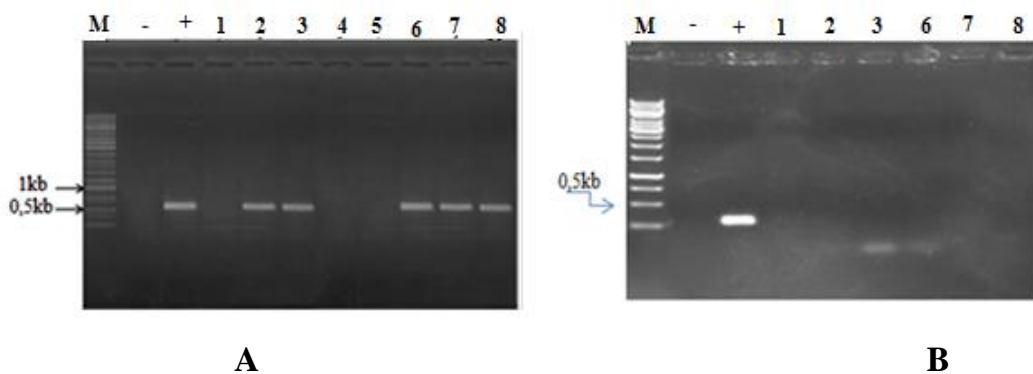
Như vậy, nồng độ cefotaxime tối ưu diệt khuẩn là 500 mg/l cho tỷ lệ đĩa cấy không bị nhiễm là 93,76 % và tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là 65,9 %. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Manuhara và cs (2015) [60].

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

Khi *A. rhizogenes* nhiễm vào mô lá Thổ nhân sâm, chỉ có vùng TL-DNA mang các gen *rol* (*A, B, C, D, E, G*) và vùng TR-DNA (mang các gen mã hóa tổng hợp auxin loại IAA) được chuyển vào mô lá tại vị trí lây nhiễm gây cảm ứng tạo rễ tơ, còn vùng mang các gen *vir* ở Ri-plasmid không được chuyển vào mô lá. Để kiểm tra sự chuyển gen của *A. rhizogenes* vào mô lá gây cảm ứng tạo rễ tơ Thổ nhân sâm, tiến hành tách chiết DNA của hệ gen rễ tơ ở 7 dòng rễ tơ Thổ nhân sâm, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi *rolCF/rolCR* để khuếch đại vùng đặc hiệu 520 bp của gen *rolC* và cặp mồi gen *virDF/virDR* để khuếch đại vùng đặc hiệu một trình tự 338 bp của gen *virD2*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của hai cặp mồi 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 (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.

Từ kết quả trên có thể kết luận gen *rolC* từ Ri-plasmid của *A. rhizogenes* 15834 đã được chuyển vào 5/7 dòng rễ tơ Thổ nhân sâm. Sự vắng mặt của gen *VirD2* trong những dòng rễ tơ đem phân tích cũng khẳng định vi khuẩn sau khi lây nhiễm với mô lá đã được khử sạch hoàn toàn và không còn sót lại trên bề mặt tế bào rễ tơ.



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 cấy cho tốc độ tăng trưởng cao nhất (4,11 g rễ tươi), tiếp

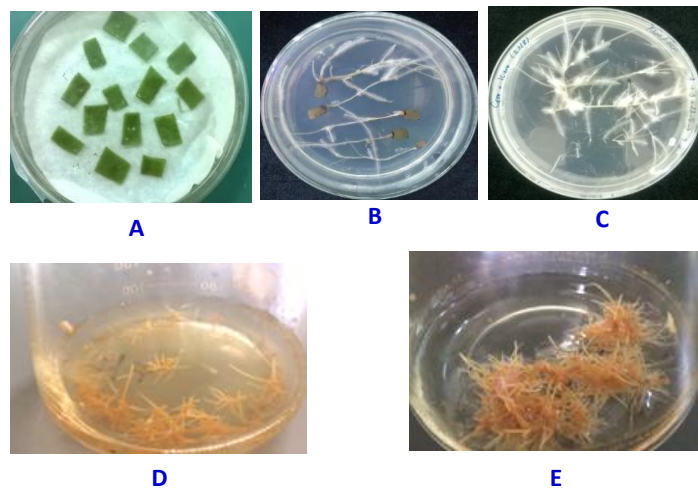
sau là môi trường bán lỏng (3,02 g rễ tươi) và cuối cùng là môi trường đặc (2,12 g rễ tươi) tăng lần lượt là 7,47; 5,49 và 3,85 lần so với khối lượng rễ ban đầu sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.10).

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 lắ	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 $p < 0,05$.

Như vậy, môi trường lỏng nuôi lắ giúp rễ tơ Thổ nhân sâm tăng trưởng tốt nhất. Hình ảnh kết quả nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm được thể hiện ở hình 3.6.



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 rễ tơ trong môi trường lỏng nuôi lắ 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 2	1,05 ^a	233
Dòng 3	1,11 ^a	246
Dòng 6	1,57 ^a	348
Dòng 7	0,93 ^a	206
Dòng 8	2,34 ^b	520

Bảng 3.11 cho thấy, 5 dòng rễ tơ chuyển gen có hàm lượng flavonoid dao động từ 0,93 mg/g đến 2,34 mg/g. 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. Dòng 7 có hàm lượng flavonoid thấp nhất (0,93 mg/g) tăng 206 % so với rễ bất định. Kết quả này đã chứng minh sự xâm nhập của vi khuẩn *A. rhizogenes* vào mô lá Thổ nhân sâm đã tạo rễ tơ ở 5 dòng 2, 3, 6, 7, 8 có hàm lượng flavonoid tăng đáng kể so với rễ bất định (rễ không chuyển gen).

Như vậy, trong 3 loại vật liệu được nhiễm với *A. rhizogenes* (lá mầm, đoạn thân mang mắt chồi bên, mô lá) thì 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. 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. Kết quả kiểm tra sự có mặt gen *rolC* bằng phương pháp PCR và sự vắng mặt của gen *virD2* đã khẳng định 5/7 dòng rễ tơ 2, 3, 6, 7, 8 được tạo ra từ 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.

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. Các sản phẩm nhân giống dễ nhiễm dịch bệnh, có tồn dư các thuốc bảo vệ thực vật, dễ nhiễm các kim loại nặng...; dòng tế bào thực vật nuôi cấy tạo sinh khối có thể tồn dư của các chất điều hòa sinh trưởng ảnh hưởng trực tiếp đến sản phẩm và sức khỏe người sử dụng. Trong khi đó các dòng rễ tơ có khả năng sinh trưởng nhanh, phát triển tốt trên môi trường không cần bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng và là cơ quan biệt hóa nên rễ tơ có sự di truyền ổn định hơn nuôi cấy tế bào huyền phù và mô sẹo [30], [35].

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu tạo rễ tơ và nhân nuôi sinh khối rễ tơ để tăng cường sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp tự nhiên có trong rễ. Đó là các nghiên cứu tăng hàm lượng camptothecin và 10-hydroxycamptothecin ở rễ tơ của cây Hạnh phúc [54], tăng hàm lượng alkaloid tổng số trong rễ tơ cây Thuộc phiện [48], hàm lượng verbascoside gia tăng trong rễ tơ ở cây Lõi thọ [16], hàm lượng gypenoside gia tăng trong rễ tơ ở cây Giáo cổ lam [11]... 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 [57]. 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, ba loại vật liệu (lá mầm, đoạn thân mang mắt chồi bên, mô lá) được sử dụng tạo rễ tơ thông qua lây nhiễm *A. rhizogenes* cho thấy, 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) [60]. 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. Kết quả kiểm tra sự có mặt gen *rolC* bằng phương pháp PCR và sự vắng mặt của gen *virD2* đã khẳng định 5/7 dòng rễ tơ được tạo ra từ cây Thổ nhân sâm. Như vậy, có thể kết luận rằng, *A. rhizogenes* đã được biến nạp thành công vào mẫu

Thỏ nhân sâm và thu được 5/7 dòng rễ tơ Thỏ nhân sâm đã có sự thay đổi thông tin di truyền so với rễ không chuyển gen bằng sự có mặt của gen *rolC*, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Thwe và cs (2016) [84]. Bước đầu nuôi cấy thành công rễ tơ Thỏ nhân sâm trong môi trường lỏng. Tuy nhiên, để sử dụng các dòng rễ tơ Thỏ 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 khả năng sinh trưởng, tăng sinh khối và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học giữa dòng rễ tơ với rễ của cây Thỏ nhân sâm tự nhiên làm cơ sở chọn được dòng rễ tơ theo đúng mục đích.

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

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

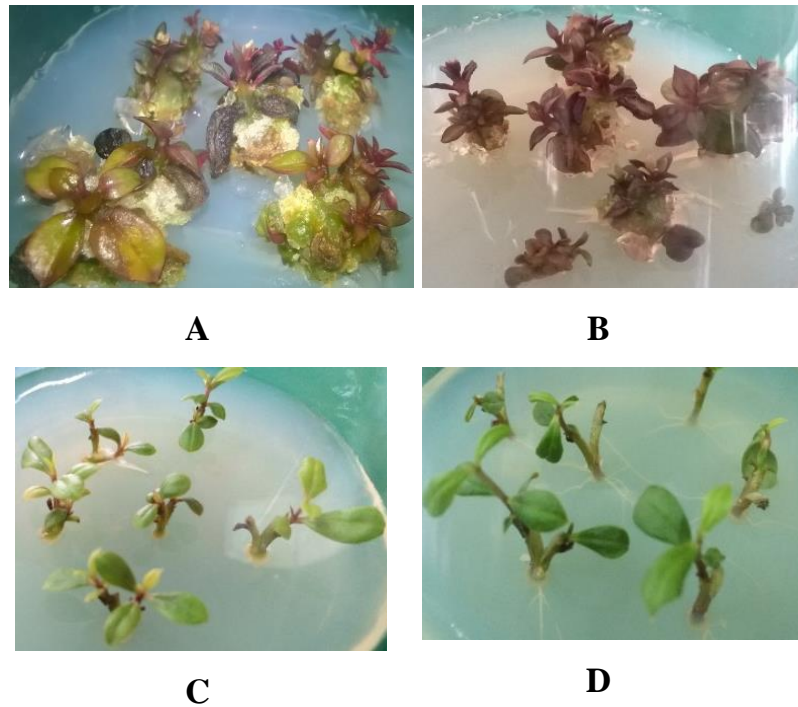
3.3.1.1. Kết quả khảo sát vật liệu chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

Lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi lây nhiễm *A. tumefaciens* được rửa bằng dung dịch ½ MS có bổ sung cefotaxim 500 mg/l. Sau đó các mẫu được cấy trên môi trường SIM đặc (Phụ lục 1). 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 4 tuần				
Đoạn thân	1,15 ^a	0,65 ^a	3,12 ^a	Gầy
Lá mầm	2,14 ^b	0,74 ^a	4,24 ^b	Mập
Sau 6 tuần				
Đoạn thân	1,40 ^a	1,13 ^a	3,43 ^a	Gầy
Lá mầm	3,02 ^b	1,34 ^a	5,21 ^b	Mập

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 3.7. Hiệu quả tạo đa chồi từ lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi lây nhiễm *A. tumefaciens*

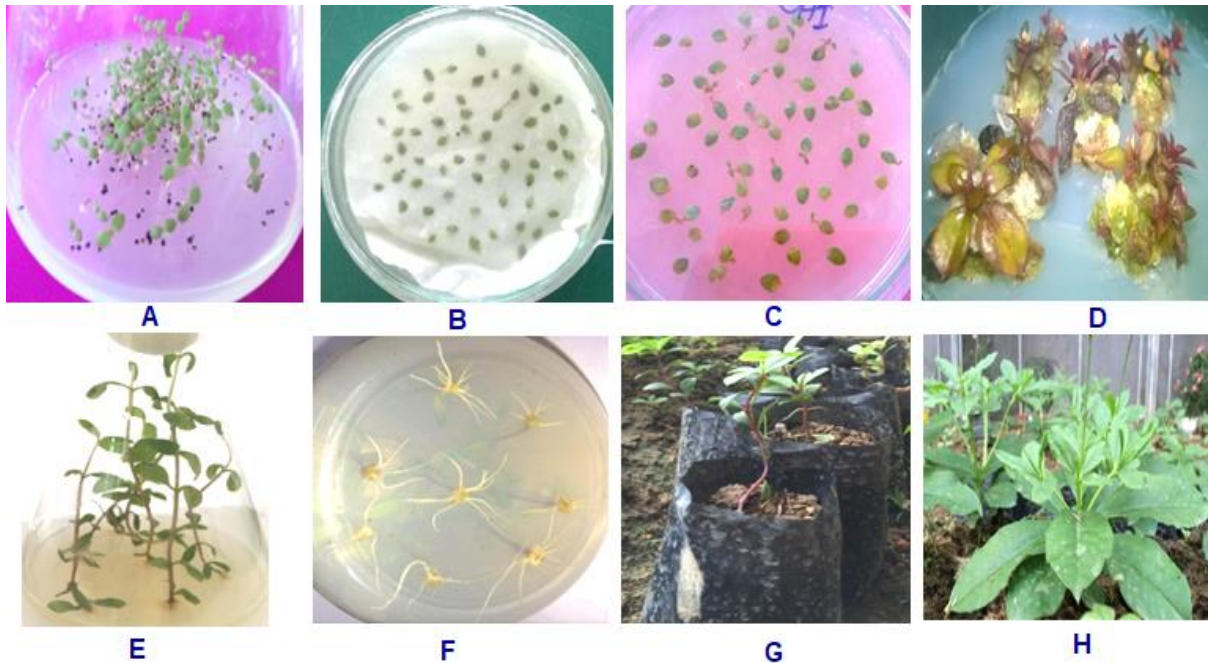
A, B: Sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ lá mầm được biến nạp *A. tumefaciens* sau 4 tuần và 6 tuần. *C, D:* Sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên được biến nạp *A. tumefaciens* sau 4 tuần và 6 tuần.

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 1,86 lần (ở giai đoạn 4 tuần) và 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 Thỏ nhân sâm.

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

Cấu trúc mang gen *GmCHI* được chuyển vào cây Thỏ nhân sâm thông qua *A. tumefaciens* lây nhiễm qua rách lá mầm. Hạt Thỏ nhân sâm được khử trùng bằng cồn 70 %, dung dịch javel 60 % và nảy mầm trên môi trường GM, thu lá mầm để làm vật liệu nhận gen. Các mảnh lá mầm được ngâm trong dịch huyền phù *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Tái sinh *in vitro* cây Thỏ nhân sâm trong môi trường

chọn lọc bằng kháng sinh và trồng cây chuyển gen trong nhà lưới được thể hiện ở **hình 3.8**.



Hình 3.8. Hình ảnh biểi nập 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 tói 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 được chuyển gen trồng trên giá thể; H: cây trồng trong vườn ươm ở điều kiện nhà lưới.

Kết quả biến nập cấu trúc mang gen *GmCHI* nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* qua nách lá mầm được trình bày ở **bảng 3.13**. Kết quả ở **bảng 3.13** cho thấy, trong tổng số 730 mẫu, có 200 mẫu tạo chồi trên môi trường chọn lọc SIM chứa kháng sinh kanamycin 50 mg/l và cefotaxim 500 mg/l và trong đó 63 chồi ra rễ và đem trồng trên giá thể có 43 cây Thổ nhân sâm được chuyển gen có bộ rễ phát triển, sau đó được trồng ra vườn ươm trong điều kiện nhà lưới. Kết quả theo dõi trong nhà lưới cho thấy có 28 cây Thổ nhân sâm được chuyển gen sống sót.

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	Lần 1	250	75	40	25	17	11
	Lần 2	300	80	42	27	20	13
	Lần 3	180	45	20	11	6	4
	Tổng	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.

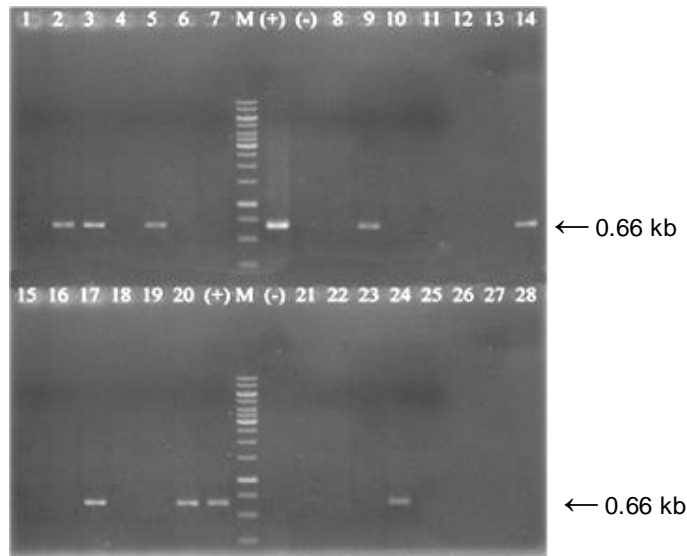
Như vậy, trong 730 mẫu biến nạp qua các giai đoạn tái sinh và sinh trưởng chồi, chọn lọc bằng kháng sinh tạo được 28 cây được chuyển gen *GmCHI* trong điều kiện nhà lưới, chiếm 2,46 %. Song song với thí nghiệm chuyển gen *GmCHI*, tiến hành hai lô đối chứng là ĐC0 và ĐC1. Kết quả ở lô ĐC0, lá mầm Thổ nhân sâm không được chuyển gen cấy trên môi trường tái sinh bổ sung kháng sinh chọn lọc, các lá mầm đều không phát sinh chồi và chết; ở lô ĐC1, lá mầm Thổ nhân sâm không chuyển gen cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh chọn lọc, kết quả thu được 30/40 mẫu tạo chồi, số chồi kéo dài là 70, số chồi ra rễ là 68, số cây sống sót trên giá thể 40 và số cây sống sót ở vườn ươm là 35 để sử dụng làm đối chứng.

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 thế hệ T0

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

Phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R* được sử dụng để khuếch đại đoạn gen chuyển *GmCHI* từ hệ gen của cây Thổ nhân sâm được chuyển gen. Kích thước gen chuyển *GmCHI* là 0,66 kb. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose cho thấy các làn chạy chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng 0,66 kb tương ứng với kích thước gen *GmCHI* được chuyển vào cây Thổ nhân sâm (**Hình 3.9**).



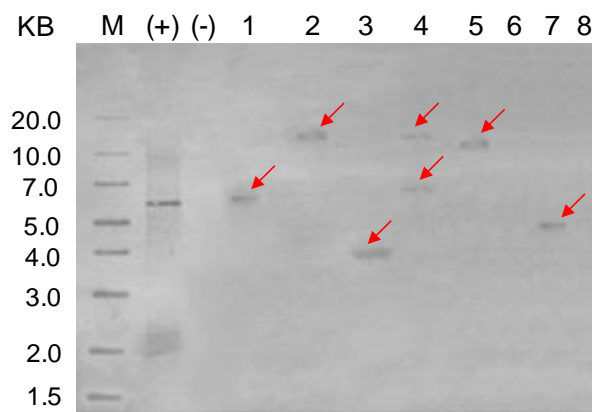
Hình 3.9. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *GmCHI* từ các cây Thổ nhân sâm được chuyển gen ở thế hệ T0 bằng cặp mồi *CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R*. *M*: thang DNA chuẩn 1 kb; (+): đối chứng dương là plasmid *pBT-CHI*; (-) sản phẩm PCR nhân gen *GmCHI* từ các dòng Thổ nhân sâm không chuyển gen; 1: T0-1; 2: T0-2.1; 3: T0-2.2; 4: T0-3; 5: T0-4; 6: T0-5.1; 7: T0-5.2; 8: T0-6; 9: T0-7; 10: T0-8.1; 11: T0-8.2; 12: T0-9.1; 13: T0-9.2; 14: T0-10; 15: T0-11.1; 16: T0-11.2; 17: T0-12; 18: T0-13.1; 19: T0-13.2; 20: T0-14; 21: T0-15.1; 22: T0-15.2; 23: T0-15.3; 24: T0-16; 25: T0-17.1; 26: T0-17.2; 27: T0-18.1; 28: T0-18.2.

Trong 28 cây Thổ nhân sâm ở thế hệ T0 chỉ có 8 cây gồm: T0-2.1; T0-2.2; T0-4; T0-7; T0-10; T0-12; T0-14; T0-16 có mặt của gen chuyển *GmCHI* và có thể nhận xét rằng, cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI* có khả năng đã xâm nhập vào hệ gen của cây Thổ nhân sâm được chuyển gen; còn 20 cây: T0-1; T0-3; T0-5.1; T0-5.2; T0-6; T0-8.1; T0-8.2; T0-9.1; T0-9.2; T0-11.1; T0-11.2; T0-13.1; T0-13.2; T0-15.1; T0-15.2; T0-15.3; T0-17.1; T0-17.2; T0-18.1; T0-18.2 không xuất hiện băng DNA. Như vậy, trong 730 mẫu biến nạp thu được 8 cây Thổ nhân

sâm ở thể hệ T0 dương tính với PCR. Hiệu suất chuyển gen *GmCHI* ở giai đoạn này được xác định đạt 1,09 % ($8/730 = 1,09\%$).

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. DNA tổng số của 8 cây chuyển gen và cây đối chứng không chuyển gen được cắt bởi enzyme *NotI* và phân tích Southern blot, kết quả thể hiện ở **hình 3.10**.



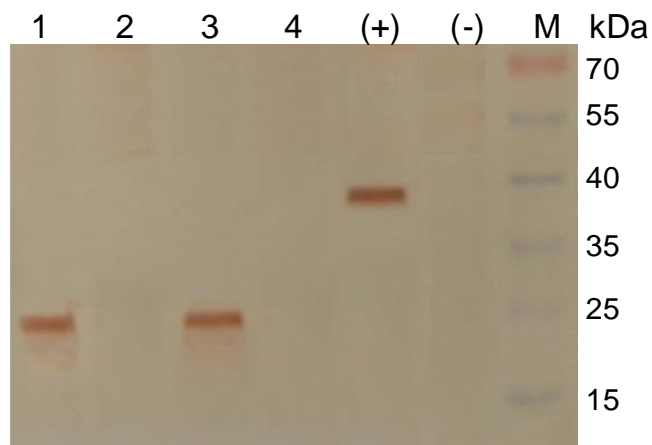
Hình 3.10. Kết quả phân tích cây Thổ nhân sâm chuyển gen bằng lai Southern ở các cây được chuyển gen dương tính với PCR với đoạn dò *GmCHI* được đánh dấu bằng biotin
M: thang DNA 1 kb; (+): vector *pCB301-GmCHI*; (-): cây Thổ nhân sâm không chuyển gen; 1: T0- 2.1; 2: T0- 2.2; 3: T0- 4; 4: T0- 7; 5: T0- 10; 6: T0- 12; 7: T0- 14; 8: T0- 16 là những cây Thổ nhân sâm được chuyển gen dương tính với PCR.

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; cây Thổ nhân sâm được chuyển gen T0-12, T0-16 và cây đối chứng không chuyển gen không xuất hiện băng DNA. Cây T0- 7 xuất hiện 2 băng DNA (2 bản copy), các cây còn lại T0- 2.1; T0- 2.2; T0- 4; T0- 10; T0- 14 có 1 bản copy. Hiệu suất chuyển gen tính đến thời điểm phân tích lai Southern là $6/730 = 0,82\%$. 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 T0- 2.1; T0- 2.2; T0- 4; T0- 7; T0- 10; T0- 14 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.

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

Theo dõi 6 cây Thổ nhân sâm có kết quả dương tính với Southern blot ở thế hệ T0 (T0- 2.1; T0- 2.2; T0- 4; T0- 7; T0- 10; T0- 14) cho thấy cả 6 cây đều sinh trưởng và phát triển bình thường, ra hoa và tạo quả, đồng thời không có sự khác biệt về hình thái giữa cây chuyển gen và cây không chuyển gen. Thu quả và hạt của 6 cây Thổ nhân sâm chuyển gen đem gieo trồng thì chỉ có hạt của 4 cây (T1- 2.2; T1- 4; T1- 10; T1- 14) nảy mầm và tạo các dòng cây chuyển gen T1, còn lại hạt của 2 cây không nảy mầm (T1- 2.1; T1- 7). Thu lá của các dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1 (T1- 2.2; T1- 4; T1- 10; T1- 14) để phân tích biểu hiện và đánh giá hoạt động của protein GmCHI tái tổ hợp ở thế hệ chuyển gen T1.

Chiết rút protein của 4 dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1 (T1- 2.2; T1- 4; T1- 10; T1- 14) và các cây đối chứng không chuyển gen tiến hành phân tích điện di protein SDS-PAGE trên gel polyacrylamid và phân tích Western blot. Kết quả lai Western phân tích biểu hiện protein tái tổ hợp từ lá của 4 dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen ở thế hệ T1 và cây đối chứng không chuyển gen được thể hiện **hình 3.11**.

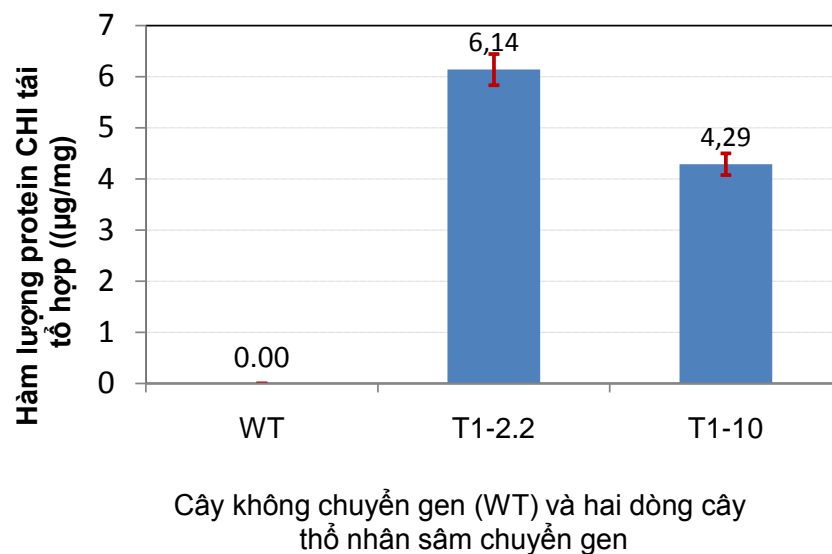


Hình 3.11. Kết quả phân tích Western blot từ 4 dòng Thổ nhân sâm chuyển gen thế hệ T1 và cây đối chứng không chuyển gen

M: thang protein chuẩn; (-): protein cây Thổ nhân sâm đối chứng không chuyển gen; (+): protein scFv (150 ng); 1: T1- 2.2; 2: T1- 4; 3: T1- 10; 4: T1- 14: protein của 4 dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen dương tính với Southern blot.

Kết quả phân tích Western blot ở **hình 3.11** cho thấy, trên màng lai xuất hiện băng màu ở vị trí kích thước khoảng 25 kDa ở 2 dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen T1- 2.2; T1- 10 ở thế 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 thế 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). Kết quả phân tích Western blot đã chứng minh protein tái tổ hợp GmCHI đã được biểu hiện thành công trên 2 dòng Thổ nhân sâm chuyển gen và chứng minh gen chuyển *GmCHI* được di truyền qua sinh sản hữu tính từ thế hệ T0 sang T1 và hoạt động ổn định ở hai thế hệ cây Thổ nhân sâm chuyển gen.

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**.



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

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 $\mu\text{g}/\text{mg}$. 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 tái tổ hợp 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 thế hệ T1

Mẫu cây Thổ nhân sâm của hai dòng T1- 2.2; T1- 10 và cây đối chứng không chuyển gen (Hình 3.13) gồm lá, thân, rễ được nghiền mịn, trộn đồng nhất. Cân một lượng khoảng 0,1 - 0,5 g mẫu bằng cân phân tích. Flavonoid trong mẫu được chiết bằng methanol, sau đó được cho phản ứng với AlCl_3 rồi đem đo quang phổ ở bước sóng 415 nm. Căn cứ vào độ hấp thụ và nồng độ của chất chuẩn, lập được đường chuẩn của quercetin, sau đó tính ra nồng độ của mẫu thử dựa vào độ hấp thụ của mẫu. Kết quả hàm lượng flavonoid trong hai dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen và cây đối chứng được thể hiện ở bảng 3.9.



WT



Dòng T1-2.2



Dòng T1-10

Hình 3.13. Hình ảnh các dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen ở thế hệ T1 và cây đối chứng không chuyển gen trồng trong vườn thực nghiệm

WT: cây Thổ nhân sâm đối chứng không chuyển gen; Dòng T1-2.2; Dòng T1-10: các dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1 dương tính với Western blot.

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 lần lượt là 4,24 mg/g và 2,74 mg/g. Dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1-2.2 có hàm lượng flavonoid cao nhất (4,24

mg/g) tăng 743,86 % so với cây đối chứng không chuyển gen. Dòng T1-10 có hàm lượng flavonoid thấp hơn (2,74 mg/g) tăng 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.

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 $p < 0,05$.

3.3.3. Thảo luận kết quả tạo dòng Thổ nhân sâm chuyển gen *GmCHI*

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. Zhang và cs (1995) đã nghiên cứu tái sinh cây từ tế bào trần của cây Thổ nhân sâm với sự điều chỉnh các chất kích thích tăng trưởng... với mục đích để thu sinh khối [95]. Nghiên cứu của Zhao và cs (2009) đề cập đến chọn 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 [96]; Muhallilin 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* [63]. 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 [57]. Như vậy, 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. Gen *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 [69]. Hạt Thổ nhân sâm và lá mầm có kích thước rất nhỏ, do vậy tạo vật liệu biến nạp ở Thổ nhân sâm khó hơn các loài thực vật có hạt kích thước lớn như đậu tương, đậu xanh. Chính vì vậy, kỹ thuật gây tổn thương nách lá mầm cần phải khéo léo hơn. Lá mầm đã tổn thương được ngâm trong dịch khuẩn *A.tumefaciens* và đồng nuôi cấy. Tái sinh đa chồi và tạo cây Thổ nhân sâm chuyển gen. Kết quả nghiên cứu cho thấy, lá mầm chính là vật liệu thích hợp tạo đa chồi phục vụ chuyển gen ở cây Thổ nhân sâm. Môi trường MS cơ bản bổ sung 2,0 mg/l BAP là môi trường thích hợp cho sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ lá mầm sau khi biến nạp *A.tumefaciens*. IAA 0,5 mg/l là môi trường thích hợp để tạo rễ của cây Thổ nhân sâm. Trong tổng số 730 mẫu biến nạp, có 200 mẫu tạo chồi trên môi trường chọn lọc SIM và trong đó 63 chồi ra rễ và đem trồng trên giá thể có 43 cây Thổ nhân sâm chuyển gen có bộ rễ phát triển, sau đó được trồng ra vườn ươm trong điều kiện nhà lưới. Kết quả theo dõi trong nhà lưới cho thấy có 28 cây Thổ nhân sâm được chuyển gen sống sót. Như vậy, trong 730 mẫu biến nạp qua các giai đoạn tái sinh và sinh trưởng chồi, chọn lọc bằng kháng sinh tạo được 28 cây được chuyển gen *GmCHI* trong điều kiện nhà lưới, chiếm 2,46 %.

Phân tích hiệu suất chuyển gen ở thế hệ T0 dựa trên kết quả phân tích Southern blot đạt 0,68 %. Ở thế hệ T1, dựa trên kết quả Western blot thì hiệu suất chuyển gen đạt 0,27 %. Xác định được protein tái tổ hợp GmCHI biểu hiện ở hai dòng cây Thổ nhân sâm chuyển gen thế hệ T1 (T1-2.2 và T1-10) có kích thước khoảng 25 kDa. Hàm lượng protein tái tổ hợp GmCHI của hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1- 2.2; T1- 10 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 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 cs (2006) đã nghiên cứu chuyển gen *SmCHI* của loài *S. medusa* vào cây Thuộc lá, kết quả làm tăng hàm lượng flavonoid tổng số gấp 5 lần so với các cây không chuyển gen [49]. Nghiên cứu của Kim và cs (2007) đã phân lập gen *CHI* từ nốt sần ở rễ của cây Nhót và chuyển vào thể đột biến TT5 ở cây *Arabidopsis*. Kết quả ở thể đột biến chuyển gen phục hồi màu vỏ hạt bình thường và naringenin được sản xuất như ở dạng hoang dại, trong khi nó không có ở các thể đột biến TT5 [39]. Gen *CHI* được phân lập từ cây hoa Mẫu đơn (*Ps-CHI1*) và được chuyển vào Thuộc lá thông qua *Agrobacterium* đã thu được cây chuyển gen ở thể hệ T1 có hàm lượng flavonol và flavone tăng gấp 3 lần so với cây không chuyển gen [52]. Nghiên cứu chuyển gen *CHI* phân lập từ cây Dạ yến 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 [64]... 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 thế 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 thế 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Phạm Hoàng Hộ (1999), “*Cây cỏ Việt Nam*”, Nhà xuất bản trẻ thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh, tr. 734 - 735.
2. Hà Thị Loan, Dương Hoa Xô, Nguyễn Quốc Bình, Nguyễn Hoàng Quân, Vũ Thị Đào, Nathalie Pawlicki-Jullian, Eric Gontier (2014), “Nghiên cứu tạo rễ tóc Sâm Ngọc Linh panax vietnamensis bằng phương pháp chuyển gen rol nhờ vi khuẩn *agrobacterium rhizogenes*”, *Tạp chí Sinh học*, 36(1), tr. 293 - 300.
3. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, Hà Nội.
4. Ninh Thị Thảo, Lê Tiến Vinh, Lã Hoàng Anh, Nguyễn Thị Thủy, Nguyễn Thị Phương Thảo (2015), “Nghiên cứu cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)” , *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(2), tr. 251-258.
5. Lê Thị Hồng Trang, Trần Thị Thanh Vân, Hồ Mạnh Tường, Phạm Thanh Tùng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Mậu (2016), Đặc điểm của gen *GmCHI* phân lập từ một số giống đậu tương khác nhau về hàm lượng isoflavone”, *Tạp chí Sinh học*, 38(2), tr. 236 - 242.
6. Lê Thị Hồng Trang, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Mậu (2018), “Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen *GmCHI* phân lập từ cây đậu tương”, *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Nxb Khoa học & Tự nhiên, tr. 83 - 87.

Tiếng Anh

7. Adriano R. L., Ana C. O., Silva-Pinhati; Basílio-Palmieri A. C., Irving J. B., Freitas-Astúa J., Mariângela C. (2007), “An *in silico* analysis of the key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Citrus sinensis*”, *Genet Mol Biol*, 30(3), pp. 819 - 831.
8. Afolabi O. B., Oloyede O. I. (2014), “Antioxidant properties of the extracts of *Talinum triangulare* and its effect on antioxidant enzymes in tissue homogenate of Swiss albino rat”, *Toxicol Int*, 21, pp. 307 - 313.
9. Amallesh S., Gouranga D., Sanjoy K. D. (2011), “Roles of flavonoids in plants”, *Int J Pharm Sci Tech*, 6(1), pp. 13 - 35.

10. Catthareeya T., Papirom P., Chanlun S., Kupittayanant S. (2013), “*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gertn: A medicinal plant with potential estrogenic activity in ovariectomized rats”, *Int J Pharm Pharm Sci*, 5, pp. 478 - 485.
11. Chang C. K., Chang K. S., Lin Y. C., Liu S. Y., Chen C. Y. (2005), “Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins”, *Biotechnol Lett*, 27, pp. 1165 - 1169.
12. Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., Leon C. (2010), “Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species”, *PLoS One*, 5(1), e8613.
13. Cushnie T. P. T., Lamb A. J. (2005), “Antimicrobial activity of flavonoid”, *Int J Antimicrob Ag*, 26(5), pp. 343 - 356.
14. Dalton T., Dieter M.Z., Yang Y. (2000), “Knockout of the mouse glutamate ysteine ligase catalytic subunit (*Gclc*) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous”, *Biochem Bioph Res Co*, 279(2), pp. 324 - 329.
15. Dastmalchi M., Dhaubhadel S. (2015), “Soybean chalcone isomerase: evolution of the fold, and the differential expression and localization of the gene family”, *Planta*, 241, pp. 507 - 523.
16. Dhakulkar S., Ganapathi T. R., Bhargava S., Bapat V. A. (2005), “Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots”, *Plant Sci*, 169, pp. 812 - 818.
17. 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, pp. 137 - 141.
18. Druka A., Kudrna D., Rostoks N., Brueggeman R., Von W. D., Kleinhofs A. (2003), “*Chalcone isomerase* gene from rice (*Oryza sativa*) and barley

- (*Hordeum vulgare*), physical, genetic and mutation mapping”, *Gene*, 302, pp. 171 - 178.
19. Edwards E. J., Nyffeler R., Donoghue M. J. (2005), “Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (*Cactaceae*) paraphyly for the transition to the cactus life form”, *Am J Bot*, 92(7), pp. 1177 - 1188.
 20. Ehrling J., Shin J. J. K., Douglas C. J. (2001), “Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains”, *Plant J*, 27, pp. 455 - 465.
 21. Enan M. R. , Palakkott A. R., Ksiksi T. S. (2017), “DNA barcoding of selected UAE medicinal plant species: a comparative assessment of herbarium and fresh samples”, *Physiol Mol Biol Plants*, 23(1), pp. 221 - 227.
 22. Fatemeh K. A., Abdolreza B., Nasrin M. (2016), “Analysis of *chalcone synthase* and *chalcone isomerase* gene expression in pigment production pathway at different flower colors of *Petunia Hybrida*”, *J Cell Mol Res*, 8(1), pp. 8-14.
 23. Ferguson D. J. (2001), “*Phemeranthus* and *Talinum* (*Portulacaceae*) in New Mexico”, *New Mexico Botanist*, 20, pp. 1 - 7.
 24. Filho S. A. V., Ramos M. P. O., Silva G. D. F., Duarte L. P., Peres V., Miranda R. R. S., de Souza G. H. B., Belinelo H. V. J. (2010), “Antinociceptive and edematogenic activity and chemical constituents of *Talinum paniculatum* Willd”, *J Chem Pharm Res*, 2, pp. 265 - 274.
 25. Filippou V., Emmanouil T., Carl D., Guenter V., Georg K., Nickolas P. (2007), “Biotechnology of flavonoid and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health”, *Biotechnol J*, 2, pp. 1214 - 1234.
 26. Forkmann G., Dangelmayr B. (1980), “Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus*”, *Biochem Genet*, 18, pp. 519 - 527.
 27. Ge X., Wu J. (2005), “Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor”, *Plant Science*, 168(2), pp. 487 - 491.

28. Geerlings A., Hallard D., Martinez C. A, Lopes C. I, Van D. H. R., Verpoorte R. (1999), "Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNA from *Catharanthus roseus*", *Plant Cell Rep*, 19, pp. 191 - 196.
29. Group C. P. W., Hollingsworth P. M., Forrest L. L., Spouge J. L., Hajibabaei M., Ratnasingham S., Bank V. D. M., Chase M. W., Cowan R. S., Erickson D. L. (2009), "A DNA barcode for land plants", *Proc Natl Acad Sci*, 106, pp. 12794 - 12797.
30. Gupta S. K., Liu R. B., Liaw S. Y., Chan H., Tsay H. S. (2011), "Enhanced tanshinone production in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge' under the influence of plant growth regulators in liquid culture", *Botanical Studies*, 52, pp. 435 - 443.
31. Hebert P. D. N., Alina C., Shelley L. B., Jeremy R. (2003), "Biological identifications through DNA barcodes", *Proc R Soc Lond B*, 270, pp. 313 - 321.
32. Hershkovitz M. A., Zimmer E. A. (2000), "Ribosomal DNA evidence and disjunctions of western American *Portulacaceae*", *Mol Phylogenet Evol*, 15, pp. 419 - 439.
33. Joseph M. J., Marianne E. B., Richard A. D., Joseph P. N. (2000), "Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase", *Nat Struct Biol*, 7, pp. 786 - 791.
34. Joseph M. J., Joseph P. N. (2001), "Reaction mechanism of chalcone isomerase: pH-dependence, diffusion control, and product binding differences", *J Biol Chem*, 277(2), pp. 1361 - 1369.
35. Kai G., Xu H., Zhou C., Liao P., Xiao J., Luo X., You L., Zhang L. (2011), "Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures", *Metab Eng*, 13(3), pp. 319 - 327.
36. Kalita P., Barman T. K., Pal T. K., Kalita R. (2013), "Estimation of total flavonoids content (tfc) and anti oxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* linn", *J Drug Delivery Ther*, 3, pp. 33 - 37.

37. Kiana P., Khosro P., Taiebeh G. (2012), "Hairy root induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production", *Int Res J Appl Basic Sci*, 3, pp. 642 - 649.
38. Kim S., Jones R., Yoo K. S., Pike L. M. (2004), "Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon", *Mol Genet Genom*, 272, pp. 411 - 419.
39. Kim H. B., Bae J. H., Lim J. D., Yu C. Y., An C. S. (2007), "Expression of a functional type-I chalcone isomerase gene is localized to the infected cells of root nodules of *Elaeagnus umbellata*", *Mol Cells*, 23, pp. 405 - 409.
40. Kress J. W., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Wei L. A., Janzen D. H. (2005), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, pp. 8369 - 8374.
41. Kress W. J., Erickson D. L. (2008), "DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics", *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(8), pp. 2761 - 2762.
42. Kumar V., Sharma A., Prasad B. C. N., Gururaj H. B., Ravishankar G. A. (2006), "A. *rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment", *Electron J Biotechn*, 9, pp. 349 - 357.
43. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol Biol Evol*, 33, pp.1870 - 1874.
44. Kuo P. C., Damu A. G. (2004), "Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*", *Bioorg Med Chem*, 12(3), pp. 537 - 544.
45. Laemmli U. K. (1970), "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of *bacteriophage T4*", *Nature*, 227, pp. 680 - 685.
46. Lamine B. , María L. V., Marc-André F. (2008), "Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds", *Electron J Integr Biosci*, 3(1), pp. 2 - 9.
47. Ledford H. (2008), "Botanical identities: DNA barcoding for plants comes a step closer", *Nature*, 451.

48. Le Flem - Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Fliniaux M. A. (2004), "Hairy root induction of *Papaver somniferum* Var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402", *Planta*, 218, pp. 890 - 893.
49. Li F., Jin Z., Qu W., Zhao D., Ma F. (2006), "Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco", *Plant Physiol Biochem*, 44, pp. 455 - 461.
50. Lièvre K., Hehn A., Tran T. L. M., Gravot A., Thomasset B., Bourgaud F., Gontier E. (2005), "Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta graveolens* L. by an *Agrobacterium tumefaciens* - mediated method", *Plant Sci*, 168, pp. 883 - 888.
51. Lim W., Li J. (2016), "Co-expression of onion chalcone isomerase in *Del/Ros1*-expressing tomato enhances anthocyanin and flavonol production", *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 128 (1), pp. 113 - 124.
52. Lin Z., Yan W., Lei R., Qianqian S., Baoqiang Z., Kun M., Xin G. (2014), "Overexpression of *Ps-CH11*, a homologue of the chalcone isomerase gene from tree peony (*Paeonia suffruticosa*), reduces the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco", *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 116, pp. 285 - 295.
53. Liu X., Li Y., Yang H., Zhou B. (2018), "Chloroplast genome of the folk medicine and vegetable plant *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.: gene organization, comparative and phylogenetic analysis", *Molecules*, 23 (4), pii: E857.
54. Lorence A., Medina-Bolivar F., Nessler C. L. (2004), "Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots", *Plant Cell Reports*, 22(6), pp. 437 - 444.
55. Madesis P., Ganopoulos I., Ralli P., Tsaftaris A. (2012), "Barcoding the major Mediterranean leguminous crops by combining universal chloroplast and nuclear DNA sequence targets", *Genet Mol Res*, 11, pp. 2548 - 2558.
56. Majumdar S., Garai S., Jha S. (2011), "Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *A. rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants", *Plant Cell Rep*, 30, pp. 941 - 954.

57. Manuhara Y. S. W., Yachya A., Kristanti A. N. (2012), "Effect of aeration and inoculum density on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy roots in balloon-type bubble bioreactor", *J Pharm Biomed Sci*, 2(4), pp. 47 - 52.
58. Manuhara Y. S. W., Nike O. S. S., Alfinda N. K. (2014), "Production of adventitious root and saponin of *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. in temporary immersion bioreactor", *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)*, 2(4), pp. 246 - 250.
59. Manuhara Y. S. W., Kristanti A. N., Utami E. S. W. (2015), "Optimization of culture conditions of *Talinum paniculatum* Gaertn. adventitious roots in balloon type bubble bioreactor using aeration rate and initial inoculum density", *Asian J Biol Sci*, 8, pp. 83 - 92.
60. Manuhara Y. S. W., Kristanti A. N., Utami E. S. W., Yachya A. (2015), "Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor", *Asian J Biol Sci*, 5, pp. 1027 - 1032.
61. Mehrotra S., Kukreja A. K., Khanuja S. P. S., Mishra B. N. (2008), "Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor", *Elec J Biotechnol*, 11(2), pp. 1 - 7.
62. Middleton E. J. (1998), "Effect of plant flavonoid on immune and inflammatory cell function", *Adv Exp Med Biol*, 439, pp. 175 - 182.
63. Muhallilin I., Hery P., Manuhara Y. S. W. (2013), "Induksi akar dari eksplan daun ginseng jawa (*T. paniculatum* Gaertn.) dengan zat pengatur tumbuh auksin secara *in vitro*", *Jurnal Ilmiah Biologi FST*, 1(1), ISSN 2303-3428.
64. Muir S. R., Collins G. J., Robinson S., Hughes S., Bovy A., Ric D. V. C. H., Tunen A. J., Verhoeyen M. E. (2001), "Overexpression of *petunia* chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols", *Nat Biotechnol*, 19, pp. 470 - 474.

65. Ngaki M. N., Louie G. V., Philippe R. N., Manning G. (2012), "Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis", *Nature*, 485, pp. 530 - 533.
66. Nyananyo B. L., Olowokudejo J. D. (1986), "Taxonomic studies in the genus *Talinum* (Portulacaceae) in Nigeria", *Willdenowia*, 15, pp. 455 - 463.
67. Nyananyo B. L. (1993), "Pollen morphology in the Portulacaceae (Centrospermae) - Folia Geobot", *Phytotax*, 27, pp. 387- 400.
68. Ocampo G., Columbus J. T. (2012), "Molecular phylogenetics, historical biogeography, and chromosome number evolution of *Portulaca* (Portulacaceae)", *Mol Phylogenet Evol*, 63, pp. 97 - 112.
69. Olhoft P. M., Christopher M. D., Somers D. A. (2006), "Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants", *Methods Mol Biol*, 96, pp. 343-385.
70. Oliver Y., Brian M. G. (2005), "Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis, *Adv Agron*, 86, pp. 147 - 190.
71. Ralston L., Subramanian S., Matsuno M., Yu O. (2005), "Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases", *Plant Physiol*, 137, pp. 1375 - 1388.
72. Rowena F. S. , Robert A. A., Ian J., Frithjof C. K., Mary-Alice C., Daniel V., Florence L. G., Benoît V., Jerry J. B, Hayley S., Fumai K., Emily L. L., Patrick J. K. (2012), "Evaluating the ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) as a candidate dinoflagellate barcode marker", *Plos one*, 7(8), e42780.
73. Sanchez I. J. F. (2008), "*Polyketide synthase in Cannabis sativa L.*", PhD thesis, Leiden University, Leiden, The Netherlands.
74. Sevon N., Oksman-Caldentey K. M. (2002), "*A. rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids", *Planta Med*, 68, pp. 859 - 868.
75. Shaghai-Marroof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. (1984), "Ribosomal DNasepacer-length polymorphism in barley: mendelian

- inheritance, chromosomal location, and population dynamics”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, pp. 8014 - 8019.
76. Sharma S., Rustgi S., Balyan H. S., Gupta P. K. (2002), “Internal transcribed spacer (*ITS*) sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with *ITS* sequences in common wheat”, *Barley Genet Newslett*, 32, pp. 38 - 45.
77. Shashank K., Abhay K. P. (2013), “Chemistry and biological activities of flavonoid: An overview”, *The Scientific World Journal*, Article ID 162750, 16 pages.
78. Shimada N., Aoki T., Sato S., Nakamura Y. (2003), “A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoid and legume-specific 5-deoxy(iso) flavonoid in *Lotus japonicas*”, *Plant physiol*, 3, pp. 941 - 951.
79. Smith S. A., Brown J. W., Yang Y., Bruenn R., Drummond C. P., Brockington S. F., Walker J. F., Last N., Douglas N. A., Moore M. J. (2018), “Disparity, diversity, and duplications in the Caryophyllales”, *New Phytol*, 217, pp. 836 - 854.
80. Southern E. M. (1975), “Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis”, *J Mol Biol*, 98, pp. 503 - 517.
81. Sun H. J., Cui M., Ma B., Ezura H. (2006), “Functional expression of the tastemodifying protein, miraculin, in transgenic lettuce”, *FEBS Lett*, 580, pp. 620 - 626.
82. Tatiana D. V., Khalima K. D., Margarita V. R., Alexander C. T. (2012), “Embryology of *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. and *T. triangulare* (Jacq.) Willd. (Portulacaceae s.l., Caryophyllales)”, *Wulfenia*, 19, pp.107 - 129.
83. Thiruvengadam M., Praveen N., Kim E. H., Kim S. H., Chung I. M. (2014), “Production of anthraquinones, phenolic compounds and biological activities from hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb”, *Protoplasma*, 251(3), pp. 555 - 566.
84. Thwe A., Arasu M. V., Li X., Park C. H., Kim S. J., Al-Dhabi N. A., Park S. U. (2016), “Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn)”, *Front Microbiol*, 7, e65349.

85. Timonin A. C. (2005), "Cymoid evolution resulting in (closed) thyrse: *Talinum Adans* (Portulacaceae) versus Wilhelm Troll", *Wulfenia*, 12, pp. 1-19.
86. Tomilov A., Tomilova N., Yoder J. I. (2007), "*Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* transformed roots of the parasitic plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence", *Planta*, 225, pp. 1059 - 1071.
87. Tsumura Y., Kawahara T., Wickneswari R., Yoshimura K. (1996), "Molecular phylogeny of *Dipterocarpaceae* in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes", *Theor Appl Genet*, 93, pp. 22 - 29.
88. 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, pp. 236 - 240.
89. Veena V., Taylor C. G. (2007), "*Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications", *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 43, pp. 383 - 403.
90. Vijayan K., Tsou C. H. (2010), "DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective", *Curr Sci*, 99, pp. 1530 - 1540.
91. Wang R. K., Zhan S. F., Zhao T. J., Zhou X. L., Wang C. E. (2015), "Positive selection sites in tertiary structure of *Leguminosae* Chalcone isomerase 1", *Genet Mol Res*, 14, pp. 1957 - 1967.
92. Yao L. H., Jiang Y. M., Shi J. (2004), "Flavonoid in food and their health benefits", *Plant Food Hum Nutr*, 59, pp. 113 - 122.
93. Yogananth N., Jothi Basu M. (2009), "TLC method for determination of *plumbagin* in hairy root culture of *Plumbago rosea* L.", *Glob J Biotechnol Biochem*, 4, pp. 66 - 69.
94. Yulia W. I., Razief N. (2005), "Study of phytochemistry of Java ginseng compare to Korean ginseng in: Development of animal health and production for improving the sustainability of livestock farming in the integrated agriculture system", *German institute for tropical and subtropical agriculture*, pp. 45 - 49, Indonesia.

95. Zhang X., Wang X., An L., Fan S., Xiang W. (1995), "Plant regeneration from protoplasts of *Talinum paniculatum*", *Acta Botanica Sinica*, 37(10), pp. 754-760.
96. Zhao J., Ma L., Liu X., Wu H. (2009), "Induction of calluses and establishment of plantlet rapid propagation in *Talinum paniculatum*", *Journal of Southwest University of Science and Technology*, 1, pp. 103 - 107.
97. Zhu W., Jia Q., Wang Y., Zhang Y., Xia M. (2012), "The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway", *Free Radical Bio Med*, 52, pp. 314 - 327.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Thành phần môi trường tái sinh cây Thổ nhân sâm chuyển gen

Hỗn hợp	Thành phần cho 1 lít dung dịch
Stock I (N1)	16,6 g CaCl ₂ .2 H ₂ O
Stock II (N2)	95 g KNO ₃ + 8,5 g KH ₂ PO ₄ + 82,5 g (NH ₄)NO ₃ + 18,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O
Stock III (N3)	1,24 g H ₃ BO ₃ + 4,46g MnSO ₄ .4H ₂ O + 5 mg CuSO ₄ .7H ₂ O + 1,72g ZnSO ₄ .7H ₂ O + 50 mg Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O + 166 mg KI + 5 mg CoCl ₂ .6H ₂ O
Stock IV (N4)	5,56 g FeSO ₄ .7H ₂ O + 7,46 g Na ₂ EDTA
Stock V (N5)	20 mg Thiamine HCl + 100 mg pyridoxine HCl + 100 mg nicotic acid + 0,4 g glycine + 20 g Myoinositol
MS0	20 ml stock I/l + 20 ml stock II/l + 5ml stock (III, IV, V)/l + 8 g agarose
GM	MS0 + 30 g/l sucrose + 50 ml/l nước dừa
CCM	MS0 + 30 g/l sucrose + 100 µmol/l acetosyringon + 50 ml/l nước dừa
SIM	Môi trường SIM lần 1: MS0 + 30 g/l sucrose + 50 ml/l nước dừa + 1,5 mg/l BAP + 500 mg/l cefotaxim + 50 mg/l kanamycine
	Môi trường SIM lần 2: MS0 + 30 g/l sucrose + 50 ml/l nước dừa + 1,5 mg/l BAP + 500 mg/l cefotaxim + 50 mg/l kanamycine
SEM	MS0 + 30 g/l sucrose + 50 ml/l nước dừa + 500 mg/l cefotaxim + 50 mg/l kanamycine
RM	MS0 + 30 g/l sucrose + 0,5 mg/l IAA + 500 mg/l cefotaxim + 50 mg/l kanamycine

* Ghi chú: Các môi trường đều được chuẩn pH = 5,8 và khử trùng. Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25 ± 2°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/ngày.