

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

HOÀNG THỊ THU HOÀN

NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY *IN VITRO* VÀ BIỂU HIỆN
FLAVONOID 3'5' HYDROXYLASE NHẪM TĂNG
CƯỜNG TỔNG HỢP FLAVONOID Ở CÂY Ô ĐÀU
(*Aconitum carmichaelii* Debx.)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2022

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

HOÀNG THỊ THU HOÀN

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY *IN VITRO* VÀ BIỂU HIỆN
FLAVONOID 3'5' HYDROXYLASE NHẪM TĂNG CƯỜNG
TỔNG HỢP FLAVONOID Ở CÂY Ô ĐÀU
(*Aconitum carmichaelii* Debx.)

Ngành: Di truyền học

Mã số: 9420121

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS Chu Hoàng Mậu
TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan

THÁI NGUYÊN - 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu và TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan. Các kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trong các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả; phần còn lại chưa ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về nội dung và các số liệu đã trình bày trong luận án.

Thái Nguyên, tháng 02 năm 2022

TÁC GIẢ

Hoàng Thị Thu Hoàn

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu và TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan đã tận tình hướng dẫn, tạo điều kiện giúp đỡ, động viên khích lệ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành Luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Sơn và các cán bộ, nghiên cứu viên Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Công nghệ ADN ứng dụng, Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành một số thí nghiệm nghiên cứu thuộc đề tài luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của thầy cô và cán bộ Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học đã giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi thực hiện và hoàn thành luận án. Tôi xin cảm ơn các thầy cô Khoa Sinh học và Phòng Đào tạo, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành khoá học này.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến các đồng nghiệp, lãnh đạo Khoa Nông – Lâm – Ngư nghiệp và Lãnh đạo trường Đại học Tân Trào Tuyên Quang đã động viên, chia sẻ và tạo điều kiện giúp đỡ để tôi hoàn thành khóa học này.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng tri ân và biết ơn sâu sắc đối với thầy cô, gia đình và bạn bè là những điểm tựa tinh thần vững chắc, đã giúp đỡ, động viên, khích lệ, chia sẻ những khó khăn và luôn đồng hành cùng tôi trong quá trình học tập của mình.

Luận án tiến sĩ này được sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Giáo dục & Đào tạo trong khuôn khổ đề tài “*Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa flavonoid 3’5’-hydroxylase để tăng cường tích lũy flavonoid ở cây Ô đầu (Aconitum carmichaeli Debx.)*”, mã số: B2020-TNA-11 do TS Nguyễn Thị Ngọc Lan làm chủ nhiệm. Tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của nhóm nghiên cứu và Bộ Giáo dục & Đào tạo Việt Nam.

Thái Nguyên, tháng 02 năm 2022

TÁC GIẢ

Hoàng Thị Thu Hoàn

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC KÍ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	x
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	3
3. Nội dung nghiên cứu.....	3
4. Những đóng góp mới của luận án.....	4
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.....	5
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	6
1.1. CÂY Ô ĐÀU.....	6
1.1.1. Đặc điểm sinh học của cây Ô đầu.....	6
1.1.2. Thành phần dược chất và giá trị dược học ở cây Ô đầu.....	8
1.1.3. Nghiên cứu định danh cây Ô đầu.....	11
1.2. NUÔI CÂY <i>IN VITRO</i> VÀ CẢM ỨNG TẠO RỄ TƠ Ở CÂY DƯỢC LIỆU...14	
1.2.1. Hệ thống tái sinh đa chồi ở cây dược liệu.....	14
1.2.2. Nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ ở cây dược liệu.....	18
1.3. FLAVONOID VÀ NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN FLAVONOID 3'5' HYDROXYLASE.....26	
1.3.1. Đặc điểm về cấu trúc hóa học và vai trò của flavonoid.....	26
1.3.2. Con đường tổng hợp flavonoid ở thực vật.....	34
1.3.3. Enzyme flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H).....	37
1.3.4. Biểu hiện gen mã hóa flavonoid 3'5' hydroxylase.....	38
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....43	

2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU	43
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	43
2.1.2. Hóa chất	44
2.1.3. Thiết bị.....	45
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	45
2.2.1. Nhóm phương pháp định danh loài Ô đầu.....	45
2.2.2. Nhóm phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i> và cảm ứng tạo rễ tơ <i>in vitro</i>	46
2.2.3. Nhóm phương pháp tách dòng gen và thiết kế vector chuyển gen.....	51
2.2.4. Nhóm phương pháp chuyển gen và phân tích cây chuyển gen	54
2.2.5. Xử lý số liệu thống kê.....	59
2.3. ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU	60
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	61
3.1. KẾT QUẢ ĐỊNH DANH LOÀI Ô ĐẦU (<i>Aconitum carmichaelii</i>).....	61
3.1.1. Đặc điểm hình thái các mẫu Ô đầu thu ở Hà Giang	61
3.1.2. Đặc điểm trình tự nucleotide của vùng <i>ITS</i> và các đoạn gen <i>matK</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoB2</i>	63
3.1.3. Thảo luận kết quả định danh mẫu Ô đầu	67
3.2. KẾT QUẢ THIẾT LẬP HỆ THỐNG NUÔI CẤY <i>IN VITRO</i> VÀ TẠO RỄ TƠ Ở CÂY Ô ĐẦU.....	70
3.2.1. Thiết lập hệ thống nuôi cấy <i>in vitro</i> phục vụ chuyển gen ở cây Ô đầu	70
3.2.2. Nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây Ô đầu	78
3.2.3. Thảo luận kết quả thiết lập hệ thống nuôi cấy <i>in vitro</i> và tạo rễ tơ ở cây Ô đầu	81
3.3. KẾT QUẢ PHÂN LẬP GEN, THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA FLAVONOID 3'5' HYDROXYLASE VÀ TẠO CHỦNG <i>AGROBACTERIUM</i> <i>TUMEFACIENS</i> MANG VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT.....	83
3.3.1. Phân lập gen <i>AcF3'5'H</i> từ cây Ô đầu	83

3.3.2. Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen <i>AcF3'5'H</i>	88
3.3.3. Tạo <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CV58 chứa vector chuyển gen <i>pCB301_AcF3'5'H</i>	92
3.3.4. Thảo luận kết quả thiết kế vector biểu hiện gen <i>AcF3'5'H</i> và tạo chủng <i>A. tumefaciens</i> mang vector chuyển gen thực vật	93
3.4. PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN <i>AcF3'5'H</i> Ở CÂY THUỐC LÁ	95
3.4.1. Biến nạp di truyền và biểu hiện protein tái tổ hợp F3'5'H ở cây thuốc lá chuyển gen <i>AcF3'5'H</i>	95
3.4.2. Hàm lượng flavonoid tổng số trong lá của các dòng thuốc lá chuyển gen.....	98
3.4.3. Thảo luận kết quả biến nạp và biểu hiện gen <i>AcF3'5'H</i> trong cây thuốc lá	100
3.5. BIẾN NẠP DI TRUYỀN VÀ PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN <i>AcF3'5'H</i> Ở CÂY Ô ĐÀU.....	102
3.5.1. Biến nạp gen <i>uidA</i> vào cây Ô đầu.....	102
3.5.2. Biến nạp và biểu hiện gen <i>AcF3'5'H</i> ở cây Ô đầu	103
3.5.3. Thảo luận kết quả biến nạp và biểu hiện mạnh gen <i>AcF3'5'H</i> ở cây Ô đầu	109
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	111
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	113
TÀI LIỆU THAM KHẢO	115
PHỤ LỤC LUẬN ÁN.....	138

DANH MỤC KÍ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
<i>AcF3'5'H</i>	<i>Aconitum carmichaelii</i> falvonoid 3'5' hydroxylase	Gen <i>AcF3'5'H</i> phân lập từ Cây Ô đầu
AS	Acetosyringone	Chất kích hoạt gen <i>vir</i>
BAP	Benzylaminopurine	
bp	base pair	Cặp bazơ nitơ
CCM	Co-cultivation medium	Môi trường đồng nuôi cấy
cDNA	Complementary DNA	DNA bổ sung
CHI	Chalcone isomerase	Enzyme chuyển hóa chalcon
CHS	Chalcone synthase	Enzyme xúc tác tổng hợp chalcon
cs		Cộng sự
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide	Chất tẩy rửa có tính khử mạnh
2,4 D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	
DFR	Dihydroxyflavonol 4- reductase	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTPs	Deoxynucleoside triphosphate	
Da, KDa	Dalton, kilodalton	Đơn vị khối lượng phân tử
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
<i>GUS</i>	β -Glucuronidase	
F3H	Flavanone 3-hydroxylase	
F3'H	Flavonoid 3'-hydroxylase	
F3'5'H	Flavonoid 3'5'-hydroxylase	

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
FLS	Flavonol synthase	
FST	Flavonol 4-sulfo transferase	
GA ₃	Gibberellic acid	
GM	Germination medium	Môi trường nảy mầm
IAA	Idole acetic acid	
IBA	Idolbutylic acid	
Kin	Kinetin	Chất kích thích sinh trưởng tạo chồi
LB	Luria Bertani	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
LDOX	Leucoanthocyanidin oxygenase	
mRNA	Messenger ribonucleic acid	
MS	Murashige và Skoog, 1962	Môi trường nuôi cấy mô thực vật của Murashige và Skoog
NAA	Naphthalene acetic acid	
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase	
OD	Optical density	Mật độ quang
Ori	Origin	
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
Ri-plasmid	Root inducing- plasmid	Plasmid tạo rễ tơ
RM	Rooting medium	Môi trường tạo rễ
RNA	Ribonucleic acid	
<i>Rol</i>	Root locus	Gen <i>rol</i>
rpm	Revolutions per minute	Số vòng/ phút
RT-PCR	Reverse Transcription	Phản ứng khuếch đại

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
	Polymerase Chain Reaction	cDNA từ mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược
SEM	Shoot elongation medium	Môi trường kéo dài chồi
SIM	Shoot induction medium	Môi trường cảm ứng tạo chồi
<i>Taq</i> DNA polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase	DNA-polymerase chịu nhiệt
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào mô thực vật
Ti-plasmid	Tumor inducing - plasmid	Plasmid gây khối u
T ₀		Các thế hệ cây chuyển gen
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
UFGT	UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl tranferase	Enzyme xúc tác phản ứng O-glycosyl hóa
<i>Vir</i>	<i>Virus interferon resistance</i>	Gen <i>vir</i>
WT	Wild type	Cây không biến nạp gen

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu.....	44
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR	51
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng gắn gen <i>AcF3'5'H</i> vào vector tách dòng.....	52
Bảng 3.1. Kết quả tạo vật liệu khởi đầu cho nuôi cấy <i>in vitro</i> từ đoạn thân cây Ô đầu	71
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BAP và Kinetin đến cảm ứng tạo chồi từ đoạn thân cây Ô đầu.....	72
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của α -NAA và IBA đến sự tạo rễ của chồi Ô đầu trên môi trường MS cơ bản	75
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và chất lượng cây Ô đầu giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần.....	77
Bảng 3.5. Sự sinh trưởng của rễ tơ Ô đầu sau 6 tuần trên các loại môi trường khác nhau.....	80
Bảng 3.6. Những vị trí sai khác về trình tự amino acid suy diễn của gen <i>AcF3'5'H</i> và trình tự gen mang mã số <i>JN635708.1</i>	85
Bảng 3.7. Các đối tượng thực vật có trình tự gen <i>F3'5'H</i> trong 100 trình tự xuất hiện nhiều nhất trong GenBank	86
Bảng 3.8. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển <i>AcF3'5'H</i> vào thuốc lá.....	96
Bảng 3.9. Hàm lượng flavonoid tổng số của các dòng thuốc lá chuyển gen T ₀₁ , T ₀₃ , T ₀₅ , T ₀₁₄ và cây đối chứng.....	100
Bảng 3.10. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển <i>AcF3'5'H</i> vào Ô đầu.....	104
Bảng 3.11. Hàm lượng flavonoid tổng số của ba dòng Ô đầu chuyển gen và cây WT	108

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh cây Ô đầu.	7
Hình 1.2. Sơ đồ cấu trúc hóa học của flavonoid.....	27
Hình 1.3. Con đường sinh tổng hợp flavonoid ở thực vật	35
Hình 1.4. Cấu trúc không gian và vị trí hoạt động của F3'5'H	38
Hình 2.1. Ô đầu thu từ tỉnh Hà Giang, được trồng tại Vườn thực nghiệm.....	43
Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế vector chuyển gen <i>pCB301_AcF3'5'H</i>	53
Hình 2.3. Đồ thị đường chuẩn xác định flavonoid toàn phần theo quercetin.	59
Hình 3.1. Cây Ô đầu	61
Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân vùng <i>ITS</i>	64
Hình 3.3. Sơ đồ vùng <i>ITS</i> của mẫu Ô đầu	64
Hình 3.4. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân đoạn gen <i>matK</i>	65
Hình 3.5. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen <i>rpoC1</i> và đoạn gen <i>rpoB266</i>	
Hình 3.6. Cây phát sinh loài phân tử dựa trên trình tự nucleotide của gen <i>matK</i> được thiết lập theo phương pháp Maximum Likelihood bằng phần mềm MEGAX.....	69
Hình 3.7. Cây phát sinh loài phân tử dựa trên trình tự nucleotide của vùng <i>ITS</i> được thiết lập theo phương pháp Maximum Likelihood bằng phần mềm MEGAX	69
Hình 3.8. Ảnh hưởng của HgCl ₂ 0,1% sau thời gian khử trùng 9 phút đến sự phát sinh chồi từ đoạn thân ở cây Ô đầu sau 4 tuần	71
Hình 3.9. So sánh khả năng cảm ứng tạo chồi từ mô phân sinh của các mẫu cấy sau 8 tuần.....	73
Hình 3.10. Hình ảnh cảm ứng đa chồi từ các đoạn thân và tạo cây Ô đầu <i>in vitro</i> trên môi trường MS cơ bản bổ sung BAP 1,5 mg/l sau 8 tuần	76

Hình 3.11. Cây Ô đầu chuyển ra trồng trên giá thể trong nhà lưới sau 4 tuần	77
Hình 3.12. Hình ảnh kết quả khảo sát vật liệu cảm ứng tạo rễ tơ Ô đầu.	78
Hình 3.13. Cảm ứng tạo rễ tơ từ các đoạn rễ <i>in vitro</i> được lây nhiễm <i>R. rhizogenes</i> trong thời gian 6 tuần tại giá trị $OD_{600} = 0,6$ và AS 100 $\mu\text{mol/l}$ trong 15 phút, đồng nuôi cấy trong 3 ngày.....	79
Hình 3.14. Hình ảnh cảm ứng tạo rễ tơ từ đoạn rễ của cây Ô đầu <i>in vitro</i> trong môi trường MS.	80
Hình 3.15. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose	84
Hình 3.16. Kết quả phân tích BLAST gen <i>AcF3'5'H</i> phân lập từ cây Ô đầu	84
Hình 3.17. Phân tích tiến hóa phân tử của gen <i>F3'5'H</i> và protein F3'5'H theo phương pháp Maximum Likelihood Method.....	88
Hình 3.18. Điện di đồ sản phẩm cắt mở vòng <i>pBT_AcF3'5'H</i> và cắt <i>pRTRA7/3</i> bằng cặp enzyme giới hạn <i>NcoI/NotI</i>	89
Hình 3.19. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR nhân bản gen <i>AcF3'5'H</i> từ các dòng khuẩn lạc <i>E. coli</i> DH5 α	90
Hình 3.20. Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid bằng <i>HindIII</i>	91
Hình 3.21. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen <i>pCB301_AcF3'5'H</i>	91
Hình 3.22. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR nhân bản gen <i>AcF3'5'H</i> từ khuẩn lạc <i>E. coli</i> tái tổ hợp	92
Hình 3.23. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR với cặp mồi <i>F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R</i> từ các dòng khuẩn lạc <i>A. tumefaciens</i> CV58.	93
Hình 3.24. Hình ảnh biến nạp và tái sinh cây Thuốc lá chuyển gen <i>AcF3'5'H</i>	95
Hình 3.25. Điện di đồ kiểm tra sự có mặt và sự phiên mã của gen chuyển <i>AcF3'5'H</i> trong cây chuyển gen	97
Hình 3.26. Sự biểu hiện của protein rAcF3'5'H ở cây Thuốc lá chuyển gen thế hệ T ₀	98

Hình 3.27. Hình thái của cây Thuốc lá WT và các dòng chuyển gen	99
Hình 3.28. Hàm lượng favonoid tổng số của 4 dòng Thuốc lá chuyển gen T ₀ 1, T ₀ 3, T ₀ 5, T ₀ 14, và cây WT	101
Hình 3.29. Kết quả phân tích nhuộm mô hóa GUS <i>in vitro</i> ở Ô đầu với mật độ <i>A. tumefaciens</i> khác nhau	103
Hình 3.30. Hình ảnh biến nạp gen <i>AcF3'5'H</i> và tái sinh <i>in vitro</i> của cây Ô đầu ...	103
Hình 3.31. Cây Ô đầu biến nạp ở thế hệ T ₀ và cây WT sau 2 tuần kể từ khi chuyển từ bình nuôi cấy sang chậu trong điều kiện nhà lưới	105
Hình 3.32. Điện di đồ xác nhận sự hiện diện và sự phiên mã của gen chuyển <i>AcF3'5'H</i>	106
Hình 3.33. Biểu hiện quá mức của protein rAcF3'5'H trong cây Ô đầu chuyển gen ở thế hệ T ₀	107
Hình 3.34. Cây Ô đầu không chuyển gen và cây Ô đầu chuyển gen ở thế hệ T ₀ sau 8 tuần kể từ khi chuyển từ bình nuôi cấy sang chậu trong điều kiện nhà lưới	108

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Trong những năm qua, kinh nghiệm và tri thức sử dụng cây thuốc để chữa bệnh của người dân vùng núi cao đã đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Do áp lực khai thác không bền vững để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng cao về dược phẩm nguyên, nhiều cây thuốc quý bị đe dọa và đang có nguy cơ bị tuyệt chủng. Việc thực hiện chủ trương chuyển dịch cơ cấu kinh tế nông nghiệp theo hướng sản xuất hàng hoá đa canh và bền vững, nhiều loại giống cây trồng được đưa vào sản xuất nông nghiệp bằng những kỹ thuật mới đã và đang được người dân ủng hộ và đón nhận. Trong đó, nghiên cứu nhân giống và phát triển các loài cây dược liệu có giá trị kinh tế cao đang là hướng đi mới, không những góp phần tăng thêm thu nhập, mà còn đóng góp vào công tác phòng và bảo vệ sức khỏe cộng đồng, đồng thời bảo tồn, phát triển được tri thức bản địa quý giá của các dân tộc thiểu số về sử dụng các loài cây thuốc Nam, trong đó có cây Ô đầu.

Ô đầu, Phụ tử chứa những thành phần có độc tính cao nhưng vẫn được cho là những vị thuốc quý, được dùng phổ biến trong y dược học cổ truyền phương Đông. Vị thuốc Ô đầu là củ mẹ và Phụ tử là củ con của một số loài thuộc chi *Aconitum* [1], [3]. Hiện nay trên thế giới đang có nhiều nghiên cứu về chi *Aconitum* nhằm phát triển các sản phẩm theo hướng nâng cao hiệu quả sử dụng các loài thuộc chi này trong phòng và trị bệnh. Ở Việt Nam, cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) được tìm thấy mọc hoang ở vùng núi cao phía Bắc Việt Nam, như Yên Bái, Lào Cai, Lai Châu [3] và sau đó cây Ô đầu đã được đưa vào trồng ở Hà Giang, Lào Cai, Lai Châu từ những năm 70 thế kỷ XX. Hiện nay, cây Ô đầu được trồng nhiều ở huyện Quản Bạ, Đồng Văn, tỉnh Hà Giang và được người dân địa phương sử dụng theo kinh nghiệm làm thuốc chữa các loại bệnh về xương khớp hoặc nấu cháo ăn để tăng cường sức khỏe. Năm 2013, Thủ tướng Chính phủ đã phê duyệt quy hoạch tổng thể phát triển dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030, theo đó cây Ô đầu

được quy hoạch trồng tại tỉnh Hà Giang [19]. Để phát triển nguồn dược liệu Ô đầu, ngoài chiến lược mở rộng vùng trồng, tăng năng suất và sản lượng, việc ứng dụng công nghệ sinh học trong mục đích tăng sinh khối rễ và củ Ô đầu thông qua nuôi cấy rễ tơ phục vụ thu nhận các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học mang tính thời sự và đang được quan tâm nghiên cứu.

Flavonoid là các hợp chất thứ cấp chính đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì cân bằng oxy hóa khử trong tế bào thực vật. Nhiều loại flavonoid có đặc tính kháng khuẩn, chống oxy hóa và chống ung thư [12]. Flavonoid trong chi *Aconitum* được quan tâm trong nghiên cứu phát triển dược phẩm hiện đại, và flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H) là một enzyme chìa khóa xúc tác các phản ứng cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp các hợp chất flavonoid ở cây Ô đầu.

F3'5'H, một thành viên của họ Cytochrome P450, liên kết với phần màng microomal, phụ thuộc vào NADPH và O₂, và nhạy cảm với chất ức chế [139], [106]. F3'5'H tham gia phản ứng chuyển naringenin thành flavonoid [5], [106], [139], [178]. Sự hydro hóa vị trí 5' bởi F3'5'H là một phản ứng quan trọng vì nó quyết định sản phẩm cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp flavonoid của thực vật [97], [178], do đó, việc tăng cường biểu hiện gen *F3'5'H* sẽ làm tăng nồng độ và hoạt tính của enzyme F3'5'H và dẫn đến tăng tích lũy flavonoid trong thực vật. Cho đến nay, đã có một số báo cáo về phân tích biểu hiện của gen *F3'5'H* của một số loài thực vật khác nhau, như Dạ yến thảo [82], Bạch quả [170], Trà [95], [178]...tuy nhiên, chưa có báo cáo nào về kết quả phân tích biểu hiện gen *F3'5'H* của cây Ô đầu.

Như vậy, hai cách tiếp cận làm tăng hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học được lựa chọn là ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật làm tăng sinh khối và kỹ thuật biểu hiện gen chìa khóa làm tăng tích lũy hàm lượng hợp chất thứ cấp trong cây chuyển gen. Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi đã lựa chọn và tiến hành đề tài luận án: “**Nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* và biểu hiện *flavonoid 3'5'-hydroxylase* nhằm tăng cường tổng hợp flavonoid ở cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.)**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

2.1. Xác định được một số điều kiện thích hợp trong nuôi cấy *in vitro* và cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Ô đầu.

2.2. Chứng minh được sự biểu hiện của gen mã hóa Flavonoid 3'5' hydroxylase của cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) làm tăng sự tích lũy flavonoid trong cây chuyển gen.

3. Nội dung nghiên cứu

1) Nghiên cứu định danh loài từ các mẫu Ô đầu thu tại một số địa phương của tỉnh Hà Giang bằng phương pháp hình thái so sánh và mã vạch DNA.

Thu thập mẫu Ô đầu từ hai huyện Hoàng Su Phì và Quản Bạ (Hà Giang), trồng tại vườn thí nghiệm làm vật liệu nghiên cứu. Định danh loài Ô đầu (*A. carmichaelii* Debx.) bằng phương pháp hình thái so sánh và tra cứu trên cơ sở dữ liệu thực vật quốc tế, kết hợp với một số chỉ thị phân tử DNA như *ITS*, *matK*, *rpoC1*, *rpoB2*.

2) Nghiên cứu thiết lập hệ thống nuôi cấy *in vitro* và tạo rễ tơ ở cây Ô đầu.

Tạo nguyên liệu khởi đầu trong nuôi cấy *in vitro* từ đoạn thân cây Ô đầu. Cảm ứng tạo đa chồi và cây Ô đầu *in vitro* qua nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và kinetin, ảnh hưởng của α -NAA và IBA, ảnh hưởng của giá thể. Nghiên cứu lựa chọn vật liệu nuôi cấy tạo rễ tơ và điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ cây Ô đầu. Khảo sát môi trường nhân nuôi tăng sinh khối rễ tơ cây Ô đầu.

3) Thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa Flavonoid 3'5'hydroxylase và tạo chủng *Agrobacterium tumefaciens* mang vector chuyển gen thực vật.

Phân lập, tách dòng và xác định trình tự gen *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu (*A. carmichaelii*). Thiết kế vector biểu hiện gen thực vật mang gen *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu và tạo vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen *AcF3'5'H*.

4) Nghiên cứu biến nạp và biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở cây Thuốc lá.

Biến nạp di truyền gen *AcF3'5'H* vào mô lá Thuốc lá và tạo cây Thuốc lá chuyển gen. Phân tích biểu hiện gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu trên cây Thuốc lá chuyển gen, cụ thể là xác nhận sự có mặt và sự phiên mã, dịch mã của gen chuyển *AcF3'5'H* trong cây chuyển gen; so sánh hàm lượng flavonoid giữa cây chuyển gen và cây không chuyển gen.

5) Nghiên cứu biến nạp và biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu.

Nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu quả chuyển gen cây Ô đầu thông qua biến nạp gen chỉ thị *uidA* vào cây Ô đầu. Biến nạp di truyền gen *AcF3'5'H* vào chồi Ô đầu thông qua *A. tumefaciens* và tạo cây Ô đầu chuyển gen. Phân tích biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu chuyển gen thông qua phân tích PCR, RT-PCR, Western blot và ELISA. Đánh giá sự tích lũy hàm lượng flavonoid trong cây chuyển gen.

4. Những đóng góp mới của luận án

Luận án là công trình nghiên cứu có hệ thống, từ định danh các mẫu Ô đầu thu thập ở Hà Giang đến thiết lập hệ thống tái sinh *in vitro* phục vụ chuyển gen đến cảm ứng tạo rễ tơ và nhân nuôi tăng sinh khối rễ tơ ở loài Ô đầu. Từ tách dòng phân tử gen *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu và thiết kế vector biểu hiện gen ở thực vật đến nghiên cứu biến nạp di truyền và phân tích biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở cây chuyển gen. Những đóng góp mới cho khoa học của luận án thể hiện cụ thể là:

- 1) Các mẫu Ô đầu thu tại huyện Quản Bạ và Hoàng Su Phì, tỉnh Hà Giang, Việt Nam thuộc cùng loài *A. carmichaelii*, chi *Aconitum*, họ Hoàng Liên (Ranunculaceae) được định danh bằng sự kết hợp giữa phương pháp hình thái so sánh và mã vạch DNA.
- 2) Xác định được điều kiện thích hợp cho nuôi cấy *in vitro* và tạo được các dòng rễ tơ từ rễ cây Ô đầu *in vitro* làm vật liệu phục vụ chọn dòng rễ tơ chuyển gen.
- 3) Lần đầu tiên trên thế giới gen *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu được biến nạp và biểu hiện thành công trên cây thuốc lá và cây Ô đầu. Sự biểu hiện mạnh của gen *AcF3'5'H* đã làm tăng hàm lượng flavonoid trong cây chuyển gen.

Kết quả nghiên cứu của luận án là báo cáo đầu tiên trên thế giới và ở Việt Nam về phân tích biểu hiện gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Cách tiếp cận cải thiện hàm lượng flavonoid bằng kỹ thuật chuyển gen mã hóa enzyme chìa khóa *AcF3'5'H* trong quá trình tổng hợp flavonoid và tạo dòng rễ tơ *in vitro* ở cây Ô đầu có ý nghĩa về khoa học và thực tiễn.

Về mặt khoa học

Kết quả phân tích biểu hiện gen trên cây Thuốc lá và cây Ô đầu là cơ sở cho các nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở các loài dược liệu khác trong mục đích làm tăng sự tích lũy flavonoid trong các bộ phận của thực vật. Gen *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu được nghiên cứu trong công trình này có thể được coi là một ứng cử viên để tăng cường tích lũy flavonoid trong thực vật bằng công nghệ gen.

Kết quả nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* và cảm ứng tạo rễ tơ là cơ sở ứng dụng công nghệ này vào việc nâng cao hàm lượng và hiệu quả thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học ở cây Ô đầu và một số loại cây dược liệu khác.

Về mặt thực tiễn

Các dòng rễ tơ và dòng cây Ô đầu chuyển gen làm vật liệu cho chọn giống Ô đầu có hàm lượng flavonoid cao. Kết quả của nghiên cứu đã mở ra triển vọng ứng dụng kỹ thuật tạo dòng rễ tơ và kỹ thuật biểu hiện gen vào việc nâng cao hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây dược liệu.

Các bài báo đăng tải trên các tạp chí khoa học quốc tế và quốc gia cùng với các trình tự gen công bố trên Ngân hàng Gen là những tư liệu có giá trị tham khảo trong nghiên cứu và giảng dạy sinh học, công nghệ sinh học.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY Ô ĐẦU

1.1.1. Đặc điểm sinh học của cây Ô đầu

Ô đầu có tên khoa học là *Aconitum carmichaelii* Debx., thuộc chi *Aconitum* L., họ Hoàng liên (Ranunculaceae) được xếp vào danh sách thuốc độc bảng A, nhưng cũng là một vị thuốc quý đứng thứ 4 trong "tứ đại danh dược" (sâm, nhung, quế, phụ) sau khi được bào chế cẩn thận. Phần rễ củ của Ô đầu còn được gọi củ ấu tào hay ấu tào. Cây thường mọc hoang ở các vùng núi cao [3], [8], [12].

Chi *Aconitum* thuộc họ Ranunculaceae, bao gồm khoảng 400 loài phân bố ở các vùng ôn đới của bán cầu bắc, với một nửa trong số chúng phân bố ở Trung Quốc [123]. Các loài thuộc chi *Aconitum* có thân thảo, sống một năm hoặc nhiều năm. Lá của các loài thuộc chi *Aconitum* có màu xanh đậm và không có lá kèm, hình bàn tay chia thùy hoặc thùy sâu với 5-7 phần. Mỗi phần lại chia thành 3 thùy với hình răng cưa. Lá sắp xếp xoắn ốc, lá ở dưới có cuống dài. Hoa mọc thẳng đứng, có thể có các màu: xanh đậm, tím, trắng, vàng, hồng với nhiều nhị hoa. Hoa được phân biệt bởi có một trong năm đài hoa, hoa có hình mũ. Hoa có 2-10 cánh hoa. Hai cánh hoa trên to và đặt dưới các đài thân dài. Hoa có túi rồng ở đỉnh chứa mật hoa. Những cánh hoa khác nhỏ hoặc không hình thành, có 3-5 lá noãn được hợp nhất một phần. Quả là một tổ hợp các nang, mỗi nang chứa nhiều hạt. Số loài thuộc chi *Aconitum* đã được ghi nhận đến nay trên thế giới là 948 loài, tuy nhiên do có sự trùng lặp về cách đặt tên các loài tại các quốc gia, các vùng khác nhau nên thực chất chỉ có 331 loài được chấp nhận [72].

Cây Ô đầu ở Việt Nam có dạng thân thảo, sống nhiều năm, thân mọc thẳng, cao 0,6-1 m. Rễ củ hình nón, mọc thành chuỗi, có củ cái và các củ con. Dưới thân cây, rễ cái phình thành củ giống như củ đậu, gọi là củ mẹ. Cạnh cổ rễ cái, mọc ra những củ con. Trên đầu củ con có một búp mang lá ngầm. Sau khi cây nở hoa, củ mẹ sẽ héo và tiêu dần. Củ mẹ thường nhẹ, rỗng, ở giữa màu xám; củ con thì nặng, chắc

hơn và lõi màu vàng. Lá cây con hình tim, gần như tròn, tựa như lá ngải cứu, mép lá có răng cưa to, lá xẻ thành 3 thùy không đều, mép các thùy có răng cưa nhọn. Hoa không đều, lưỡng tính, màu xanh hoặc màu xanh lơ thẫm, mọc thành chùm ở ngọn thân, có 5 đài, trong có 1 khum hình mũ. Quả có 5 đại mỏng như giấy, hạt có vảy trên mặt [11] (Hình 1.1).



Hình 1.1. Hình ảnh cây Ô đầu (*A. carmichaelii* Debx.). A, B: Cây Ô đầu trồng tại vườn và trong chậu ở nhà lưới; C, E: Mặt dưới và mặt trên lá Ô đầu; G: Củ Ô đầu gồm củ mẹ và củ con; H: Hoa Ô đầu; K: Quả và hạt Ô đầu (Ảnh do tác giả chụp tại vườn thí nghiệm).

Theo nghiên cứu của Vũ Đức Lợi và cs (2014), cây Ô đầu trồng tại Quản Bạ, Hà Giang có đặc điểm thân thảo, sống nhiều năm, cao khoảng 0,6-1 m hoặc cao hơn, phần thân trên mặt đất, lụi hàng năm. Rễ củ gồm củ mẹ ở giữa và các củ con mọc xung quanh, có hình con quay, hình nón thuôn, đường kính 1-4 cm, dài 3-9 cm. Thân khí sinh mọc thẳng ít phân cành, phần thân non và ngọn có lông đơn bào cong. Lá đơn, mọc so le, phiến lá có dạng gần hình tim tròn hoặc xẻ 3 thùy sâu, hai thùy bên xẻ tiếp thành 5 thùy không đều nhau, mép khía răng cưa to, gân lá 5 hình chân vịt,

cuống lá, mặt trên có lông tơ. Cụm hoa dạng chùm đơn, mọc ở ngọn thân và kẽ lá, dài 10-30 cm gồm nhiều hoa màu xanh tím. Cuống hoa dài 2-6 cm, cuống hoa và cụm hoa có lông tơ dày cong, các lá bắc ở phần dưới cụm hoa chia 3 thùy hình mác, 2 lá bắc con nhỏ dài 4-8 mm, rộng 1-2,5 mm, 2 mặt có lông tơ. Hoa không đều lưỡng tính, 5 lá đài mặt ngoài có lông tơ ngắn, lá đài trên hình mũ cao, hơi dẹt trùm lên 2 lá đài bên và 2 cánh hoa dài 2-3cm, rộng 1,8-2,5 cm. Hai lá đài bên hình trứng dài 1,7-2,2 cm, rộng 1,8-2,6 cm. Hai lá đài dưới thuôn dài 1,3-2 cm, rộng không đều nhau. Tràng hoa gồm 2 cánh hoa tiêu giảm, nhẵn, dài 1,8-2,1 cm nằm trong lá đài trên, hai bên cuộn vào thành hình trụ. Nhị nhiều (40-46) không có lông, dài 9-12 mm, chỉ nhị rộng có cánh ở dưới, bao phấn 2 ô đỉnh góc hình cầu hoặc elip nút dọc. Bầu trên dài 5-12 mm, có lông nhỏ rải rác. Lá noãn 5, rời, mỗi lá noãn có nhiều noãn, đính bên. Vòi nhụy ngắn hơn bầu nhụy. Quả gồm 5 đại hình elip dài 1,5-2,5 cm, đường kính 0,5 cm, có mỏ ngắn, đài không tồn tại. Trong mỗi đại chứa 10-20 hạt dẹt, dài 4-5 mm, rộng 2-3 mm, có cánh mỏng [12].

Ô đầu là cây dược liệu có độc, tất cả các phần của cây đều chứa chất gây độc, nhiều nhất là ở củ. Củ Ô đầu rất độc, lượng độc trong củ có thể làm cho người tê cứng chân tay, tắc nghẽn mạch máu, đông máu và chết. Trong dược thư Việt Nam, củ nhỏ được gọi là Phụ tử, còn củ lớn được gọi là Ô đầu. Phụ tử có độc tính kém hơn Ô đầu [8].

Ô đầu là cây của vùng ôn đới ẩm, mọc trên cạn và chỉ có ở vùng núi cao. Cây trồng ở Việt Nam thích nghi cao với điều kiện khí hậu ẩm mát của vùng nhiệt đới núi cao, được quy hoạch trồng ở các vùng trồng dược liệu như Lào Cai (Sa Pa), Lai Châu (Sìn Hồ), Hà Giang (Đồng Văn, Quản Bạ) [19]. Diện tích trồng cây Ô đầu đang được phát triển góp phần đa dạng hóa loại cây dược liệu và cây đặc sản ở vùng núi phía Bắc, dẫn đến nhiều triển vọng lớn cho ngành y học nói riêng và nền kinh tế nói chung.

1.1.2. Thành phần dược chất và giá trị dược học ở cây Ô đầu

Về mặt hóa học, các loài thuộc chi *Aconitum* chứa các hợp chất thuộc nhóm alkaloid, flavonoid, steroid và glycoside, trong đó thành phần có hoạt tính sinh học

chính là các alkaloid diterpenoid và flavonoid [123]. Những năm gần đây các nhà khoa học trên thế giới còn quan tâm tới nhóm chất flavonoid trong chi *Aconitum*. Nhiều flavonoid đã được phân lập và thử nghiệm hoạt tính sinh học [46], [61]. Các flavonoid này được chia thành 2 nhóm chính là: dẫn chất quercetin và dẫn chất kaempferol. Các flavonoid đã phân lập được từ chi *Aconitum* có đặc điểm chung là phần nhóm thế, thường thế vào vị trí số 3 hoặc số 7, hoặc thế vào cả vị trí số 3 và số 7 trong nhân quercetin hoặc kaempferol. Trong các phân tử đường thế vào nhân quercetin hoặc kaempferol thường gặp đó là rhamnose, glucose, galactose [50]. Vai trò chủ yếu của các dẫn chất flavonoid trong chi *Aconitum* là chống oxy hóa và loại bỏ các gốc tự do [38]. Hoạt động chống oxy hóa được nghiên cứu và chứng minh ở loài *A. burnatii* Gayet, *A. variegatum* L. [160], *A. anthora* L. [103], và *A. napellus* sp. *Lusitanicum* [71] ...

Cây Ô đầu trồng ở Sa Pa, Lào Cai có hàm lượng alkaloid toàn phần ở củ mẹ 0,36-0,8%, củ con 0,78-1,17%. Trong thành phần alkaloid có aconitin và hypaconitin. Aconitin dễ bị thủy phân thành acetic acid và benzoyleaconin. Độ độc benzoyleaconin chỉ bằng 1/400-1/500 aconitin. Thủy phân tiếp benzoyleaconin cho một phân tử acetic acid và aconin, độ độc của aconin bằng 1/10 benzoyleaconin. Trong các bộ phận của cây như: Thân cây, củ, lá, hoa, quả và hạt đều có các hợp chất alkaloid, axit hữu cơ, đường tự do, amino acid. Các chất như karacolin, neolin, benzoylemesaconitin (nhóm alkaloid), benzoic acid, β -sitosterol được phân lập từ Phụ tử và hàm lượng alkaloid tổng số là 0,91-1,1 % [4].

Cây Ô đầu trồng ở Quản Bạ, Hà Giang có thành phần chính là alkaloid có trong củ, thân, hoa, lá, hạt; flavonoid có chủ yếu trong lá; polysaccharid có chủ yếu trong củ. Ngoài 3 thành phần hóa học chính này, cây Ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang còn có axit béo, amino acid, đường tự do, sterol, carotenoid. Hàm lượng alkaloid toàn phần trong Phụ tử là 0,93%, trong Ô đầu là 0,70%. Như vậy hàm lượng alkaloid toàn phần trong Ô đầu thấp hơn Phụ tử. Điều này có thể do alkaloid trong Ô đầu một phần chuyển sang Phụ tử, một phần bị chuyển hóa thành hợp chất khác hoặc một phần tự phân hủy [12]. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong lá tính theo quercetin

bằng phương pháp đo quang là 1,60% và 16 hợp chất có trong cây gồm: 5 alkaloid, 4 flavonoid, 2 sitosterol và 5 chất nhóm axit béo, este. Trong đó, từ Phụ tử và Ô đầu đều phân lập được 10 hợp chất, gồm 4 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ chi *Aconitum* là: axit 9-chlorooctadecanoic, axit 3-chloroicosanoic, axit 8-chlorohexadecanoic, 3-hydroxypropane-1,2-diyl dihenicosanoat; hợp chất lần đầu phân lập từ loài *A. carmichaelii* là: delcosin; 5 hợp chất khác là fuzilin, karacolin, benzoylmesaconitin, hokbusin A, daucosterol. Từ lá phân lập được 7 hợp chất, gồm 2 chất mới là: 5,7,3-trimethoxyquercetin 3-O- β -D-fructofuranosid và (Z)-3-hydroxypentan-2-yl-10-aminooctacos-9-enoat, 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ chi *Aconitum* là 7,4'-O-dimethyluteolin 5-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosid], quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranosid, quercetin 3-O- β -D-galactopyranosid và stigmast-4-ene-3,6-dion, daucosterol [11].

Về giá trị dược học, Ô đầu có tác dụng giảm đau [87], tăng cường miễn dịch, chống oxy hóa, chống tăng sinh tế bào, chống ung thư [54], [172], tác dụng trên tim mạch [87], [70], chống viêm [87], [122], [147] chống tiêu chảy [165]. Thành phần chính có hiệu quả của cây *Aconitum* là alkaloid diterpenoid. Được chia thành C₁₈ -, C₁₉ -, C₂₀- và bis-diterpenoid alkaloids. Đây là một trong những hợp chất tự nhiên, có triển vọng nhất trong điều trị ung thư. Các alkaloid diterpenoid được phân lập từ các loài thuộc chi *Aconitum* đã cho thấy tính chất chống ung thư hiệu quả trong các dòng tế bào ung thư khác nhau. Những đặc tính này bao gồm ức chế sự phát triển của tế bào, gây ra apoptosis, can thiệp vào chu kỳ tế bào và thay đổi tình trạng kháng đa kháng sinh [172]. Năm hợp chất bao gồm oxonitine, deoxyaconitine, hypaconitine, mesaconitine và crassicauline A được tìm thấy trong *A. carmichaelii* cho thấy các hoạt động gây độc tế bào rõ ràng chống lại các bệnh ung thư khác nhau như ung thư bạch cầu, ung thư vú và ung thư gan [54].

Tổng cộng, 76 loài *Aconitum* đã được sử dụng làm thuốc thảo dược ở các nước như Ấn Độ, Việt Nam, Hàn Quốc, Nhật Bản và Trung Quốc [174]. *A. carmichaelii* là một trong những dược liệu truyền thống được liệt kê chính thức trong Dược điển Trung Quốc và được sử dụng nhiều trong các vị thuốc chữa bệnh của

Trung Quốc như điều trị bệnh thấp khớp, đau thần kinh và các bệnh về tim trong hàng ngàn năm [70]. Trong y học cổ truyền Trung Quốc, rễ thứ cấp của *A. carmichaelii* là một loại thảo dược quan trọng được sử dụng để bào chế thuốc tim, thuốc giảm đau, chống viêm và thuốc lợi tiểu để điều trị cảm lạnh, tiêu chảy, suy tim và phù [165]. Trong điều trị viêm khớp, thuốc bào chế từ *A. carmichaelii* có tác dụng ngăn ngừa thoái hóa khớp, giảm mật độ xương và điểm Mankin, thúc đẩy sự tăng sinh tế bào sụn và ức chế mono-iodoacetate tổn thương tế bào sụn [147]. Dịch chiết từ rễ của *A. carmichaelii* được sử dụng để điều trị một số bệnh như sốt, thấp khớp, đau khớp, viêm dạ dày, viêm ruột, tiêu chảy, hen phế quản và phù [122]. Trong đông y, Ô đầu được dùng để chữa các chứng phong tê, chân tay nhức mỏi, tê bại... [8], [17].

1.1.3. Nghiên cứu định danh cây Ô đầu

Cây Ô đầu là loại cây thảo dược mọc tự nhiên phân bố rải rác khắp vùng ôn đới Bắc bán cầu, Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc... Ở Việt Nam, cây Ô đầu có nguồn gốc nhập từ nước ngoài từ 2 nguồn; thứ nhất, Ô đầu do ngành Y tế chính thức nhập giống từ Trung Quốc, được trồng đầu tiên ở Sa Pa, Lào Cai từ đầu những năm 70 của thế kỷ trước, sau đó được trồng ở Bắc Hà, Lào Cai và Sìn Hồ, Lai Châu; và nguồn thứ hai, Ô đầu do cộng đồng người Hoa ở huyện Quản Bạ và Đồng Văn, Hà Giang tự động nhập từ bên kia biên giới về trồng ở vườn nhà và nương rẫy. Có tài liệu cho rằng, cây Ô đầu Việt Nam mọc hoang ở Nghĩa Lộ (Yên Bái), Hà Giang, Lào Cai, Lai Châu, Cao Bằng [2], [3], [4]. Cây Ô đầu trồng ở Việt Nam, được ghi nhận bởi hai tên là: *A. fortunei* Hemsl và *A. carmichaelii* Debx.. Theo nghiên cứu của Bùi Hồng Cường thì tên khoa học cây Ô đầu trồng ở Sa Pa, Lào Cai là *A. carmichaelii* Debx. [4]. Trước đây, để nhận diện các loài trong chi *Aconitum* chủ yếu dựa vào phương pháp hình thái so sánh [90]. Phương pháp phân loại này dựa vào sự khác biệt về hình thái của các cơ quan trên cơ thể thực vật để nhận diện các loài trong cùng chi. 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 phân loại học phân tử sử dụng trong định danh loài dựa trên các dữ liệu thông tin về hệ gen nhân hoặc hệ gen lục

lạp, hay các sản phẩm của chúng, cho mức độ chính xác cao và đặc biệt hữu dụng với các loài có quan hệ gần gũi mà những quan sát hình thái, sinh trưởng và phát triển chưa đủ cơ sở để định danh hoặc phân biệt loài [57].

Một chỉ thị DNA lý tưởng để định danh loài cần thỏa mãn những yêu cầu sau: (1) Đoạn DNA chỉ thị phải đủ độ biến thiên để phân biệt giữa các loài nhưng cũng phải không khác nhau quá mức giữa cá thể cùng loài; (2) 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; (3) Đoạn DNA chỉ thị cần chứa đủ thông tin loài để có thể dễ dàng định danh loài vào các nhóm phân loại; (4) Có khả năng áp dụng với mẫu vật thô, với vị trí nhân gen có độ bảo thủ cao, dễ dàng thực hiện phản ứng khuếch đại và đọc trình tự DNA; (5) Đoạn DNA chỉ thị cần có chiều dài vừa phải (400-800 bp) có thể được khuếch đại từ DNA khuôn là các DNA bị đứt gãy [164]. Mã vạch DNA được đặc trưng bằng cách sử dụng một hoặc một vài đoạn DNA để phân biệt các loài khác nhau [12]. 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 5,8 S bao gồm có *ITS1*, *ITS2*. Để đánh giá phát sinh loài và phân loại lại chi *Aconitum Lycoctonum* (họ Ranunculaceae), Hong và cs (2017) đã sử dụng nhiều vùng gen trong hệ gen nhân (*ITS* và *ETS*) và hệ gen lục lạp (*ndh F-trn L*, *psb A-trn H*, *psb D-trn T*, và *trn T-trn L*) [65]. Sharma và cs (2002) đã sử dụng trình tự vùng *ITS* để đánh giá đa dạng di truyền trong các giống lúa mạch và giữa các giống lúa mạch với loài lúa mạch hoang dại [132]. 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* [131]. 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, kết quả cho thấy, vùng *ITS2* có thể sử dụng như một mã vạch DNA chuẩn với tỷ lệ thành công là 92,7% [127]. Trong số các gen lục lạp, *matK* là một trong những gen tiến hóa nhanh nhất, có mặt ở hầu hết các loài thực vật, có kích thước khoảng 1550 bp và mã hóa cho maturase liên quan đến quá trình loại bỏ các intron sau phiên mã, 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 [163], Bạch tật lê (*Tribulus terrestris*), *Aerva javanica*, *Haplophyllum robustum*, *Tribulus pentandrus*, *Tamarix aucherana*... [120]. Gen *rpoB*, *rpoC1* mã hóa hai trong 4 tiểu đơn vị của RNA polymerase lục lạp. 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. Khi nghiên cứu họ *Dipterocarpaceae*, Tsumura và cs (1996) đã nhận thấy gen *rpoB* thích hợp sử dụng trong nghiên cứu phát sinh loài. 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 DNA barcode độc lập hoặc kết hợp với một số gen khác [173]. 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 [113].

Cho đến nay, trên thế giới chưa có công trình nghiên cứu sử dụng mã vạch DNA để định danh mẫu Ô đầu. Theo báo cáo của Gao và cs (2016), hệ gen lục lạp hoàn chỉnh của cây Ô đầu (*A. carmichaelii*) có kích thước 154.776 bp, trong đó có gen *matK*, *rpoC1* và *rpoB2*. Phân tích phát sinh loài với toàn bộ trình tự nucleotide của bộ gen lục lạp *Aconitum* chỉ ra rằng *A. carmichaelii* có mối quan hệ di truyền gần gũi hơn với *A. kusnezoffii* [55]. Kết quả này làm cơ sở thiết lập mã vạch DNA để định danh mẫu Ô đầu. Ở Việt Nam, Vũ Đức Lợi và cs (2014) đã tiến hành phân lập đoạn *ITS1-5,8S-ITS2* của cây Ô đầu Hà Giang, sau khi giải trình tự thu được vùng gen *ITS* gồm *ITS1-5,8S-ITS2* gồm 640 bp được đưa vào để so sánh với trình tự công bố, kết quả cho thấy trình tự gen thu được tương đồng với trình tự loài *A. carmichaelii* Debx. đã công bố với số nucleotide tương đồng là 606/609 (tương ứng tỷ lệ tương đồng 99%) [12]. Tuy nhiên, hiện chưa có công trình nghiên cứu về ứng dụng mã vạch DNA (*matK*, *rpoC1*, *rpoB2*) để định danh các mẫu Ô đầu. 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 Ô đầu thu thập tại một số huyện của Hà Giang.

1.2. NUÔI CÂY *IN VITRO* VÀ CẢM ỨNG TẠO RỄ TƠ Ở CÂY DƯỢC LIỆU

1.2.1. Hệ thống tái sinh đa chồi ở cây dược liệu

Nhân giống *in vitro* là kỹ thuật tạo ra các cây hoàn chỉnh thông qua nuôi cấy tế bào và mô thực vật sử dụng môi trường nuôi cấy dinh dưỡng và kiểm soát các điều kiện vô trùng đối với sự phát triển của tế bào thực vật, mô và cơ quan [47]. Việc bắt đầu các nghiên cứu *in vitro* về tế bào thực vật và nuôi cấy mô bắt nguồn từ năm 1902, khi Gottlieb Haberlandt đưa ra giả thuyết “tính toàn năng của tế bào” rằng mỗi tế bào chứa một hệ gen bao gồm toàn bộ thông tin di truyền cần thiết để tạo ra một cây hoàn chỉnh. Các tế bào đã biệt hóa ở thực vật có thể quay trở lại chu kỳ tế bào, tăng sinh và tái tạo các mô và cơ quan, thậm chí trở thành một cây hoàn chỉnh. Một số báo cáo đã chứng minh tính toàn năng của tế bào thực vật mà qua đó cây có thể được tái sinh, do đó nó được sử dụng rộng rãi trong một số nghiên cứu cơ bản như trong vi nhân giống, bảo tồn nguồn gen và hình thành cây biến đổi gen [36]. Các mẫu cây được nuôi trên môi trường dinh dưỡng tối ưu, trong điều kiện vô trùng bao gồm nước, chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng, một số nguồn carbon (thường là carbohydrate ở dạng sucrose hoặc glucose), vitamin, chất điều hòa sinh trưởng (auxin, cytokinin và gibberellin) và chất làm thay đổi trạng thái môi trường (trong trường hợp của môi trường rắn) [44]. Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* hiện nay không thể thiếu để sản xuất cây không bệnh, nhân lên nhanh chóng các kiểu gen thực vật quý hiếm, biến đổi bộ gen thực vật và sản xuất các chất chuyển hóa có nguồn gốc thực vật có giá trị thương mại quan trọng [47]. Ưu điểm chính của vi nhân giống là nó đảm bảo cung cấp nhanh chóng và liên tục để sản xuất hàng loạt các cây khỏe mạnh, giống hệt nhau về mặt di truyền và sạch bệnh quanh năm; có thể kiểm soát hoặc thay đổi điều kiện môi trường nuôi cấy cho phù hợp từng loại thực vật; nguồn mẫu vật nuôi cấy có quanh năm; có thể thu nhận được các chất chuyển hóa thứ cấp... [44].

Một số yếu tố có thể ảnh hưởng đến sự nhân chồi như lựa chọn mẫu cây, loại môi trường, nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật và nguồn năng lượng

carbon duy trì khả năng thẩm thấu. Kiểu mẫu và tuổi của mẫu cấy, các thành phần và loại môi trường ảnh hưởng đến hiệu quả tái sinh chồi của thực vật, và điều quan trọng là phải tối ưu hóa loại môi trường và nồng độ thích hợp để thiết lập quy trình tái sinh thành công. Một số nghiên cứu cho thấy rằng, môi trường MS (Murashige và Skoog) được sử dụng tốt nhất cho mục đích tái sinh chồi *in vitro* và nuôi cấy mô. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đóng vai trò quan trọng trong quá trình biệt hóa, phân chia và kéo dài tế bào. Hiệu quả của quá trình tái sinh chồi cũng bị ảnh hưởng bởi nguồn carbon. Sucrose đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong việc cải thiện sự phát triển của cây và tỷ lệ tái sinh chồi, trong khi glucose và maltose đóng một vai trò nhỏ trong việc tạo chồi [30].

Việc nuôi cấy *in vitro* có thể sử dụng các loại mẫu vật khác nhau nhưng phổ biến và cho hiệu quả cao đó là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Yêu cầu quan trọng nhất trong nhân giống *in vitro* là khả năng phân chia mạnh của mô phân sinh, do đó nuôi cấy đỉnh sinh trưởng là kỹ thuật được ứng dụng nhiều nhất trong nông nghiệp [130]. Đoạn thân mang mắt chồi bên là loại mẫu vật được thăm dò nhiều nhất trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, cho hiệu quả đa chồi cao ở phần lớn các loài thực vật trong đó có cây dược liệu như Ba kích (*Bacopa monnieri* L.) [99], cây Cà đại quả đỏ (*Solanum surattense* Bum.) [100], cây Bần tràng (*Hemidesmus indicus*) [133]... Các nghiên cứu cho thấy môi trường cho hiệu quả tái sinh đa chồi cao phù hợp với nhiều loài cây dược liệu là MS cơ bản có bổ sung BAP với các nồng độ khác nhau [142]. Có những cây dược liệu môi trường nuôi cấy chỉ cần bổ sung nồng độ BAP thấp đã cho hiệu quả đa chồi cao. Ở cây Ba kích (*B. monnieri* L.) nghiên cứu cảm ứng tạo đa chồi bằng đoạn thân mang mắt chồi bên cho thấy chồi phát sinh trên môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng hoặc bổ sung với nồng độ thấp BAP 1,0 mg/l [99]. Ở cây Cà đại quả đỏ (*S. surattense* Bum.), môi trường tái sinh đa chồi hiệu quả nhất là môi trường MS cơ bản có bổ sung nồng độ BAP 0,5mg/l đã cho số chồi trung bình đạt được là 58,2 chồi/mẫu [100]. Tương tự, cây Lưu ly Ấn Độ (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) cũng cho hiệu quả tái sinh đa chồi tốt trong môi trường MS bổ sung nồng độ BAP 0,4 mg/l [29]. Cảm ứng tạo đa chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên trong môi trường MS có bổ sung nồng độ BAP 1,5mg/l

ở cây Thuốc hen (*Tylophora asthmatica*), BAP 1,0 mg/l ở cây Đuôi chồn màu (*Uraria picta*) [157], BAP 2 mg/l ở cây Vả (*Ficus carica*) [94] đã cho tỉ lệ tạo chồi cao. Nghiên cứu khả năng cảm ứng tạo đa chồi của cây Điều nhuộm (*Bixa orellana* L.) trên môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng lần lượt là BAP, zeatin, isopentenyl adenine (2-iP), kinetin, hoặc thidiazuron (TDZ) cho thấy hiệu quả đa chồi tốt nhất ở môi trường MS bổ sung BAP 1,0 mg/l, với các chất còn lại hiệu quả không cao [26]. Tuy nhiên, ở một số cây được liệu hiệu khác, cảm ứng đa chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên cho hiệu quả khi môi trường nuôi cấy bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng ở nồng độ cao như ở cây Râu mèo (*Orthosiphon stamineus* Benth.) bổ sung BAP 6,7 mg/l [88]; cây Ngư mộc (*Crataeva magna* Lour.) bổ sung BAP 8,8 mg/l [22]; cây Diên thanh hoa vàng (*Sesbania drummondii*) bổ sung BAP 22,2 mg/l [33]. Việc kết hợp BAP với một số chất kích thích sinh trưởng khác cũng cho hiệu quả tái sinh đa chồi cao. Ở cây Bần trảng (*Hemidesmus indicus*) đoạn thân mang mắt chồi bên có khả năng tạo nhiều chồi nhất (9,37 chồi/mẫu trong 4 tuần) trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung BAP 2,22 mg/l + NAA 1,07 mg/l [133]. Loài Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bert.) có hiệu quả đa chồi tốt nhất (5,16 chồi/mẫu) trên môi trường MS bổ sung BAP 1,0 mg/l + kinetin 1,0 mg/l [59]. Hiệu quả tái sinh đa chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên còn phụ thuộc vào môi trường cơ bản như ở cây Bạch tật lê (*Tribulus terrestris* Linn.) môi trường WPM có bổ sung BAP 4 mg/l cho hiệu quả đa chồi tốt nhất 7 chồi/mẫu cấy sau 4 tuần nuôi cấy [158]; phụ thuộc vào kích thước của đoạn thân như ở cây Điều nhuộm (*Bixa orellana* L.) với kích thước đoạn thân là 0,5 cm cho số lượng đa chồi lớn nhất trên môi trường B5 có bổ sung isopentenyl adenine 4,9 mg/l [129]; hay phụ thuộc vào nồng độ sắt trong môi trường nuôi cấy như ở cây Lá móng (*Lawsonia inermis*) [27]...

Bên cạnh đoạn thân mang mắt chồi bên thì sử dụng mẫu vật là lá mầm cũng cho hiệu quả tái sinh đa chồi ở cây được liệu hai lá mầm. Cây Cà tím (*Solanum melongena* L.) là một loại cây trồng quan trọng về mặt kinh tế trên toàn thế giới, được nghiên cứu kỹ lưỡng về các đặc tính dược liệu, giá trị dinh dưỡng. Nghiên cứu cảm ứng tạo chồi từ mẫu cấy lá mầm của cà tím cho thấy cả BAP và kinetin đều có thể tạo ra mô sẹo từ mẫu cấy lá mầm. Trên môi trường cơ bản MS bổ sung Kinetin

2,0 mg/l tạo chồi thành công với 1,50 chồi/mẫu, còn BAP thích hợp cho cảm ứng mô sẹo [52]. Nghiên cứu hệ thống tái sinh đa chồi *in vitro* ở cây Giáng hương (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) sử dụng mẫu cây là lá mầm cây trên môi trường MS bổ sung BAP 5mg/l + IAA 0,25 mg/l cho hiệu quả đa chồi đạt 4,16 chồi/mẫu sau 5-6 tuần nuôi cấy [98]. Tương tự, hệ thống tái sinh đa chồi ở cây Bàu nâu (*Aegle marmelos* L.) đã được xây dựng khi sử dụng mẫu cây là lá mầm cây trên môi trường MS bổ sung BAP (0-8,8 mg/l), kinetin (0-9,4 mg/l) và IAA (0-1,14 mg/l). Sau 7 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy số chồi cao nhất đạt được là 48,75 chồi/mẫu trên môi trường MS bổ sung BAP 6,6 mg/l + IAA 1,14 mg/l [114]. Sự tái sinh *in vitro* từ mẫu cây một lá mầm của cây Vừng (*Sesamum indicum* L.) ở các công thức khác nhau của môi trường MS bổ sung BAP, thidiazuron và axit indole-3-acetic cho thấy hiệu suất tái sinh tối đa (25,93%) thu được trong môi trường MS bổ sung BAP 33,33 mg/l + IAA 2,85 mg/l trong 6 tuần nuôi cấy [43]. Nghiên cứu tái sinh đa chồi ở cây Mù tạt (*Salvadora persica*) là một cây thuốc quan trọng ở vùng sa mạc với mẫu cây là lá mầm sau 20 ngày gieo hạt, được cấy trên môi trường MS cơ bản có bổ sung chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin (NAA, IAA và 2,4-D) và cytokinins (BAP và kinetin). Kết quả đạt được số chồi lớn nhất là 17,5 chồi/mẫu trên môi trường MS có bổ sung BAP 2,0 mg/l kết hợp với IAA 0,5 mg/l [128].

Việc sử dụng mẫu vật là đoạn thân mang mắt chồi bên và lá mầm mang lại hiệu quả đa chồi cao ở rất nhiều các loài cây dược liệu, tuy nhiên trong một số trường hợp, hiệu quả đa chồi lại đạt được từ mẫu lá. Nghiên cứu hệ thống tái sinh đa chồi từ mẫu vật là đoạn thân mang mắt chồi bên và mẫu lá ở cây Tầm bóp (*Physalis peruviana* L.) cấy trên môi trường MS bổ sung chất kích thích sinh trưởng BAP, GA₃ và 2,4-D. Kết quả cho thấy với mẫu vật là đoạn thân mang mắt chồi bên cho số chồi tối đa là 15,4 chồi/mẫu ở môi trường bổ sung BAP 2,0 mg/l + GA₃ 1,0 mg/l + 2,4-D 1,0 mg/l; còn với mẫu vật là lá thì cho số chồi tối đa là 15,3 chồi/mẫu ở môi trường bổ sung BAP 3,0 mg/l + GA₃ 1,0 mg/l + 2,4-D 1,0 mg/l [80]. Tái sinh cây trực tiếp từ các mẫu lá được phân loại trong ống nghiệm của cây thuốc *Hypericum spectabile* thuộc họ Bứa cho thấy rằng sự hình thành chồi cao nhất bằng cách sử dụng cây lá, thu được trên môi trường MS chứa BAP 1 mg/l và kinetine 1 mg/l [48]. Nghiên cứu

tạo chồi ở cây Chanh dây (*Passiflora edulis*) sử dụng đĩa lá từ nguyên liệu lá non tươi cho thấy tần số cảm ứng chồi cao nhất (14,85%) đạt được trên môi trường MS có bổ sung BAP 8,9 mg/l [151]. Ở cây Cà hôi (*Solanum pubescens*) từ mẫu lá cây trên môi trường MS bổ sung chất kích thích sinh trưởng BAP, NAA, GA₃. Số chồi lớn nhất đạt được là 3,5 chồi/mẫu ở nồng độ BAP 3,0 mg/l + GA₃ 1,0 mg/l [154].

Đối với chi *Aconitum*, kết quả nghiên cứu về nuôi cấy *in vitro* trong báo cáo của Rawat và cs (2013) cho thấy hệ thống tái sinh *in vitro* có khả năng tái sinh ở loài *Aconitum violaceum* được phát triển từ các đoạn thân. Cảm ứng đa chồi đạt được trên môi trường MS ban đầu được bổ sung BAP 0,5 mg/l và NAA 0,1 mg/l với tỷ lệ tái sinh thành công khoảng 85,43% [76]. Singh và cs (2020) đã đưa ra báo cáo đầu tiên về nhân giống *in vitro* từ đoạn rễ của loài *Aconitum ferox*, một loại cây thuốc có nguy cơ tuyệt chủng trên dãy Himalaya. Các đoạn chóp rễ *A. ferox* được sử dụng để tạo mô sẹo, và sau đó các chồi phát triển từ mô sẹo được chuyển sang môi trường MS có bổ sung BAP [96].

Như vậy, trong ba loại mẫu vật đã tổng kết để tạo đa chồi ở cây dược liệu, thì đoạn thân mang mắt chồi bên và lá mầm là loại mẫu vật được sử dụng nhiều, mang lại hiệu quả đa chồi cao, còn mẫu lá thì ít được sử dụng hơn vì hiệu quả đa chồi không cao. Môi trường được sử dụng phổ biến để tạo đa chồi đó là môi trường MS cơ bản có bổ sung các loại chất kích thích sinh trưởng, chủ yếu là BAP ở các nồng độ khác nhau, có thể kết hợp với các chất kích thích sinh trưởng khác như IBA, NAA, 2,4-D... Hiện nay, đã có một số tác giả tiếp cận nghiên cứu để xây dựng hệ thống tái sinh của một số loài thuộc chi *Aconitum*. Tuy nhiên, trên thế giới cũng như ở Việt Nam chưa thấy nghiên cứu nào công bố về hệ thống tái sinh phục vụ chuyển gen ở cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.).

1.2.2. Nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ ở cây dược liệu

1.2.2.1. Cảm ứng tạo rễ tơ thông qua vi khuẩn *Rhizobium rhizogenes*

Vi khuẩn *Rhizobium rhizogenes* (trước đây gọi là *Agrobacterium rhizogenes*) là họ hàng của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và có thể được sử dụng để tạo ra

rễ có tên là “rễ tơ” khi mẫu lá hoặc đoạn thân cây bị thương và nhiễm khuẩn. Một gen mục tiêu có thể được chuyển và kết hợp vào hệ gen của cây chủ bằng cách lây nhiễm vi khuẩn *R. rhizogenes* có chứa một plasmid Ri biến đổi, dẫn đến tạo ra các rễ có lông tơ chuyển gen. Dựa trên cơ chế này, một ứng dụng công nghệ sinh học có giá trị đã được khai thác, được gọi là nuôi cấy rễ tơ [105]. Trong những năm gần đây, hệ thống nuôi cấy rễ tơ qua xử lý bằng *R. rhizogenes* đã được chọn làm phương pháp thay thế khả thi để sản xuất hợp chất dược phẩm từ cây thuốc. Nuôi cấy rễ tơ mang lại cơ hội sản xuất ổn định nhiều loại chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật so với nuôi cấy tế bào/mô sẹo thực vật chưa biệt hóa. Rễ tơ cũng mang lại những lợi thế như tốc độ tăng trưởng nhanh hơn không phụ thuộc vào hormone, ổn định di truyền và sinh hóa, khả năng sinh tổng hợp hiệu quả so với rễ cây bản địa, bảo quản lâu dài và sản xuất sinh khối lớn [34].

Rễ tơ (hairy root) là tên gọi dùng để chỉ các rễ nhỏ được sản sinh ra mạnh mẽ tại vị trí bị nhiễm bởi vi khuẩn *R. rhizogenes* qua các vết thương. Rễ tơ do *R. rhizogenes* được đánh giá là phù hợp để sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp ở thực vật. Với sự biến nạp gen của *R. rhizogenes* vào tế bào, rễ tơ có khả năng tổng hợp ra nhiều loại hợp chất tự nhiên với hiệu suất cao mà các tế bào không phân hóa và các rễ bất định không chuyển gen không tổng hợp được hay tổng hợp với hàm lượng không đáng kể [9]. Khi các vi khuẩn *R. rhizogenes* nhiễm vào vết thương của thực vật thì chúng sẽ chuyển gen của chúng vào các tế bào thực vật tại vị trí đó. Các gen được chuyển từ *R. rhizogenes* vào trong hệ gen của tế bào thực vật được gọi tên là T-DNA. Vùng T-DNA này nằm trong một plasmid lớn của *R. rhizogenes* và plasmid này được đặt tên là Ri-plasmid [39]. Vi khuẩn bị thu hút về mặt hóa học đối với thực vật bằng cách nhận ra các phân tử phenolic, đặc biệt là acetosyringone, được giải phóng bởi các mô cây bị thương. Khi *R. rhizogenes* tiếp xúc với vị trí vết thương, nó chuyển và tích hợp một đoạn plasmid gây cảm ứng rễ (Ri-plasmid) của nó mang gen locus rễ (*rolA*, *rolB* và *rolC*) vào hệ gen thực vật, dẫn đến sự phát triển của rễ nhiều nhánh, nhiều lông tại vị trí nhiễm bệnh [35]. Ri-plasmid bao gồm các vùng như vùng gây độc (gọi tắt là vùng *vir*), vùng chuyển gen (T-DNA), vùng *ori*, vùng phiên mã... Chỉ có đoạn T-DNA của plasmid mới được chuyển vào hệ gen của thực vật thông

qua sự hỗ trợ bởi các đoạn gen trong vùng *vir* của Ri-plasmid. Trong Ri-plasmid vùng *vir* chiếm khoảng 35 kb 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 bờ trái và bờ phải) để gắn vào genom thực vật trong quá trình chuyển gen [155]. T-DNA chứa hai vùng trình tự độc lập, lần lượt là vùng biên trái TL-DNA và vùng biên phải TR-DNA. TL-DNA và TR-DNA thường được chuyển độc lập và tích hợp ổn định vào bộ gen của cây chủ [56]. Vùng TR-DNA đóng vai trò cho quá trình khởi tạo rễ vì nó mang gen mã hóa các enzyme kiểm soát sinh tổng hợp auxin (*aux1* và *aux2*), ngoài ra TR-DNA cũng mang gen mã hóa tổng hợp opine. Vùng TL-DNA mang các gen *rol* chịu trách nhiệm về các kiểu hình rễ tơ, bao gồm 18 khung đọc (ORFs), trong đó có 4 locus 10, 11, 12 và 15 tương ứng mã hóa cho các gen *rolA, rolB, rolC* và *rolD* [153]. Sự biểu hiện của các gen *rol* dẫn đến sự hình thành rễ ở thực vật bị tổn thương, tuy nhiên mỗi gen có sự khác nhau về mức độ biểu hiện của nó và gen *rolB* có khả năng gây cảm ứng kiểu hình rễ tơ mạnh nhất. Trong một nghiên cứu về sự mất chức năng, người ta đã phát hiện ra rằng việc bất hoạt gen *rolB* không tạo được kiểu hình rễ tơ. Ngoài ra, gen *rolB* có liên quan đến các con đường ức chế gen sau phiên mã thông qua sự biểu hiện quá mức của microRNA. Gen *rolB* của *R. rhizogenes* có liên quan đến việc kích hoạt các yếu tố phiên mã của hầu hết các chất chuyển hóa chuyên biệt trong nuôi cấy rễ tơ cũng như vào sự biểu hiện của các protein loại chaperone [56].

1.2.2.2. Tình hình nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ ở cây dược liệu

Cây dược liệu tạo ra một nhóm đa dạng các hợp chất thực vật như anthraquinon, alkaloid, anthocyanins, flavonoid, saponin và terpen được sử dụng trong ngành dược phẩm, nước hoa, mỹ phẩm, thuốc nhuộm và hương liệu. Công nghệ sinh học có một vai trò quan trọng trong việc sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp có giá trị cao. Bằng cách kết hợp các phương pháp công nghệ sinh học, có thể quản lý các con đường sinh tổng hợp của thực vật để tăng cường sản xuất hợp chất thứ cấp trong thực vật đang được quan tâm trong ngành dược phẩm. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật, chồi, rễ bất định và rễ lông được coi là các phương pháp thay thế để sản xuất hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng. Các phương pháp này có thể kiểm soát được, bền vững và khắc phục một số bất tiện cho sản xuất chất chuyển hóa

thứ cấp quy mô lớn. Hiện nay, nghiên cứu về nuôi cấy rễ tơ cảm ứng nhờ vi khuẩn *R. rhizogenes* để sản xuất hợp chất có hoạt tính sinh học có giá trị đã được quan tâm rất nhiều [125]. Rễ tơ phát triển nhanh hơn nhiều so với nuôi cấy tế bào thực vật và không cần bổ sung hormon sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy. Rễ tơ có khả năng sinh tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp cao hơn nhiều lần so với cây mẹ, có sự phân nhánh bên và ổn định về mặt di truyền [9].

Các chủng vi khuẩn được sử dụng và mật độ của vi khuẩn cũng có ảnh hưởng tới quá trình lây nhiễm. Chủng vi khuẩn hoang dại *R. rhizogenes* chứa Ri-plasmid thuộc loại agropine thường được sử dụng tạo rễ tơ ở cây được liệu đó là A4, 15834, 1855, LBA 9402 [24]. Thực nghiệm đã chứng minh rằng hiệu quả chuyển gen của chủng *R. rhizogenes* A8196 cao hơn *R. rhizogenes* NCPPB 1855 [67].

Việc lựa chọn cẩn thận loại và chất lượng của các nguyên liệu thực vật được sử dụng để biến nạp là rất quan trọng, quyết định đến hiệu suất chuyển gen. Các nguyên liệu thực vật thường được sử dụng để lây nhiễm vi khuẩn *Agrobacterium* và thiết lập hệ thống biến nạp là phôi trưởng thành, phôi chưa trưởng thành hoặc mô sẹo từ mẫu cấy của lá, rễ, lá mầm, đoạn thân và các mô khác. Các tế bào thực vật của các cơ quan này có xu hướng phân chia mạnh mẽ hoặc sắp phân chia và có thể tái sinh dễ dàng. Các protein liên quan đến bộ máy tái tạo và sửa chữa DNA được thể hiện rất rõ trong các tế bào đang phân chia tích cực này và đóng vai trò quan trọng trong việc thiết lập các phương pháp biến nạp thành công. Trong nghiên cứu tạo rễ tơ cây Bàng, Hwang và cs (2019) đã cho thấy 92% cây Bàng chuyển gen 3 ngày tuổi có biểu hiện gen chuyển ở trong mô rễ và lá mầm sau khi bị nhiễm *R. rhizogenes* [67].

Thời gian lây nhiễm thay đổi đáng kể tùy theo sự lựa chọn của mẫu cấy và loài thực vật. Do đó, việc xác định thời gian lây nhiễm tối ưu có thể rất quan trọng để nâng cao hiệu quả chuyển đổi của cây trồng cụ thể đó [34]. Một yếu tố quan trọng khác có thể góp phần vào sự thành công của thử nghiệm biến nạp tạm thời và ổn định là nồng độ vi khuẩn nuôi cấy. Nồng độ vi khuẩn quá cao có thể gây ra quá nhiều tổn thương mô thực vật và chết tế bào do nhiễm vi khuẩn và nồng độ quá thấp có thể không tạo ra đủ T-DNA và protein Vir để biến nạp hiệu quả [67]. Konieczny và cs

(2011) báo cáo rằng mật độ nuôi cấy *R. rhizogenes* tối ưu để biến nạp ở cây Bàng là $OD_{600} = 2$ (khoảng 2×10^9 cfu/ml) và nồng độ vi khuẩn cao hơn sẽ làm giảm đáng kể hiệu suất biến nạp [119].

Acetosyringone, một hợp chất phenol đơn vòng, đóng một vai trò quan trọng trong việc kích hoạt gen *vir* và chuyển T-DNA, nó cần thiết cho hoạt động sinh học và duy trì biểu hiện gen *vir* trong tế bào chủ [34]. Hiệu suất biến nạp ở cả rễ của hai chủng *R. rhizogenes* MTCC 2364 và *R. rhizogenes* MTCC 532 phụ thuộc nhiều vào nồng độ acetosyringone. Việc bổ sung acetosyringone 100 μ M vào môi trường đồng nuôi cấy đã nâng cao tỷ lệ cảm ứng rễ tơ và tăng số lượng của rễ/rễ bên đối với cả hai chủng khi so sánh với đối chứng [167]. Ở *B. Aristata*, môi trường đồng nuôi cấy có chứa acetosyringone 100 μ M được phát hiện là có hiệu quả nhất đối với việc cảm ứng rễ lông từ mẫu lá bị nhiễm *R. rhizogenes* MTCC 532 [85].

Ở 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 chất chuyển hóa thứ cấp tự nhiên có trong rễ. Cây hạnh phúc (*Camptotheca acuminata*) và một số loài khác thuộc họ Apocynaceae, Olacaceae và Rubiaceae được biết đến là cây trị ung thư do trong cây có chứa hợp chất camptothecin (CPT) là một hợp chất điều trị ung thư và kháng virus. Nghiên cứu sản xuất CPT bằng việc nuôi cấy huyền phù tế bào đã được tiến hành, tuy nhiên sản lượng thu được thấp. Lorence và cs (2004) đã tiến hành nuôi cấy rễ tơ của cây trị ung thư từ lá mầm, lá thật được lây nhiễm bởi chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* ATCC 15834 và R-1000. Kết quả hình thành các rễ tơ có hàm lượng CPT và 10-hydroxycamptothecin (HCPT) tương đối cao lần lượt là 1,0 và 0,15 mg/g trọng lượng khô đối với CPT và HCPT [23]. Le Flem-Bonhomme và cs (2004) đã nghiên cứu tăng hàm lượng alkaloid tổng số ở cây Thuốc phiện (*Papaver somniferum* L.) bằng phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ. Hai chủng *R. 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 và so sánh với khả năng cảm ứng tạo rễ tơ từ đoạn trụ dưới lá mầm của cây Thuốc phiện. Sau năm tuần lây nhiễm với *R. rhizogenes* LBA 9402 cho kết quả rễ tơ xuất hiện trên 80% mẫu cây và có 6 dòng rễ tơ được chuyển gen thành công. Khi phân tích hiệu quả sản xuất alkaloid của một

trong 6 dòng rễ tơ cho thấy hàm lượng alkaloid tổng số trong dòng rễ tơ chuyển gen (0,46%) cao hơn trong rễ không chuyển gen (0,32%). Rễ chuyển gen tích lũy codeine (0,18%) nhiều gấp ba lần so với rễ không chuyển gen (0,05%) [156]. Sara Sharifi và cs (2014) đã nghiên cứu biến nạp tạo rễ tơ cho cây Bạch tật lê (*Tribulus terrestris* L.), một loại cây thuốc quan trọng, sử dụng các chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* AR15834 và GMI9534 với mục đích sản xuất β -carboline. Rễ tơ được hình thành trực tiếp từ các mép cắt của mẫu lá 10–14 ngày sau khi cấy vi khuẩn *R. rhizogenes* với tần số biến nạp cao nhất là 49%, đạt được khi sử dụng vi khuẩn *R. rhizogenes* AR15834 trên môi trường MS không có hormone sau 28 ngày cấy. Rễ biến đổi có đặc điểm sinh trưởng nhanh và phân nhánh bên cao so với rễ không biến đổi. Khi phân tích hàm lượng alkaloid β -carboline đạt được là 1,7 $\mu\text{g/g}$ trọng lượng khô của các mẫu cấy rễ tơ chuyển gen vào cuối 50 ngày nuôi cấy [137]. Shirin Yousefian và cs (2020) tiến hành nghiên cứu cảm ứng rễ tơ ở mẫu lá và thân của cây Bạc hà (*Mentha spicata* L.) thông qua 5 chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* (A13, R318, A4, GMI 9534 và ATCC15834) để sản xuất acid phenolic. Việc biến nạp bằng phương pháp tiêm trực tiếp các chủng được kiểm tra vào mẫu cấy đều có hiệu quả. Tất cả các phần khác nhau của thân cây đều cảm ứng với *R. rhizogenes*. Trong số các chủng khác nhau, chủng *R. rhizogenes* A13 thể hiện hiệu quả lây nhiễm cao nhất (gần 75% số mẫu cấy). Rễ tơ bị nhiễm *R. rhizogenes* A13 và R318 có sản lượng sinh khối cao nhất (gần 60 mg/bình), còn rễ tơ nhiễm *R. rhizogenes* GMI 9534 tạo ra hàm lượng axit phenolic cao nhất. Sự gia tăng đáng kể sự phát triển của rễ và sự tích tụ axit phenolic đạt được sau khi xử lý IBA 0,3 mg/l và MeJA 100 μM tương ứng [177]. Để sản xuất gypenosides như một giải pháp thay thế saponin nhân sâm Chang và cs (2005) đã nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Giáo cỏ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb.). Sử dụng mẫu lá non để lây nhiễm với *R. rhizogenes* ATCC 15834 có bổ sung thêm acetosyringone 20 μM . Rễ tơ xuất hiện ở các mẫu cấy sau khi lây nhiễm 2 tuần. Sinh khối rễ tơ khô phát triển trong môi trường MS trong 49 ngày là 7,3 g/l với hàm lượng gypenoside là 38 mg/g khối lượng khô [79]. Ngoài ra còn rất nhiều các công trình nghiên cứu tạo sinh khối rễ tơ để cải thiện hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp tự nhiên có trong các cây dược liệu như sản xuất hợp chất verbascoside trong rễ tơ ở cây Lôi thọ (*Gmelina arborea* Roxb.),

tăng hàm lượng glycyrrhizin tổng số trong rễ tơ của cây Cam thảo (*Glycyrrhiza glabra*), tăng hàm lượng plumbagine trong rễ tơ cây *Plumbago rosea*, tăng hàm lượng saponin trong rễ tơ của Rau đắng biển (*Bacopa monnieri*), tăng hàm lượng anthraquinones tổng số trong rễ tơ cây Hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.) và tăng hàm lượng polyphenols tổng số trong rễ tơ cây Mướp đắng (*Momordica charantia*) [9].

Ở Việt Nam, đã có một số công trình đạt được nhiều thành tựu trong nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ để thu sinh khối và chất chuyển hóa thứ cấp ở các loài dược liệu [9]. Phí Thị Cẩm Miện và cs (2020) đã nghiên cứu cảm ứng tăng sinh khối rễ tơ thành công cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) là một loài dược liệu quý ở Việt Nam, chứa hàm lượng hoạt chất sinh học chống ung thư cao như coumarin, otruthin, saponin nhờ vi khuẩn *R. rhizogenes* K599. Vật liệu thích hợp nhất lây nhiễm cảm ứng tạo rễ tơ là rễ cây con *in vivo* với mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị mật độ quang $OD_{600} = 0,6$ trong thời gian lây nhiễm là 30 phút. Các dòng rễ tơ có khả năng tăng trưởng nhanh, ổn định và hiệu quả hình thành rễ tơ cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường WPM/2 không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng ở điều kiện tối trong 6 ngày và đã được kiểm chứng nhờ kỹ thuật PCR với cặp mồi nhân gen *rolC* [13]. Vũ Thị Như Trang và cs (2017) đã nghiên cứu nuôi cấy mô tạo dòng rễ tơ tăng sinh khối nhằm mục đích tăng cường hàm lượng flavonoid trong cây Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum* Gaertn.) thông qua lây nhiễm *R. rhizogenes*. Trong 3 loại vật liệu lây nhiễm với *R. rhizogenes* (lá mầm, đoạn thân mang mắt chồi bên, mô lá) thì mô lá là vật liệu thích hợp cho tạo rễ tơ với các điều kiện: 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. Sự tăng trưởng rễ tơ đạt hiệu quả cao trong môi trường MS ở trạng thái lỏng, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nuôi trong điều kiện lắc [20]. Trà Đông Phương và cs (2016) đã nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ cây Cát cánh (*Platycodon grandiflorum* Jacq.) nhằm tạo nguồn nguyên liệu ban đầu ổn định, có khả năng tăng sinh nhanh (trong môi trường không có hormone) và sản xuất nhiều hợp chất thứ cấp thông qua lây nhiễm bốn chủng *R. rhizogenes*. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng *R. rhizogenes* ATCC 15834 và

C34 có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ cát cánh. Hai gen *rolB* và *rolC* chịu trách nhiệm cảm ứng tạo rễ tơ khi được kiểm tra đã sát nhập thành công vào bộ gen rễ tơ Cát cánh. Lá Cát cánh là nguyên liệu được cảm ứng tốt nhất với 100 % số mẫu có khả năng tạo rễ tơ. Quy trình được tối ưu hóa thời gian ngâm mẫu và thời gian đồng nuôi cây với kết quả tốt nhất tương ứng là 10 và 15 phút (10 phút cho chủng *R. rhizogenes* ATCC 15834 và 15 phút cho chủng *R. rhizogenes* C34) và 72 giờ [16]. Ninh Thị Thảo và cs (2015) đã tiến hành nghiên cứu cảm ứng tạo dòng rễ tơ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) nhằm mục đích tăng sinh khối rễ tơ nhờ vi khuẩn *R. rhizogenes* ATCC 15834. 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 điều tiết sinh trưởng và khối lượng rễ tơ tăng so với khối lượng rễ ban đầu đạt cao nhất (7,67 lần) sau 4 tuần khi nuôi cấy rễ tơ trên môi trường B5 đặc [18]. Phan Trung Hải và cs (2016) cũng đã tiến hành nghiên cứu cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ cây Hoa móng tay (*Impatiens balsamina* L.) là một loài cây được trồng phổ biến ở Việt Nam và đang được sử dụng nhiều trong các bài thuốc dân gian cổ truyền từ mười bốn chủng *R. rhizogenes*. Kết quả đã chọn lọc được ba chủng vi khuẩn (C02, C18 và C26) cho tỷ lệ cảm ứng hình thành rễ tơ cao trên cây Hoa Móng tay và khảo sát được một số yếu tố ảnh hưởng lên khả năng tạo rễ tơ từ các chủng chọn lọc. Trong đó mô lá là vật liệu thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ trên cây Hoa Móng tay khi xâm nhiễm với mật độ khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 1,0$ với thời gian gây nhiễm là 5 - 15 phút và thời gian đồng nuôi cấy là 72 giờ. Qua kết quả kiểm tra gen *rolB* bằng phương pháp PCR, các dòng rễ đều mang gen chuyển. Môi trường B5 là môi trường thích hợp cho sự tăng sinh khối rễ tơ. Dòng rễ tơ được cảm ứng từ chủng *R. rhizogenes* C02 cho khả năng sinh trưởng nhanh nhất [6]. Phạm Bích Ngọc và cs (2012) cũng đã nghiên cứu thành công khả năng tạo rễ tơ của cây Bá bệnh thông qua vi khuẩn *R. rhizogenes*. Kết quả đã thu được các dòng rễ tơ cây Bá bệnh phát triển nhanh và phân nhánh nhiều [14]. Ngoài ra, Nguyễn Như Nhút và cs (2016) đã tiến hành nghiên cứu thành công quy trình cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*) [15], Hà Thị Loan và cs (2014) cũng đã tiến hành nghiên cứu

thành công quy trình cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*) [10].

Tóm lại, các loại cây dược liệu là một kho báu của các loại thuốc với các hợp chất thứ cấp tiềm năng và trong những năm gần đây con người đã nhận thức ngày càng rõ ràng hơn về tầm quan trọng của cây dược liệu. Chính vì vậy có rất nhiều các công trình nghiên cứu đã xác định được điều kiện tối ưu về chủng vi khuẩn, mật độ vi khuẩn, loại mẫu cấy, nồng độ AS, thành phần môi trường và các yếu tố tác động như tác nhân vật lý hay hóa học...phù hợp với từng loài dược liệu để tạo dòng rễ tơ, nhân nuôi sinh khối rễ tơ để thu nhận các hợp chất có giá trị dược học. Sự thành công trong nuôi cấy sinh khối rễ tơ và tăng cường sản xuất các hợp chất thứ cấp, sản xuất các protein tái tổ hợp từ rễ tơ của cây dược liệu sẽ đóng góp nhiều cho công tác chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

1.3. FLAVONOID VÀ NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN FLAVONOID 3'5' HYDROXYLASE

1.3.1. Đặc điểm về cấu trúc hóa học và vai trò của flavonoid

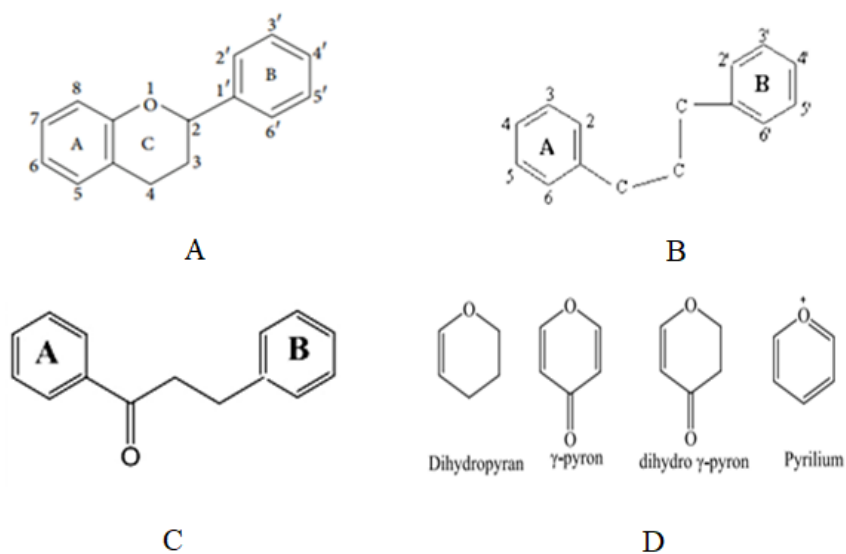
1.3.1.1. Cấu trúc hóa học của flavonoid

Flavonoid là một trong những hợp chất phong phú và đa dạng nhất trong thiên nhiên. Những tiến bộ trong nghiên cứu flavonoid đã dẫn đến việc phát hiện ra nhiều flavonoid khác, mở đường cho việc xác định đặc điểm cấu trúc và hoạt động sinh học của chúng. Hiện nay, có hơn 9000 hợp chất flavonoid đã được xác định từ các nguồn thực vật và có phần lớn ở các bộ phận của các loài thực vật bậc cao [28]. Flavonoid bao gồm một nhóm lớn các hợp chất polyphenol có cấu trúc benzo- γ -pyrone và có mặt ở tất cả các cơ quan, bộ phận của thực vật. Flavonoid là các chất phenol đã hydroxyl hóa, chúng được tổng hợp bằng con đường phenylpropanoid. Bản chất hóa học của flavonoid phụ thuộc vào lớp cấu trúc của chúng, mức độ hydroxyl hóa, mức độ trùng hợp, các nhóm thế và liên kết khác [83].

Flavonoid là các chất thuộc nhóm hợp chất phenolic đa vòng. Phần lớn các flavonoid có màu vàng, ngoài ra còn có những chất màu xanh, tím, đỏ hoặc không màu [115]. Các flavonoid có khối lượng phân tử thấp (500–4000 Da). Về cấu trúc hóa học, flavonoid có khung cơ bản, gồm 15 nguyên tử carbon theo kiểu C6-C3-C6

(2 vòng benzene A và B nối với nhau qua một mạch 3 carbon). Cấu trúc hóa học của flavonoid được đặc trưng bởi sự hiện diện của một số nhóm hydroxyl phenolic (polyphenol) khác [104]. Các lớp flavonoid khác nhau khác nhau về mức độ oxy hóa và kiểu thay thế vòng C, trong khi các hợp chất riêng lẻ trong một lớp khác nhau ở kiểu thay thế vòng A và B [83].

Flavonoid có cấu trúc chung là một khung xương diphenylpyranes bao gồm vòng phenyl-benzopyran liên kết với vòng aryl (vòng B) có thể ở các vị trí 2, 3 hoặc 4 của vòng benzopyran (Hình 1.2A, B). Trong đa 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 được gọi là dihydrochalcone được phân lập từ nấm *Stinkhorn* (Hình 1.2C); 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 1.2D).



Hình 1.2. Sơ đồ cấu trúc hóa học của flavonoid. A: Cấu trúc chung của flavonoid; B: Khung cơ bản của flavonoid; C: Khung cơ bản của hợp chất chalcone; D: Các dạng của dị vòng C [83].

Flavonoid xuất hiện dưới dạng aglycone, glycoside và các dẫn xuất methyl hóa. Cấu trúc flavonoid cơ bản là aglycone. Flavonoid được chia thành hai nhóm chính dựa

trên vị trí của nhóm thế benzenoid là 2-phenylchromans (flavonoid) và 3-phenylchromans (isoflavonoid) [83]. Nhóm 2-phenylchromans bao gồm các phân lớp của flavanones, flavon, flavonols, flavan-3-ols, và anthocyanidins; trong khi 3-phenylchromans bao gồm các phân lớp của isoflavon, isoflavans và pterocarpan [28].

Họ flavone là một nhóm phụ của flavonoid được tổng hợp phụ thuộc vào việc glycosyl hóa C- hoặc O- và hydroxyl hóa vòng B. Các hợp chất này được đặc trưng bởi một liên kết đôi giữa C-2 và C-3 và một C-2 trong vòng B. Flavone có các hoạt động chống oxy hóa do khả năng loại bỏ các loại oxy phản ứng [75]. Flavonols bao gồm nhiều đơn vị cấu trúc phenol, ví dụ về nhóm này là quercetin, kaempferol, rutin và myricetin [178]. Flavanone có đặc điểm là thiếu liên kết đôi giữa C-2 và C-3 trong vòng C của khung flavonoid. Do đó, trong các hợp chất này, C-2 mang một nguyên tử hydro bên cạnh vòng phenol B, và C-3 có hai nguyên tử hydro [104]. Các flavanol hoặc catechin, còn được gọi là flavan-3-ols, là các hợp chất không glycosyl hóa có trong thực vật ở dạng đơn phân (catechin). Nhóm hydroxyl liên kết với vị trí 3 của vòng C, và không có liên kết đôi giữa vị trí 2 và 3. Một đặc điểm quan trọng khác là tính nucleophil cao của các vòng A của chúng đối với HO^- và RO^- [116]. Sắc tố anthocyanin là một phân nhóm của flavonoid có một nhóm OH^- ở vị trí 3 nhưng cũng có một liên kết đôi giữa nguyên tử carbon 3 và 4 của vòng C, hiện diện chủ yếu trong không bào của tế bào thực vật. Nhóm này là flavonoid chính chịu trách nhiệm về màu sắc cyanic (đỏ, tím và xanh lam) trong rau, hoa và trái cây [31]. Dựa vào các nhóm OH của vòng B, có ba nhóm anthocyanin chính được tìm thấy trong thiên nhiên là pelargonidin, cyaniding và delphinidin. Methyl hóa cyaniding và delphinidin tạo ra thêm ba nhóm anthocyanin bổ sung nữa là peonidin, petudin và malvidin. Các isoflavone thường được gọi là β -glucoside và có vòng B ở vị trí 3. Các hợp chất này có hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Genistein và daidzein là hai isoflavone chính của đậu tương, có tác dụng chính là ức chế quá trình peroxy hóa lipid [179].

Flavonoid có mặt trong tất cả các bộ phận của các loài thực vật bậc cao, đặc biệt là hoa, tạo cho hoa những sắc màu rực rỡ để quyến rũ các loại côn trùng giúp

cho sự thụ phấn của cây. Trong cây, flavonoid giữ vai trò là chất bảo vệ, chống oxy hóa, bảo tồn axit ascorbic trong tế bào, ngăn cản một số tác nhân gây hại cho cây, một số còn có tác dụng điều hòa sự sinh trưởng của thực vật [5]. Hàm lượng flavonoid trong thực vật thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố như loài, cơ quan, giai đoạn phát triển và điều kiện môi trường [28]. Ngoài ra, flavonoid cũng là một nhóm hoạt chất lớn trong cây dược liệu, các vị thuốc nam, các đồ uống cổ truyền. Những năm gần đây, flavonoid là một trong những hợp chất được đặc biệt quan tâm bởi các kết quả nghiên cứu cho thấy flavonoid có tác dụng to lớn đối với sức khỏe con người, trong đó tác dụng nổi bật là khả năng chống oxy hóa mạnh [5]. Theo Vũ Đức Lợi, flavonoid thuộc nhóm chất quercetin của các loài thuộc chi *Aconitum* gồm 19 hợp chất và thuộc nhóm chất kaempferol có 13 hợp chất [12].

1.3.1.2. Vai trò của flavonoid

Vai trò của flavonoid đối với thực vật

Flavonoid có chức năng quan trọng trong việc bảo vệ thực vật, chúng có thể ức chế sự phát triển của các đối thủ cạnh tranh. Flavonoid cũng có thể hoạt động như các hợp chất báo hiệu cho vi khuẩn [42]. Trong thực vật, flavonoid hoạt động như chất chống oxy hóa để loại bỏ các gốc tự do và hỗ trợ tăng trưởng và phát triển của cơ thể; một số flavonoid tham gia vào quá trình bảo vệ, chống lại các loài vi khuẩn gây bệnh [5].

Flavonoid từ lâu đã được báo cáo với nhiều chức năng trong thực vật, như tăng khả năng kháng stress oxy hóa. Quá trình sinh tổng hợp flavonoid trong thực vật hầu như chỉ được tăng cường do stress oxy hóa [83]. Các nhóm hydroxyl phản ứng mạnh nhất (7-OH của flavon hoặc 3-OH của flavonoid) trong flavonoid thường được glycosyl hóa. Glycosyl hóa làm tăng khả năng hòa tan của flavonoid trong môi trường nước của tế bào, bảo vệ các nhóm hydroxyl phản ứng khỏi quá trình tự oxy hóa, và cho phép vận chuyển các flavonoid từ lưới nội chất đến các ngăn tế bào khác nhau và bài tiết của chúng vào màng sinh chất và thành tế bào [83]. Khi gặp áp lực ánh sáng cao, việc loại bỏ các ROS (reactive oxygen species) và tác dụng chống oxy

hóa của flavonoid giúp cây có thể thích nghi và tồn tại [181]. Flavonoid còn là các chất chống oxy hóa, loại bỏ các gốc tự do và các kim loại độc hại cho cây. Ở thực vật bậc cao, flavonoid và các dẫn xuất phenylpropanoid khác (như este sinapate) tích tụ với số lượng lớn trong không bào của tế bào biểu bì, làm giảm hiệu quả thành phần tia cực tím của ánh sáng mặt trời với những ảnh hưởng tối thiểu đến vùng nhìn thấy của quang phổ [51]. Các flavonoid hoạt động như các phân tử tín hiệu trong sự cộng sinh giữa vi sinh vật và thực vật. Isoflavone là chất kích hoạt hoạt động của vi khuẩn cộng sinh tăng khả năng cố định đạm ở các loài cây họ Đậu [62]. Các flavonoid, chẳng hạn như luteolin và chrysin được tiết ra từ cây họ Đậu, như một tín hiệu để vi khuẩn *Rhizobium* bắt đầu cộng sinh với rễ cây họ đậu. Naringenin có thể kích thích sự xâm chiếm rễ lúa mì của *Azorhizobium caulinodans* [108]. Flavonoid cũng hoạt động như phytoalexin, hợp chất kháng khuẩn được tổng hợp tại vị trí nhiễm trùng để phản ứng lại sự tấn công của vi sinh vật. Ở Lúa và Cao lương, chúng góp phần kháng lại nấm *Magnaporthe grisea* và *Colletotrichum* spp. [68]. Các flavonoid cũng rất quan trọng trong việc hình thành mối quan hệ cộng sinh giữa thực vật và nấm ở các mô vỏ của rễ. Sự sinh tổng hợp flavonoid tăng cao trong quá trình phát triển nấm rễ được tìm thấy ở Cỏ ba lá trắng (*Trifolium repens*), rễ Mướp và *Medicago truncatula*. Sự hình thành nấm rễ đã thay đổi thành phần flavonoid trong chất chiết xuất từ rễ bằng cách sửa đổi sự biểu hiện của các gen liên quan đến sinh tổng hợp phenylpropanoid. Các flavonoid như quercetin, quercetin galactoside và kaempferol, có tác động tích cực đến sự phát triển của sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử nấm rễ. Rutin được tìm thấy trong cây Bạch đàn xanh (*Eucalyptus globulus* spp. Bicosata) có vai trò thúc đẩy sợi nấm *Pisolithus* sp. phát triển [108].

Các sắc tố tạo màu cho hầu hết các loại hoa, quả và hạt là flavonoid. Flavonoid được tổng hợp trong tất cả các bộ phận của cây, vai trò tạo màu sắc, hương thơm và mùi vị cho quả, hoa và hạt, khiến chúng trở thành chất hấp dẫn côn trùng, chim hoặc động vật có vú, giúp truyền phấn hoa hoặc phát tán hạt giống [108]. Anthocyanin là các phân tử tạo ra màu sắc cho hoa để thu hút côn trùng thụ phấn qua đó giữ vai trò trong sự sinh sản của cây. Trên thực tế, màu sắc của hoa cung cấp các

dấu hiệu thị giác dẫn dắt các loài thụ phấn đến những bông hoa chứa đầy mật hoa và thu hút các chất phát tán hạt vào quả chín [40]. Proanthocyanidine (PA), một loại polyme flavonoid được tạo ra từ sự ngưng tụ của các đơn vị flavan-3-ol, được liên kết với lớp vỏ hạt màu nâu. Chúng hỗ trợ bảo vệ các mô thực vật, để duy trì trạng thái ngủ cũng như tuổi thọ của hạt trong quá trình bảo quản [92].

Flavonoid đóng một vai trò quan trọng trong việc bảo vệ thực vật chống lại côn trùng ăn thực vật và động vật ăn cỏ. Mặc dù các hợp chất flavonoid có thể hoạt động như chất dẫn dụ hoặc chất kích thích ăn/tăng trưởng đối với một số loài côn trùng nhất định, nhưng chúng có liên quan cao đối với cơ chế bảo vệ thực vật. Sự hiện diện của flavonoid trong thực vật có thể làm giảm giá trị dinh dưỡng, giảm khả năng tiêu hóa hoặc thậm chí hoạt động như chất độc đối với côn trùng. Một nghiên cứu về hỗn hợp flavonoid từ cây *Cistus ladanifer* thuộc họ Hoa hồng đá có chứa apigenin và 3,7-di-O-methylkaempferol đã được chứng minh rằng chúng có thể ảnh hưởng đến ATPase phụ thuộc canxi trong lưới cơ xương và dẫn đến suy giảm khả năng giãn cơ [140]. Một số flavonoid phản ứng với côn trùng, ví dụ, vitexin trong lá cây Mồng tơi (*Basella alba*) ức chế sự phát triển của ấu trùng *Spodoptera litura* [143] và schaftoside ức chế sự phát triển của rầy nâu bằng cách tương tác với protein kinase 1 phụ thuộc cyclin nội sinh [60]. Một số loài côn trùng đã được chứng minh là nhạy cảm với các hợp chất flavonoid trong các thử nghiệm cho ăn. Rutin và quercetin-3-glucoside có trong loài *Pinus bankiana* thuộc họ Thông kìm hãm sự phát triển và tăng tỷ lệ chết của côn trùng Bướm đêm (*Lymantria dispar*). Các nghiên cứu trên Đậu phộng cho thấy lượng glycoside quercetin và rutin có liên quan đến việc tăng tỷ lệ chết của sâu Vẽ bùa (*Spodoptera litura*) [102].

Flavonoid rất quan trọng trong việc chống lại vi khuẩn và nấm gây bệnh cho cây trồng. Tác dụng chống lại mầm bệnh của flavonoid phụ thuộc vào cấu trúc của chúng. Các hợp chất flavonoid được vận chuyển đến vị trí nhiễm bệnh và tạo ra phản ứng, đây là cơ chế bảo vệ sớm nhất mà cây nhiễm bệnh sử dụng và làm chết tế bào theo chương trình. Flavonoid có thể góp phần thắt chặt các cấu trúc và mô thực vật bằng cách điều chỉnh hoạt động của auxin (IAA), có thể dẫn đến sự khác biệt của các mô, thúc đẩy sự hình thành mô sẹo và đóng hệ thống mạch để ngăn ngừa sự lây

nhiễm mầm bệnh. Chúng cũng có thể tham gia trực tiếp vào việc ức chế các enzyme của mầm bệnh, đặc biệt là các enzyme tiêu hóa thành tế bào thực vật, bằng cách tạo ion hóa các kim loại cần thiết cho hoạt động của chúng [149]. Vòng B của flavonoid có thể xen kẽ hoặc hình thành liên kết hydro với sự xếp chồng của các gốc axit nucleic và tiếp tục dẫn đến sự ức chế tổng hợp DNA và RNA ở vi khuẩn và ảnh hưởng đến hoạt động của DNA gyrase [166]. Các nghiên cứu trên Lúa mạch đột biến cho thấy proanthocyanidin hoặc thậm chí một lượng nhỏ dihydroquercetin có liên quan đến việc bảo vệ chống lại nấm *Fusarium* sp. Điều này có thể xuất phát từ một số cơ chế hoạt động, liên quan đến liên kết chéo của các enzyme vi sinh vật, ức chế cellulase của mầm bệnh, xylanase và pectinase, loại bỏ các ion kim loại liên quan đến hoạt động của enzyme hoặc thắt chặt thành tế bào, dẫn đến hình thành hàng rào vật lý chống lại sự tấn công của mầm bệnh [108]. Flavonoid cũng có thể điều chỉnh hoạt động của IAA-oxidase, với các tác dụng khác nhau tùy thuộc vào cấu trúc hóa học của chúng [108]. Flavonoid sunfat tham gia sự ức chế dòng chảy auxin do quercetin gây ra. Do đó, quercetin 3-sulphat sẽ kích thích sự vận chuyển auxin từ các mô đỉnh [145].

Bên cạnh các chức năng bảo vệ, flavonoid có thể làm tăng sự sẵn có của các nguyên tố dinh dưỡng. Trong thời kỳ có ít dinh dưỡng, flavonoid được giải phóng vào đất, nơi chúng có thể liên kết các kim loại cần thiết cho sự phát triển của cây. Isoflavonoid được bài tiết bởi rễ Cỏ linh lăng (*Medicago sativa*) làm tăng các cation sắt và anion phosphat. Genistein, quercetin và kaempferol khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} từ các oxit sắt [41].

Vai trò của flavonoid đối với con người

Flavonoid là một loại chất chống oxy hóa có nhiều trong chế độ ăn uống của con người và phổ biến trong thực vật. Các nghiên cứu về flavonoid từ chế độ ăn uống đã thu hút sự quan tâm lớn vì các hoạt tính sinh học của chúng như hoạt tính chống oxy hóa, hoạt động ức chế enzyme, hoạt động chống khối u... Hầu hết các hoạt tính sinh học của chúng về cơ bản liên quan đến khả năng chống oxy hóa. Sự khác biệt về cấu trúc của flavonoid ảnh hưởng đáng kể đến sự hấp thụ, chuyển hóa và hoạt động trong cơ thể sống [144]. Vai trò của flavonoid đối với con người được

thể hiện ở hoạt động chống oxy hóa [42], bảo vệ gan [182], hoạt tính kháng khuẩn [148], chống viêm [107], chống ung thư [21] và kháng virus [180].

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...) do đó không tham gia vào dây chuyền phản ứng oxy hóa tiếp theo. 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 [21]. Silymarin là một flavonoid có ba thành phần cấu trúc silibinin, silydianine và silychristine được chiết xuất từ hạt và quả của cây Kế sữa (*Silybum marianum*). Silymarin đã được báo cáo là tăng cường tổng hợp RNA ribosom và tăng sinh tế bào giúp tái tạo gan ở những phân gan bị tổn thương. Silymarin làm tăng sinh các tế bào gan để đáp ứng với FB1 (Fumonisin B1, một loại độc tố được tạo ra bởi nấm mốc *Fusarium verticillioides*) gây ra chết tế bào mà không điều chỉnh sự tăng sinh tế bào ở gan bình thường. Các đặc tính dược lý của silymarin liên quan đến tính thấm của màng tế bào, sự ức chế leukotrien, thu nhận oxy phản ứng, bất hoạt kinase protein, và sản xuất collagen [63]. Silymarin có ứng dụng lâm sàng trong điều trị xơ gan, tổn thương do thiếu máu cục bộ và viêm gan nhiễm độc do các chất độc khác nhau gây ra [134]. Một số flavonoid bao gồm apigenin, galangin, flavone, flavonol glycoside, isoflavone, flavanone và chalcone đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn mạnh [148]. Chúng có khả năng kháng nhiều loại vi khuẩn khác nhau như *E. coli*, *Salmonella typhi*, *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 [83]. Apigenin thuộc phân họ Flavones thường được phân lập nhiều nhất từ họ Cúc có hoạt tính chống lại HSV-1, poliovirus loại 2 và virus viêm gan C [73]. Tương tự, apigenin được phân lập từ cây Húng quế ngọt (*Ocimum basilicum*) cho thấy có hoạt tính kháng virus mạnh đối với adenovirus (ADV) và virus viêm gan B [91]. Một số flavonoid là chất ức chế sản xuất prostaglandin và leukotrien thông qua ức chế enzyme cyclooxygenase lipooxygenase,

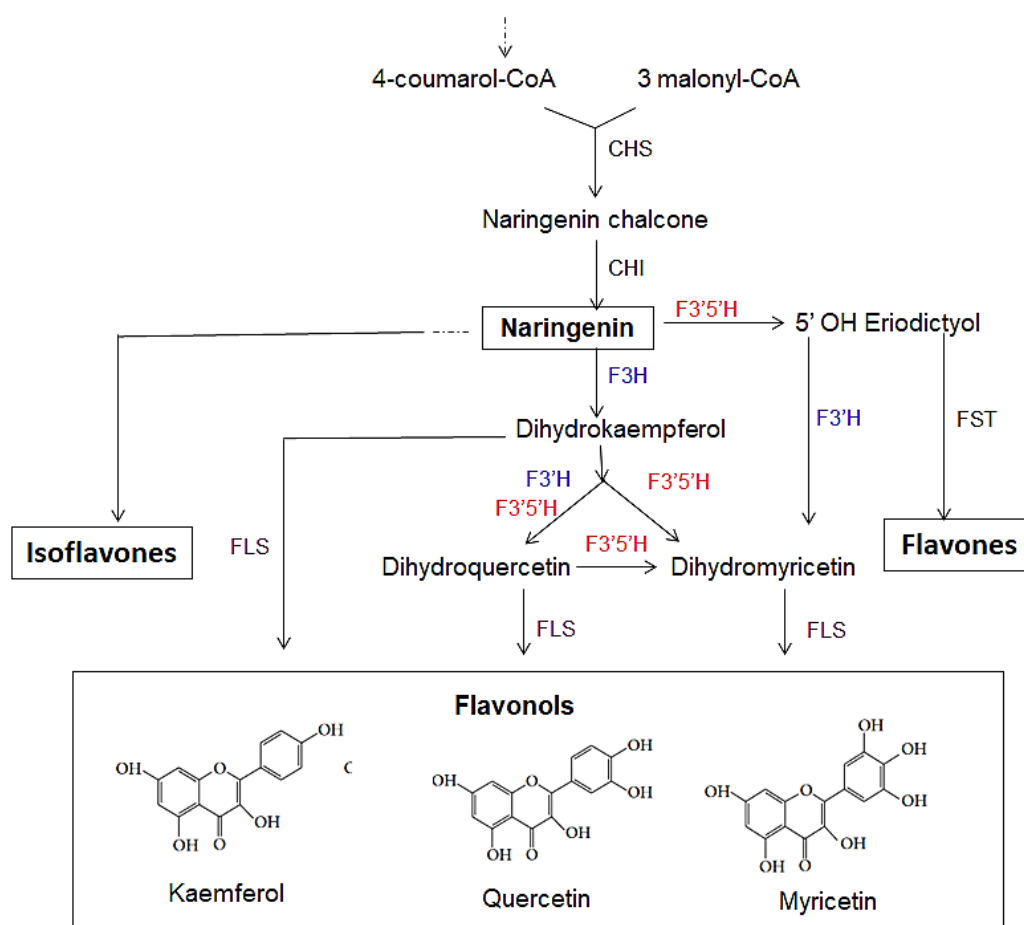
do đó làm giảm các triệu chứng viêm [83]. Gần đây, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng một số phân lớp flavonoid có khả năng làm giảm nguy cơ mắc các loại ung thư khác nhau, chẳng hạn như catechin và flavonols đối với ung thư tuyến tiền liệt, epicatechin đối với ung thư vú, proanthocyanidins đối với ung thư phổi, flavon đối với ung thư đại trực tràng và flavonoid tổng số đối với ung thư dạ dày [124]

Tóm lại, flavonoid là hợp chất hoá học phổ biến ở thực vật đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ và nâng cao sức khoẻ con người. Flavonoid có ở tất cả các bộ phận của cây, chúng là nguồn cung cấp chất chống oxy hoá tự nhiên có trong khẩu phần ăn của con người. Flavonoid nói chung có vai trò phòng ngừa oxy hóa chất béo, bảo vệ vitamin và enzyme, làm trung hòa tác hại của các gốc tự do, do đó góp phần chống lại bệnh. Flavonoid có các tính chất sinh học phong phú do đó tăng cường sức khoẻ cho con người và giảm nguy cơ mắc bệnh.

1.3.2. Con đường tổng hợp flavonoid ở thực vật

Flavonoid (đặc biệt là anthocyanin và proanthocyanidins) được tổng hợp theo con đường phenylpropanoid nói chung nhờ hoạt động của phức hợp đa enzyme cytosolic, còn được gọi là chất chuyển hóa flavonoid, liên kết lỏng lẻo với mặt tế bào chất của mạng nội chất (ER). Đặc biệt, một số enzyme này thuộc họ Cytochrome-P450 và có khả năng liên kết với màng. Mặt khác, một số enzyme tham gia vào con đường sinh tổng hợp được liên kết lỏng lẻo với màng của các bào quan khác nhau, chẳng hạn như không bào, plastid và nhân [117].

Con đường sinh tổng hợp flavonoid (Hình 1.3) bao gồm sự hình thành lõi (ion flavylum), bộ xương cơ bản của tất cả các flavonoid, bắt đầu từ ba phân tử malonyl-CoA và 4-coumaroyl-CoA. CHS chalcone synthase (CHS) và chalcone isomerase (CHI) là các enzyme tham gia vào quá trình ngưng tụ hai bước, tạo ra một flavanone không màu có tên naringenin. Quá trình oxy hóa hợp chất thứ hai bởi flavanone 3-hydroxylase (F3H) tạo ra dihydrokaempferol (dihydroflavonol không màu) mà sau đó có thể được hydroxyl hóa ở vị trí 3' hoặc 5' của vòng B, bởi F3'H hoặc flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H) để tạo ra dihydroquercetin hoặc dihydromyricetin.



Hình 1.3. Con đường sinh tổng hợp flavonoid ở thực vật (được vẽ lại từ Zabala và cs, 2006 [53]; Czempler và cs, 2009 [126]). CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; FST, flavonol 4-sulfotransferase.

Naringenin cũng có thể được hydroxyl hóa trực tiếp bởi F3'H hoặc F3'5'H để tạo thành các chất tương ứng là eriodictyol và pentahydroxy-flavanone, chúng lại được hydroxyl hóa thành dihydroquercetin và dihydromyricetin. Ba dihydroflavonols được tổng hợp sau đó được chuyển thành anthocyanidins (chất màu có màu nhưng không ổn định) bằng hai phản ứng được xúc tác bởi dihydroflavonol reductase (DFR) và leucoanthocyanidin oxidase (LDOX). DFR chuyển đổi dihydroquercetin, dihydrokaempferol và dihydromyricetin thành leucocyanidin, leucopelargonidin và leucodelphinidin (flavan-3,4-cis-diols không màu), tương ứng. Sau đó, LDOX xúc tác

quá trình oxy hóa leucocyanidin, leucopelargonidin và leucodelphinidin thành cyanidin (anthocyanidin đỏ - đỏ tươi), pelargonidin (anthocyanidin màu cam) và delphinidin (anthocyanidin màu tím hoa cà), tương ứng. Bước cuối cùng để sản xuất các hợp chất có màu và ổn định (anthocyanin) bao gồm quá trình glycosyl hóa cyanidin, pelargonidin và delphinidin bởi enzym UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase (UFGT). Cuối cùng, chỉ cyanidin-3-glucoside và delphinidin-3-glucoside có thể được metyl hóa thêm bởi methyltransferase (MTs), để được chuyển đổi thành peonidin-3-glucoside và petunidin- hoặc malvidin-3-glucoside, tương ứng [117].

Các enzyme chính xúc tác cho các giai đoạn của con đường phenylpropanoid như: chalcone synthase, chalcone isomerase (CHI), flavanone-3-hydroxylase (F3H), flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H), UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase (UFGT), dihydroxyflavonol 4-reductase (DFR), leucoanthocyanidin oxygenase (LDOX) [86].

Chalcone synthase là enzyme xúc tác sự ngưng tụ lặp đi lặp lại và quá trình tuần hoàn nội phân tử tiếp theo của một p-coumaroyl-CoA với ba gốc axetat từ các phân tử malonyl-CoA để tạo thành chalcone [45]. Chalcone isomerase (CHI) hoặc chalcone-flavanone isomerase là enzyme chìa khóa cho sinh tổng hợp flavonoid bằng việc xúc tác cho phân tử naringenin chalcone mạch hở được đóng vòng để hình thành các naringenin. Sau đó, hợp chất này sẽ được chuyển hóa thành nhiều loại flavonoid chính như: flavanone, flavonol và anthocyanin [45].

Flavanone-3-hydroxylase (F3H) là một enzyme quan trọng giữ vị trí đầu tiên của nhánh tổng hợp flavonol bằng cách chuyển đổi flavanone (2S)-naringenin thành (2R, 3R)-dihydrokaempferol và (2S)-eriodictyol thành (2R, 3R)-dihydroquercetin [86]. F3'H và F3'5'H lần lượt xúc tác quá trình hydroxyl hóa vị trí C3' và C3'/C5' của dihydrokaempferol [176]. Dihydroxyflavonol 4-reductase (DFR) xúc tác quá trình khử dihydroflavonols thành leucoanthocyanidin, chúng tiếp tục được chuyển thành anthocyanidin bởi leucoanthocyanidin dioxygenase/anthocyanidin tổng hợp (LDOX/ANS) [176]. Leucoanthocyanidin oxygenase (LDOX) có vai trò xúc tác chuyển đổi leucoanthocyanidin không màu để tạo anthocyanidin có màu. Trong sinh

tổng hợp anthocyanin ở thực vật, đây là bước quan trọng quy định sự hình thành các chất chuyển hóa có màu [45].

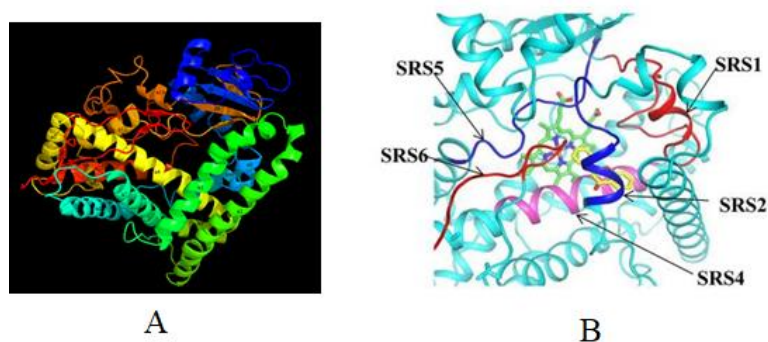
UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase (UGFT) tham gia vào bước cuối trong quá trình sinh tổng hợp anthocyanin, chuyển gốc glucosyl từ UDP-glucose thành nhóm 3-hydroxyl của các phân tử nhận trong phản ứng xúc tác glucosyltransferase [111].

Trong con đường sinh tổng hợp flavonoid, kiểu hydroxyl hóa của vòng B được xác định bởi hai monooxygenase phụ thuộc cytochrome P450 (P450): flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) và flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H). Hydroxyl hóa vị trí 5' bởi F3'5'H là một bước đặc biệt quan trọng, xác định sản phẩm cuối cùng tri-hydroxyl flavonoid vòng B (EGCG hoặc delphinidin) được hình thành trong thực vật [178].

1.3.3. Enzyme flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H)

Flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H) là một protein enzyme, gồm 506 amino acid, được phân lập từ hầu hết các loài thực vật bậc cao. F3'5'H có cấu trúc gồm 18 chuỗi xoắn α và 9 phiến gấp β [124]. Cấu trúc tổng thể của F3'5'H của cây *Aconitum carmichaelii* Debx. giống như một bó hoa lộn ngược với một phiến gấp β lớn được tạo nên bởi năm phiến gấp β nhỏ đó là $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$, $\beta 9$ và mười tám chuỗi α ($\alpha 1$ - $\alpha 18$) đóng vai trò là lõi enzyme. Hai phiến gấp β nhỏ ($\beta 3$, $\beta 4$) ở phía đối diện của tám β lớn, nối tiếp phiến gấp $\beta 3$ là phiến gấp $\beta 2$ và nối tiếp phiến gấp $\beta 4$ là phiến gấp $\beta 1$ (Hình 1.4).

F3'5'H là một enzyme cytochrome P450 chứa heme (Fe^{3+}) hydroxylat hóa các vị trí 3' và 5' của vòng β của naringenin hoặc dihydrokaempferol, sau đó dẫn đến sự hình thành các sắc tố anthocyanin dựa trên delphinidin. Sáu vị trí nhận biết cơ chất chức năng (SRS) gần nhóm heme được bảo tồn trong các enzyme F3'5'H là cần thiết cho tính đặc hiệu của cơ chất và các hoạt động 3'5'-hydroxylase. Nhóm heme của F3'5'H chịu trách nhiệm cho phản ứng xúc tác được bao quanh bởi các vùng SRS được chỉ định. Độ biến của các amino acid riêng lẻ tại các vị trí SRS này có thể ảnh hưởng đến chức năng của enzyme [139].



Hình 1.4. Cấu trúc không gian và vị trí hoạt động của F3'5'H. A: Cấu trúc không gian của protein F3'5'H được thiết lập từ trình tự amino acid của protein F3'5'H mang mã số AEY80043.1 trên GenBank với ID: 148b1295a36759eb và của protein suy diễn từ gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang với ID: b46952f11eae6b43. B: Cấu trúc không gian của vị trí hoạt động F3'5'H bao gồm các miền SRS, heme (xanh lá cây) và flavone (vàng)

Menting và cs (1994) khi nghiên cứu đặc điểm enzyme F3'5'H ở cây Dạ yến thảo (*Petunia hybrid*) đã cho thấy, F3'5'H hoạt động phụ thuộc vào NADPH và oxy phân tử, phụ thuộc ít vào NADH. Enzyme F3'5'H xúc tác quá trình hydroxyl hóa 5,7,4'-trihydroxyflavonone ở vị trí 3' và 5', xúc tác quá trình hydroxyl hóa 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonone và dihydroquercetin ở vị trí 5'. Hoạt động hydroxylase bị ức chế bởi các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (1-aminobenzotriazole và tetcyclacis), CO, N-ethylmaleimide, diethyldithiocarbamate, và cytochrome c. Hoạt tính enzyme không bị ảnh hưởng bởi diethylpyrocarbonate hoặc phenylmethanolsulfonyl fluoride, nhưng được tăng cường bởi 2-mercaptoethanol [106]. Wang và cs (2014) đã chỉ ra rằng F3'5'H là enzyme quan trọng trong tổng hợp flavan-3-ol và xúc tác cho sự chuyển đổi của flavon, flavanone, dehydroflavonols, flavonol thành các dẫn xuất 3',4,5-hydroxylated ở cây trà [178].

1.3.4. Biểu hiện gen mã hóa flavonoid 3'5' hydroxylase

1.3.4.1. Gen mã hóa flavonoid 3'5' hydroxylase

Alexander và cs (2019) đã phân lập gen *F3'5'H* từ cây Lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.), kết quả xác định được 4 gen *F3'5'H* đó là *F3'5'H1*, *F3'5'H2*, *F3'5'H3*, *F3'5'H4* có kích thước 2209 bp nằm trên nhiễm sắc thể 1HL, 6HL, 6HS và 7 HS tương ứng. Trong đó, gen *F3'5'H1* có 3 exon còn các gen *F3'5'H2*, *F3'5'H3*, *F3'5'H4* đều có 2 exon. Gen *F3'5'H1* có chuỗi amino acid suy diễn tương đồng cao 97,1% với *F3'5'H* của các cây không phải cùng loài nhưng có mức độ tương đồng thấp 82,6%, 83,0%, 63,0% với *F3'5'H2*, *F3'5'H3* và *F3'5'H4* tương ứng [159]. Wang và cs (2014) đã phân lập gen *CsF3'5'H* từ mRNA của cây Trà (*Camellia sinensis*) có kích thước 1533 bp mã hóa cho 510 amino acid và so sánh phát sinh loài cho thấy *CsF3'5'H* thuộc phân họ CYP75A [178]. Gen *F3'5'H* của Cà chua được Olsen và cs (2010) nhân bản và giải trình tự được đặt tên là *CYP75A31* có kích thước 3133 bp bao gồm 3 exon và 2 intron. Cây phát sinh loài cho thấy *CYP75A31* thuộc phân họ CYP75A và có quan hệ gần với cây Khoai tây và cây Cà tím thuộc chi *Solanum* [82]. Wu và cs (2020) đã phân lập gen *GbF3'5'H1* của cây Bạch quả (*Ginkgo biloba* L.) có kích thước là 1959 bp, chứa khung đọc mở (ORF) là 1527 bp, mã hóa 509 amino acid, với 2 exon và 1 intron. Protein GbF3'5'H1 chứa 48,92% xoắn alpha, trong đó 35,36% là cuộn ngẫu nhiên, 10,61% là sợi kéo dài và 5,11% là vòng beta [170]. Trong ngân hàng gen quốc tế (GenBank) trình tự gen *F3'5'H* phân lập từ mRNA của cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) đã được Ma và cs công bố năm 2012 có kích thước 1720 bp, mã hóa cho 506 amino acid, mã số trên NCBI là JN635708 [89].

F3'5'H là gen đích thông dụng nhất cho sự điều khiển quá trình sinh tổng hợp anthocyanin. Zifkin M và cs (2012) nghiên cứu các gen có liên quan đến sinh tổng hợp flavonoid và điều khiển quá trình chín của quả Việt quất đã chỉ ra rằng enzyme *F3'5'H* do gen *F3'5'H* quy định là enzyme chìa khóa trong cả hai quá trình trên [97]. Carol Moreau và cs (2012) cho rằng anthocyanins là các sắc tố chính trong cây Đậu (*Pisum sativum*). Chúng được tạo ra thông qua quá trình sinh tổng hợp flavonoid do gen *F3'5'H* điều khiển. Để kiểm tra giả định của mình Carol Moreau và cs đã tiến hành gây đột biến gen *F3'5'H* sau đó kiểm tra các dòng mang gen đột biến. Kết quả cho thấy, ở những dòng cây mang gen đột biến thiếu quá trình sinh tổng hợp

delphinidin và petunidin, các sắc tố chính trong cây. Điều này chứng tỏ *F3'5'H* có giá trị quan trọng trong sinh tổng hợp anthocyanin dẫn đến sự thay đổi các sắc tố trong loài cây họ Đậu [109]. Khi nghiên cứu về loài thảo dược Dâm dương hoắc lá mác (*Epimedium sagittatum*), Huang và cs (2012) đã thấy rằng flavonoid là thành phần có hoạt tính sinh học chính trong các loài thảo dược này, trong đó hai gen *F3'H* và *F3'5'H* quy định chính cho quá trình sinh tổng hợp các thành phần hoạt tính sinh học trong Dâm dương hoắc lá mác [161]. Olsen KM và cs (2010) đã nghiên cứu cây Dạ yến thảo và cây Khoai tây cho thấy *F3'5'H* là enzyme chức năng quan trọng trong quá trình tổng hợp flavonol và anthocyanin do gen *F3'5'H* quy định [82]. Một nghiên cứu khác của Liu và cs (2015) cũng cho thấy gen *F3'5'H* có liên quan mật thiết đến quá trình tổng hợp catechin thông qua con đường phenylpropanoid, nó làm ảnh hưởng đến sự tích lũy catechin trong cây Trà [95]. Như vậy, có thể thấy rằng gen *F3'5'H* và enzyme *F3'5'H* có chức năng quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp anthocyanin, delphinidin và quyết định sắc tố ở cây.

1.3.4.2. Nghiên cứu biểu hiện gen *F3'5'H* ở thực vật

Gen *F3'5'H* đã được các nhà khoa học phân lập và tiến hành chuyển vào một số loài thực vật để nghiên cứu sự biểu hiện của gen chuyển trong cây trồng. Ishiguro và cs (2012) đã phân lập các gen *F3'H* và *F3'5'H* từ thư viện cDNA của loài hoa Mồ chó (*Antirrhinum kelloggii*), và phân tích biểu hiện ở cây Dạ yến thảo chuyển gen cho thấy rằng sự biểu hiện của các gen này làm tăng hàm lượng cyanidin và delphinidin cũng như anthocyanidin. Sự gia tăng tích lũy anthocyanidin cũng làm thay đổi màu hoa ở cây chuyển gen [77].

Theo hướng phân tích về sự biểu hiện quá mức của gen *F3'5'H*, Wu và cs (2020) cho thấy rằng gen *GbF3'5'H1* trong cây Bạch quả (*G. biloba* L.) có chức năng trong quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa liên quan đến flavonoid và sự biểu hiện quá mức của gen *GbF3'5'H1* đã làm tăng hàm lượng 4',5-dihydroxy-7-glucosyloxyflavanone, epicatechin và galocatechin trong cây chuyển gen cao hơn đáng kể so với cây không chuyển gen [170]. Murray R Boase và cs (2010) đã phân

lập gen *cpF3'5'H* từ mô giống hoa Anh thảo. Phân tích amino acid và phát sinh học chỉ ra *cpF3'5'H* mã hóa cho enzyme F3'5'H. Khi chuyển gen mang cấu trúc *cpF3'5'H* vào hoa Anh thảo đã thấy có sự thay đổi nồng độ flavonoid được tích lũy trong cây. Cụ thể, hàm lượng anthocyanin giảm 80% và có sự gia tăng nhỏ trong hàm lượng flavonoid trong các dòng chuyển gen [37]. Chandler SF và cs (2013) đã chuyển *F3'5'H* vào hoa Cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus*), kết quả đã làm thay đổi màu sắc của hoa do *F3'5'H* điều chỉnh tăng quá trình tăng tích lũy anthocyanin và delphinidin ở cánh hoa [136]. Tương tự, ở cây Trà (*Camellia sinensis* L.), phân tích biểu hiện gen *F3'H* và *F3'5'H* của Wei và cs (2015) cho thấy bốn gen *F3'H* và *F3'5'H* chính (bao gồm *CsF3'5'H1*, *CsF3'H1*, *CsF3'H2* và *CsF3'H3*) có tương quan chặt chẽ với tỷ lệ dihydroxyl hóa thành catechin trihydroxyl hóa [78]. Castellarin và cs (2000) báo cáo rằng sự biểu hiện của *F3'5'H* ảnh hưởng trực tiếp đến sự tích tụ của các anthocyanin và delphinidin trong vỏ quả mọng của Nho, xác định sự biến đổi màu sắc giữa các giống nho. *F3'5'H* biểu hiện mạnh khi quả chuyển sang giai đoạn chín chuyển từ màu xanh sang màu đỏ, cụ thể sự tích lũy delphinidin trong vỏ quả tăng gấp 50 lần [135].

Một số công trình nghiên cứu chức năng sinh học của *F3'5'H* ở một số loài thực vật bằng kỹ thuật biểu hiện gen đã được công bố. Ở cây Cỏ tranh (*Pericallis × hybrida*) thuộc họ Cúc, Sun và cs (2013) đã phân lập gen *F3'5'H* và chuyển vào cây Thuộc lá. Sự biểu hiện của gen chuyển *F3'5'H* trong cây Thuộc lá chuyển gen làm tăng hàm lượng các dẫn xuất cyanidin và dẫn đến màu hoa chuyển xanh và đỏ ở cây thế hệ T0 [169]. Che Yu Liang và cs (2020) đã chuyển đồng thời *DgF3'5'H* và *PeMYB2* (phân lập từ lan *Delphinium grandiflorum*) vào lan Hồ điệp trắng (*Phalaenopsis Sogo Yukidian V3*). Sự biểu hiện quá mức của *DgF3'5'H* và *PeMYB2* trong lan Hồ điệp trắng gây ra sự tích tụ delphinidin cao nhất (tăng 53,6%) và màu hoa chuyển từ trắng sang xanh tím [93]. Yun Sheng Wang và cs (2014) đã phân lập *CsF3'5'H* từ hệ gen của cây Trà (*C. sinensis*) và chuyển vào cây Thuộc lá. Sự biểu hiện quá mức của *CsF3'5'H* đã tạo ra các dẫn xuất

delphinidin mới và làm tăng hàm lượng dẫn xuất cyanidin của cây Thuộc lá chuyển gen, dẫn đến màu hoa của cây chuyển gen đậm hơn [178].

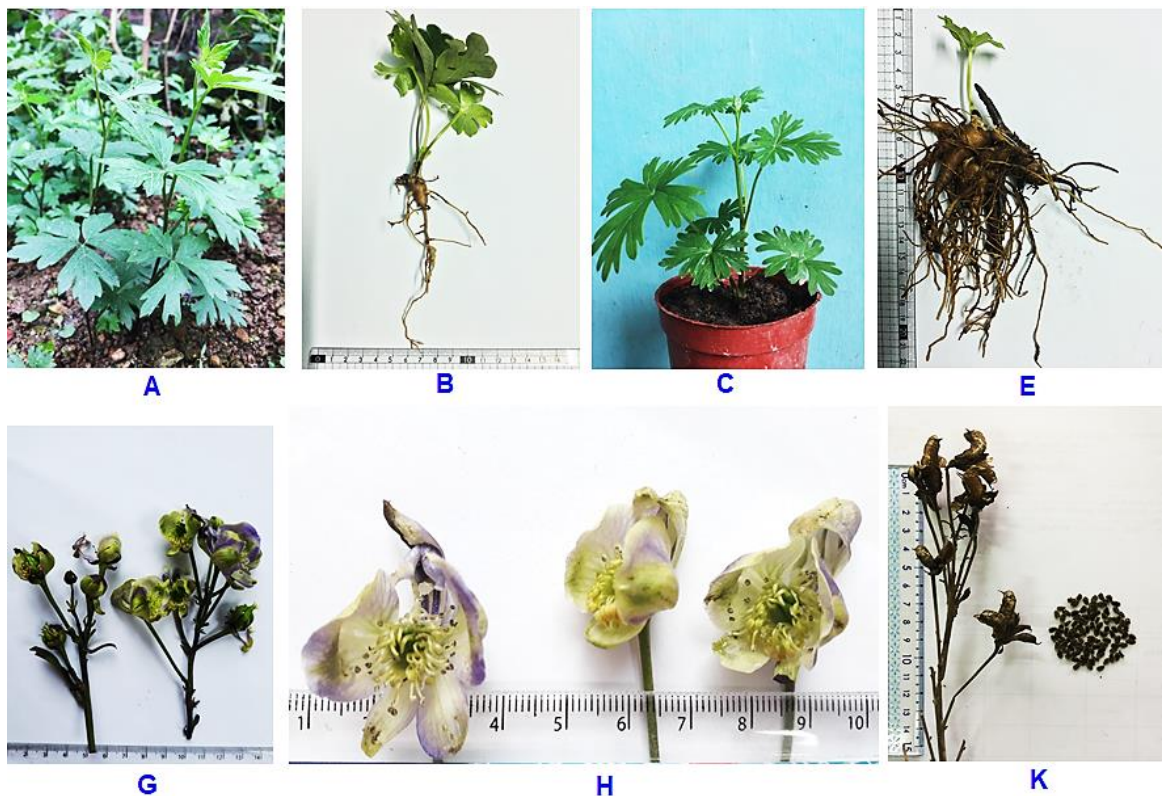
Tuy nhiên, nghiên cứu biểu hiện các gen mã hóa enzyme liên quan đến tổng hợp flavonoid, trong đó có *F3'5'H* của cây Ô đầu còn rất mới mẻ và cho đến nay chưa tìm thấy công bố nào về phân tích biểu hiện *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Củ Ô đầu được thu thập từ tỉnh Hà Giang, được trồng tại Vườn thực nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên (Hình 2.1) để định danh loài, tách chiết DNA và làm nguyên liệu nuôi cấy *in vitro*.



Hình 2.1. Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) thu từ tỉnh Hà Giang, được trồng tại Vườn thực nghiệm. A: Cây Ô đầu trồng tại vườn thí nghiệm; B: Cây Ô đầu non; C: Cây Ô đầu trồng trong chậu; D: Cây Ô đầu trong chậu; E: Củ Ô đầu; F: Củ Ô đầu; G: Cành hoa Ô đầu; H: Cánh hoa, nhị và nhụy; I: Cánh hoa, nhị và nhụy; J: Cánh hoa, nhị và nhụy; K: Quả và hạt Ô đầu (Ảnh do tác giả chụp).

Giống Thuốc lá K326 (*Nicotiana tabacum*) *in vitro* được lưu giữ tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên được sử dụng trong chuyển gen và phân tích biểu hiện gen trên cây Thuốc lá.

Các vector và chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp, bao gồm: vector tách dòng pBT, vector pRTRA7/3 chứa promoter 35S và đuôi cmyc, vector chuyển gen pCB301; Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α sử dụng trong tách dòng, chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CV58 và *Agrobacterium rhizogens* ATTC 15834 sử dụng trong chuyển gen và chủng *A. tumefaciens* CV58 mang gen chuyển *uidA*.

Các cặp mồi PCR được sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các trình tự mồi sử dụng trong nghiên cứu

Cặp mồi	Trình tự nucleotide 5' → 3'	Kích thước đoạn DNA nhân bản dự kiến (bp)
<i>ITS-F/ITS-R</i>	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	630
	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	
<i>rpoC1-F/ rpoC1-R</i>	GTGGATACTTCTTGATAATGG	543
	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	
<i>rpoB2-F/ rpoB2-R</i>	AAGTGCATTGTTGGAAGTGG	471
	GATCCCAGCATCACAATTCC	
<i>matK-F/ matK-R</i>	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	822
	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	
<i>F3'5'H-NcoI- F/F3'5'H-NotI-R</i>	AGCCATGGATGTTGTCTACCAGAGAACTTG	1536
	TCGCTGCAGCGATCATTTTTTTCATT	
	ATGCGGCCGCGACTACATAAGCAGAGGGTG	
<i>F3'5'H-NcoI- F/F3'H-SacI-R</i>	AGCCATGGATGTTGTCTACCAGAGAACTTG	1611
	TCGCTGCAGCGATCATTTTTTTCATT	
	TAGAGCTCCGCTGATGTATTCGTCTCCCAC	

2.1.2. Hóa chất

Kít GeneEluteTM Total RNA Miniprep - tách chiết RNA tổng số; kít Maxima® First Strand cDNA Synthesis - tổng hợp cDNA; kít GenJET PCR

Purification - tinh sạch sản phẩm PCR; kit Plasmid Extraction - tách chiết plasmid từ vi khuẩn được mua từ hãng Fermentas và Bio-Neer. Các enzyme sử dụng được mua của hãng Fermentas gồm: *Bam*HI, *Not*I, *Nco*I, *Hind*III, *Sac*I, T4 ligase...

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.

2.1.3. Thiết bị

Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac300 (Bio-Rad, Mỹ), máy soi DNA (Mini-transillumination, Bio-Rad, Mỹ), máy Voltex (Mimishaker, IKA, Đức), máy ly tâm, máy xung điện Plulser, máy xác định hàm lượng nucleic acid NanoDrop, thiết bị giải trình tự nucleotide tự động ABI PRISM@ 3100 Advant Genetic Analyzer (Applied Biosystem), cùng với các thiết bị hiện đại khác.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các mẫu Ô đầu thu tại hai huyện Hoàng Su Phì và Quản Bạ (Hà Giang) được định danh loài trước khi sử dụng làm vật liệu cho tách dòng phân tử, nuôi cấy *in vitro* và biến nạp di truyền.

2.2.1. Nhóm phương pháp định danh loài Ô đầu

Các mẫu Ô đầu được định danh bằng phương pháp hình thái so sánh theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [7], Đỗ Tất Lợi (2005) [11] và trang web của Tropicos [183]. Đồng thời, các mẫu Ô đầu cũng được xác định bằng phương pháp phân loại học phân tử dựa trên mã vạch DNA với trình tự nucleotide của vùng *ITS* và đoạn gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB2*.

Phương pháp hình thái so sánh

Tại mỗi huyện, thu 5 cây Ô đầu non và thu củ của 5 cây Ô đầu 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 Ô đầu được quan sát trực tiếp và mô tả đặc

điểm rễ, thân lá, hoa, quả, hạt. Nhận diện mẫu cây Ô đầu theo mô tả của Phạm Hoàng Hộ (1999) [7], Đỗ Tất Lợi (2004) [11] và tra cứu trên trang web của Tropicos [135] 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

Phương pháp phân loại học phân tử dựa vào một số mã vạch DNA như vùng *ITS*, đoạn gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB2*. DNA tổng số được chiết xuất từ lá non của cây Ô đầu theo Saghai-Marooof và cs (1984) [101].

Trình tự nucleotide của các cặp mồi *matK-F/matK-R*, *ITS-F/ITS-R*, *rpoC1-F/rpoC1-R*, *rpoB2-F/rpoB2-R* sử dụng trong PCR được tổng hợp theo Kress và cs (2005) [164] được thể hiện ở bảng 2.1.

Chu trình nhiệt của PCR đối với hai cặp mồi *rpoC1-F/rpoC1-R* và *rpoB2-F/rpoB2-R* là 94°C trong 1 phút, lặp lại 35 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 53°C trong 40 giây và tổng hợp ở 72°C trong 40 giây; sau 35 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 phút, lưu giữ ở 4°C [164]. Chu trình nhiệt của PCR đối với cặp mồi *ITS-F/ITS-R* là 94°C trong 4 phút, lặp lại 35 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 57°C trong 60 giây và tổng hợp ở 72°C trong 60 giây; sau 35 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Chu trình nhiệt của PCR với cặp mồi *matK-F/matK-R* là 94°C trong 1 phút, lặp lại 35 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 53°C trong 40 giây và tổng hợp ở 72°C trong 40 giây; sau 35 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 phút.

Các sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di gel agarose 1,0% và được tinh sạch bằng cách sử dụng kit GenJET PCR Purification của hãng Fermentas. Các trình tự nucleotide của vùng *ITS* và đoạn gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB2* đã được giải trình tự và phân tích bằng BLAST trong NCBI [164]. 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 Maximum Likelihood trong phần mềm MEGA X [84].

2.2.2. Nhóm phương pháp nuôi cấy *in vitro* và cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro*

2.2.2.1. Phương pháp nghiên cứu hệ thống tái sinh *in vitro* phục vụ chuyển gen

Các thí nghiệm được đặt trong phòng nuôi cây ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng 2000 lux, độ ẩm 60-80%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Mỗi thí nghiệm tạo mẫu *in vitro* cây 30 mẫu, bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại.

Tạo mẫu sạch in vitro từ đoạn thân mang mắt ngủ của cây Ô đầu

Các bước thí nghiệm được tiến hành như sau:

Đoạn thân mang mắt ngủ ngâm xà phòng loãng trong 15-30 phút sau đó rửa sạch dưới vòi nước.

(1) Đưa mẫu vào bình sạch, rửa lại mẫu bằng nước cất khử trùng.

(2) Khử trùng mẫu bằng cồn 70% (1-2 phút). Rửa mẫu bằng nước cất khử trùng.

(3) Khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% ở các mức thời gian (3; 5; 7; 9 và 11 phút).

(4) Rửa sạch mẫu bằng nước cất khử trùng 3 lần.

Đoạn thân mang mắt ngủ sau khi được khử trùng tiến hành cấy vào môi trường MS cơ bản.

Để thấy được ảnh hưởng của loại mẫu cấy đến khả năng phát sinh chồi sau khử trùng. Đánh giá kết quả sau 2 tuần, 4 tuần. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu nảy chồi nhiễm (%); Tỷ lệ mẫu nảy chồi không bị nhiễm (%), Chất lượng chồi.

Chồi tốt: Chồi mập, dài, xanh bình thường (++)

Chồi kém: Chồi nhỏ, ngắn, vàng (+)

Các bước khử trùng được thực hiện trong môi trường vô trùng.

Phương pháp tạo đa chồi từ nguồn mẫu sạch thu được

Ảnh hưởng riêng rẽ của chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin đến khả năng phát sinh chồi

Để thăm dò ảnh hưởng riêng rẽ của chất kích thích sinh trưởng đến sự phát sinh đa chồi ở cây Ô đầu, Các công thức môi trường nuôi cây đều sử dụng môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose 30 g/l + agar 9,0 g/l và các chất kích thích sinh

trường có hàm lượng thay đổi. Công thức đối chứng sử dụng là môi trường MS cơ bản + sucrose 30 g/l + agar 9,0 g/l không bổ sung các chất kích thích sinh trưởng. Ở mỗi công thức nuôi cấy tiến hành trên 6 bình (30 mẫu cấy).

(1) Các đoạn thân mang đốt được cấy trên môi trường MS cơ bản + sucrose 30g/l + agar 9,0g/l + bổ sung BAP với nồng độ 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l; tương ứng với các công thức từ 1-4.

(2) Các đoạn thân mang chồi nách được cấy trên môi trường MS cơ bản + sucrose 30g/l + agar 9,0g/l + bổ sung kinetin với nồng độ 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l tương ứng với các công thức từ 1 - 4.

Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng ở cây Ô đầu sau các thời gian: 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần nuôi cấy qua các chỉ tiêu theo dõi sau: Số chồi/mẫu; Chiều cao chồi (cm); Chất lượng chồi.

Chồi sinh trưởng tốt: Chồi mập, lá to màu xanh đậm (+++)

Chồi sinh trưởng trung bình: Chồi nhỏ, lá nhỏ màu xanh nhạt (++)

Chồi sinh trưởng kém: Chồi nhỏ, lá nhỏ màu vàng (+)

Phương pháp tạo cây hoàn chỉnh

Khi các chồi cây Ô đầu đạt chiều cao 3-4 cm và có 3-5 lá được cấy chuyển sang môi trường ra rễ. Mỗi công thức thí nghiệm được tiến hành trên 30 mẫu. Môi trường thí nghiệm thăm dò là MS cơ bản + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + α -NAA nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/l hoặc IBA nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/l. Theo dõi, đánh giá kết quả sau 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần. Các chỉ tiêu theo dõi: Số rễ/chồi; Chiều dài rễ (cm); Chất lượng rễ

Rễ tốt: Rễ mập, dài, phân nhánh nhiều, màu trắng sữa hoặc trắng xanh (+++)

Rễ trung bình: Rễ nhỏ, dài, ít phân nhánh, màu trắng xanh (++)

Rễ kém: Rễ nhỏ, ngắn, không phân nhánh, màu vàng nâu (+)

Đưa cây ra vườn ươm

Thí nghiệm ngoài vườn ươm được bố trí 3 lần lặp lại, mỗi công thức giá thể được tiến hành trên 30 mẫu.

Giai đoạn bầu đất

Các chồi đơn đạt chiều cao 4-5 cm, mọc 4-5 lá, có 2-3 rễ, chiều dài rễ đạt 3-4 cm, rễ mập đủ tiêu chuẩn đưa cây ra ngoài vườn ươm.

Cách bố trí thí nghiệm: thăm dò trên 3 loại giá thể:

(1) Đất phù sa

(2) Đất phù sa + trấu hun + xơ dừa (tỉ lệ 2:1:2)

(3) Đất thịt trung bình.

Hai tuần đầu tiên để cây ở điều kiện phòng. Tuần thứ ba bắt đầu đưa cây ra nhà lưới. Tưới phun dưới dạng sương mù vào lúc sáng sớm. Theo dõi, đánh giá tỉ lệ sống sót và chất lượng cây sau 2 tuần, 4 tuần.

Giai đoạn vườn ươm

Những cây Ô đầu trong bầu đất đạt chiều cao hơn 5 cm, hình thành thêm lá mới, lá xanh, chiều dài rễ đạt 3-4 cm, khỏe sẵn sàng chuyển cây ra ngoài môi trường tự nhiên. Tuần đầu tiên phủ bằng ni lông. Tưới nước vào buổi chiều. Theo dõi, đánh giá kết quả sau 2 tuần, 4 tuần. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống (%), Chất lượng cây.

Cây sinh trưởng tốt: Cây to, cao, phiến lá rộng, lá xanh đậm (+++)

Cây sinh trưởng trung bình: Cây thấp, lá xanh đậm (++)

Cây sinh trưởng kém: Cây nhỏ, thấp, lá nhỏ, lá xanh nhạt (+).

2.2.2.2. Phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro*

Chuẩn bị mẫu và dịch khuẩn R. rhizogenes

Cuống lá, lá và đoạn rễ tách từ cây Ô đầu *in vitro* sử dụng làm vật liệu lây nhiễm để cảm ứng tạo rễ tơ.

Vi khuẩn *R. rhizogenes* ATTC 15834 gốc được cấy ria trên môi trường LB (Luria Bertani) đặc nuôi trong tủ ấm 28°C trong 48 giờ. Nuôi hoạt hóa bằng cách

nuôi cấy trên môi trường LB đặc trong 48 giờ ở 28°C trong điều kiện tối. Sau đó, một khuẩn lạc đơn được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 16 giờ. Dịch khuẩn được ly tâm thu sinh khối ở tốc độ 4.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Sinh khối vi khuẩn sau đó được hòa loãng trong môi trường ½MS lỏng và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600nm (OD₆₀₀).

Lây nhiễm mẫu với vi khuẩn

Mẫu cây (lá, cuống lá, đoạn rễ) được cắt và tạo vết thương bởi dao cấy được ngâm trong dịch khuẩn *R. rhizogenes* trong 15 phút và vẩy nhẹ, sau đó chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy là môi trường MS cơ bản + sucrose 30 g/l trong 2 ngày ở điều kiện tối.

Diệt khuẩn và cảm ứng rễ tơ

Kết thúc giai đoạn đồng nuôi cấy, mẫu cây được chuyển sang môi trường diệt khuẩn và tái sinh là môi trường MS + sucrose 30 g/l + cefotaxim 500 mg/l trong điều kiện tối ở 28°C. Theo dõi sự hình thành rễ tơ sau 6 tuần.

Nhân nuôi rễ tơ

Rễ tơ chuyển gen được nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản với các trạng thái môi trường khác nhau (đặc, lỏng, bán lỏng) để khảo sát khả năng tăng trưởng của rễ tơ cây Ô đầu. Môi trường đặc là môi trường chứa 0,9% agar, môi trường bán lỏng chứa 0,45% agar. Môi trường lỏng là môi trường không có agar. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút; 1,1 atm. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: 14 giờ sáng, cường độ ánh sáng 2000-2500 lux, nhiệt độ 25 ± 2°C.

Xác định khối lượng rễ khô

Rễ tơ sau khi thu sinh khối được sấy đến khối lượng không đổi để xác định khối lượng rễ khô (g khối lượng khô/bình).

2.2.3. Nhóm phương pháp tách dòng gen và thiết kế vector chuyển gen

2.2.3.1. Phân lập gen và tách dòng phân tử

Thiết kế cặp mồi PCR và nhân bản gen $AcF3'5'H$

Nghiên cứu thông tin về gen $AcF3'5'H$ và thiết kế cặp mồi để nhân gen $AcF3'5'H$ dựa trên trình tự gen $F3'5'H$ của cây *A. carmichaelii* mang mã số JN635708.1 trên GenBank [89]. Cặp mồi $F3'5'H$ -*NcoI*-F/ $F3'5'H$ -*NotI*-R đã được thiết kế nhân bản đoạn mã hóa của gen $AcF3'5'H$. Kích thước của đoạn DNA được nhân bản dự kiến là 1581 bp.

RNA tổng số được tách bằng kit GeneElute™ Total RNA Miniprep của hãng Sigma. cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis.

Nhân bản gen $AcF3'5'H$ được thực hiện bằng PCR với cặp mồi đã thiết kế $F3'5'H$ -*NcoI*-F/ $F3'5'H$ -*NotI*-R. Thành phần phản ứng PCR được trình bày ở bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	2X	12,5
2	$F3'5'H$ - <i>NcoI</i> -F	10 pmol/μl	1,5
3	$F3'5'H$ - <i>NotI</i> -R	10 pmol/μl	1,5
4	DNA hoặc cDNA khuôn	500 ng/μl	3,0
5	Nước khử ion	-	6,5
Tổng thể tích			25

PCR nhân gen $AcF3'5'H$ được thực hiện theo chu trình nhiệt là 94°C trong 3 phút; lặp lại 30 chu kì (94°C/30 giây, 58°C/30 giây, 72°C/1 phút 30 giây); 72°C/7 phút và lưu giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0% và được tinh sạch theo kit GenJET PCR Purification của hãng Fermentas.

Tách dòng và xác định trình tự gen *AcF3'5'H*

Kỹ thuật tách dòng gen được thực hiện theo Sambrook và Russell (2001) [69].

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Gen JET PCR Purification, sau đó gắn vào vector pBT để tạo plasmid tái tổ hợp. Thành phần và điều kiện phản ứng mô tả ở bảng 2.3.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng gắn gen *AcF3'5'H* vào vector tách dòng

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	T4 DNA Ligase Buffer	10X	2,0
2	T4 DNA Ligase	5 u/μl	1,0
3	<i>AcF3'5'H</i>	100 ng/μl	12,0
4	pBT	100 ng/μl	3,0
5	Nước khử ion	-	2,0
Tổng thể tích			20
<i>Điều kiện phản ứng: 20°C trong 3 giờ</i>			

Hỗn hợp gồm 5 μl vector tái tổ hợp và 50 μl dịch tế bào khả biến đặt trong nước đá 20 phút, sau đó chuyển ngay vào bể ổn nhiệt ở 42°C trong thời gian 1 phút 30 giây rồi đưa ngay vào nước đá trong thời gian 10 phút. Sau khi sốc nhiệt bổ sung 150-300 μl LB lỏng để nuôi phục hồi ở 37°C, lắc 200 rpm trong vòng 1 giờ. Cây trái 150-250 μl dịch khuẩn lên môi trường LB đặc có bổ sung ampicillin 50 mg/l, X-gal 30 mg/l và IPTG 100 μM và nuôi ở 37°C trong vòng 16 giờ. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn thể hiện ở phụ lục 11

Chọn dòng khuẩn lạc chứa vector tái tổ hợp dựa trên kiểu hình khuẩn lạc và bằng colony-PCR với cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R*.

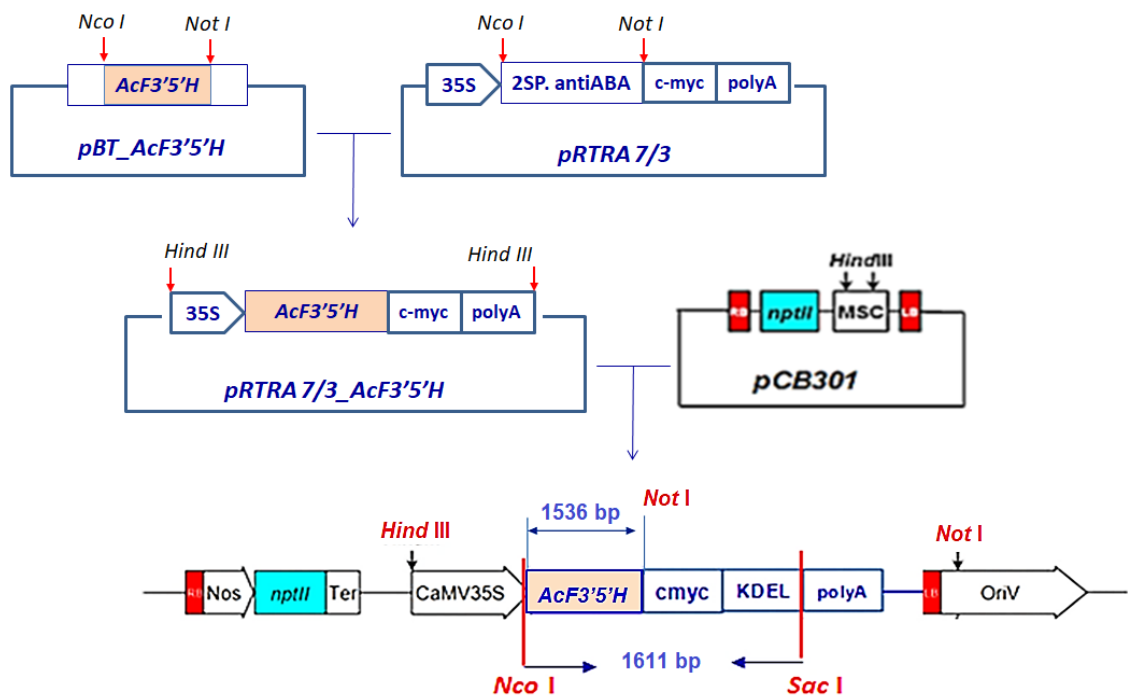
Tách chiết plasmid bằng kit Plasmid Extraction theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các plasmid tái tổ hợp mang gen *AcF3'5'H* được xác định bằng phương pháp giải trình tự DNA tự động, trong đó mỗi loại dideoxynucleotide được đánh dấu bằng 1 chất huỳnh quang (fluochrome) có màu khác nhau trên máy đọc trình tự tự động

ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Trình tự nucleotide của gen được phân tích, so sánh trên phần mềm BLAST và BioEdit.

2.2.3.2. Thiết kế vector biểu hiện gen

Tạo cấu trúc độc lập mang gen chuyển AcF3'5'H

Xử lý đồng thời vector tái tổ hợp *pBT_AcF3'5'H* và vector *pRTRA7/3* bằng *NcoI/NotI*, sau đó chọn và tinh sạch đoạn DNA theo chỉ dẫn của kit GenJET PCR Purification để thu nhận đoạn gen *AcF3'5'H* và vector mở vòng *pRTRA7/3*. Trộn gen *AcF3'5'H* với vector *pRTRA7/3* bổ sung T4 DNA ligase xúc tác cho quá trình ghép nối tạo được vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_AcF3'5'H* mang cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_polyA*.



Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*

Vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_AcF3'5'H* được nhân dòng trong *E. coli* DH5α và chọn dòng bằng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R*.

Tạo vector chuyển gen pCB301_AcF3'5'H

Xử lý đồng thời vector *pRTRA7/3_AcF3'5'H* và vector pCB301 với *HindIII*, sau đó chọn và tinh sạch các băng DNA điện di theo kích thước để thu nhận các thành phần cần cho việc tạo vector chuyển gen gồm: cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_polyA*; vector mở vòng pCB301. Trộn cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_polyA* tinh sạch với vector pCB301 đã mở vòng, bổ sung T4 DNA ligase để xúc tác cho quá trình ghép nối tạo được vector chuyển gen thực vật *pCB301_AcF3'5'H*. Vector tái tổ hợp được nhân dòng trong *E. coli* DH5 α . Tiến hành chọn dòng bằng colony - PCR với cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R*.

2.2.3.3. Tạo *Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp

Biến nạp vector *pCB301-AcF3'5'H* vào tế bào khả biến *A. tumefaciens* CV58 bằng xung điện với thông số 400 Ω , 2,5 kV, 2,5 μ F rồi đưa ngay vào nước đá, sau 5 phút bổ sung 200 μ l LB lỏng và đảo nhẹ. Chuyển hỗn dịch đã xung điện sang ống Eppendorf 2 ml, nuôi phục hồi khuẩn sau biến nạp ở 28°C, lắc 200 rpm trong 2 giờ. Cây trái trên môi trường LB lỏng có kháng sinh kanamycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l, ủ ở 28°C trong 48 giờ. Tiến hành chọn dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp *pCB301_AcF3'5'H* bằng colony-PCR và dòng *A. tumefaciens* dương tính sẽ được lưu giữ phục vụ cho chuyển gen vào cây đích.

2.2.4. Nhóm phương pháp chuyển gen và phân tích cây chuyển gen

2.2.4.1. Biến nạp di truyền ở cây thuốc lá

Chuẩn bị vi khuẩn lây nhiễm

Vi khuẩn *A. tumefaciens* mang gen chuyển *AcF3'5'H* được nuôi chọn lọc trong 15 ml môi trường LB lỏng bổ sung kháng kanamycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l ở 28°C lắc 200 rpm, 48 giờ. Chuyển 10 ml dịch huyền phù tế bào trên vào 50 ml LB lỏng không kháng sinh để nuôi phục hồi 28°C, lắc 200 rpm đến khi OD₆₀₀ = 0,6-0,8 là đạt số lượng tế bào tối ưu để biến nạp. Ly tâm toàn bộ dịch tế bào ở 4°C, 5000 rpm, 15 phút. Hoà tan tế bào lắng vào 40 ml dung dịch $\frac{1}{2}$ MS + AS 50 μ l đặt trong nước đá lạnh.

Chuyển gen AcF3'5'H vào cây Thuốc lá thông qua A. tumefaciens

Biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* thông qua lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp vào mảnh lá và tái sinh cây Thuốc lá chuyển gen được thực hiện như mô tả của Topping (1998) [74]. Môi trường nuôi cấy lá Thuốc lá chuyển gen được trình bày ở phụ lục 12.

Lá Thuốc lá được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước 1×1 cm, sau đó các mảnh lá được ngâm trong dịch khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp trong 30 phút. Chuyển các mảnh lá nhiễm khuẩn sang môi trường cảm ứng chồi GM (MS + BAP 1,0 mg/l + sucrose 30g/l + agar 9 g/l) bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin 50 mg/l + cefotaxime 500 mg/l. Sau 4 tuần biến nạp, các cụm chồi được cắt ra khỏi mẫu và cấy chuyển sang môi trường nuôi chồi được bổ sung kanamycin 50 mg/l. Chồi đạt chiều cao 2-3 cm được chuyển vào môi trường tạo rễ RM (MS + IBA 0,1 mg/l + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l) bổ sung kanamycin 50 mg/l để hình thành cây hoàn chỉnh. Các cây chuyển gen *in vitro* phát triển rễ và 3-4 lá, chúng được ra trồng trong chậu chứa trấu hun: cát theo tỷ lệ 1:1, những cây sống sót sau đó được chuyển sang điều kiện nhà lưới.

2.2.4.2. Biến nạp và biểu hiện gen *AcF3'5'H* trong cây Ô đầu

Tạo nguyên liệu biến nạp gen

Các chồi *in vitro* có kích thước khoảng 1-2 cm được sử dụng làm vật liệu nhận gen *AcF3'5'H* thông qua *A. tumefaciens*. Chủng *A. tumefaciens* mang gen *uidA* và *AcF3'5'H* được nuôi cấy chọn lọc trong môi trường LB lỏng bổ sung kanamycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l ở 28°C với lắc ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. 10 ml huyền phù tế bào trên được chuyển vào 50 ml LB lỏng không có kháng sinh để thu hồi ở 28°C và lắc ở 200 vòng/phút cho đến khi mật độ *A. tumefaciens* là $OD_{600} = 0,8$. Toàn bộ huyền phù tế bào được ly tâm ở 4°C và 5000 vòng/phút trong 15 phút để thu sinh khối lắng cặn. Các tế bào lắng được hòa tan trong 50 ml dung dịch ½ MS + acetosyringone 100 µl trong nước đá.

*Thiết lập thí nghiệm chuyển gen thông qua chuyển gen chỉ thị *uidA* ở cây Ô đầu*

Quy trình chuyển gen ở cây Ô đầu được xây dựng thông qua chuyển gen *uidA* với việc khảo sát mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens*, nồng độ AS, thời gian nhiễm và nồng độ kháng sinh chọn lọc kanamycin làm cơ sở cho chuyển gen đích vào cây Ô

đầu. Sau 4 tuần biến nạp gen *uidA*, các mẫu tạo chồi được chuyển sang môi trường MS + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l + MES 0,59 g/l + muối B5 3 g/l + BAP 0,5 mg/l để kéo dài chồi. Chồi đạt chiều cao 2 - 3 cm được chuyển sang môi trường tạo rễ MS + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l + BAP 0,5 mg/l + IBA 0,4 mg/l bổ sung kanamycin. Sau đó, cây *in vitro* được chuyển trồng trong chậu trong điều kiện nhà lưới. Phân tích biểu hiện *uidA* tuân theo quy trình nhuộm hóa mô GUS (β -glucuronidase) theo Jefferson và cs (1987) [121].

Biến nạp cấu trúc CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_polyA vào cây Ô đầu

Sự biến nạp trung gian qua vi khuẩn *Agrobacterium* thông qua hệ thống tái sinh cây và chồi Ô đầu *in vitro* được thực hiện theo phương pháp của Olhoft và cs (2007) [118]. Môi trường nuôi cấy chồi Ô đầu chuyển gen được trình bày ở phụ lục 13.

Chồi *in vitro* được tách từ các cụm đa chồi và ngâm trong dịch *A. tumefaciens* tái tổ hợp có chứa vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H* trong 15 phút, sau đó được cấy trên môi trường đồng nuôi cấy (Môi trường CCM bao gồm MS cơ bản + muối B5 0,42 g/l + MES 3,5 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l; bổ sung vitamin B5 1,0 mg/l + AS 100 μ mol/l + L-cysteine 400 mg/l + BAP 1,5 mg/l) và được đặt trong tối trong 3 ngày. Các mẫu biến nạp được rửa trong dung dịch ½MS bổ sung cefotaxime 500 mg/l, sau đó được chuyển sang môi trường SIM cảm ứng tạo chồi có bổ sung BAP và kháng sinh kanamycin chọn lọc để tái sinh chồi trong sáu tuần. Môi trường cảm ứng tạo chồi SIM đầu tiên bao gồm MS cơ bản + muối B5 3,20 g/l + MES 1,0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l; bổ sung vitamin B5 1 mg/l + BAP 1,5 mg/l + kanamycin 50 mg/l. Sau hai tuần, các mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường SIM lần thứ hai. Môi trường cảm ứng tạo chồi SIM thứ hai bao gồm MS cơ bản + muối B5 3,20 g/l + MES 1,0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l; bổ sung vitamin B5 1 mg/l + BAP 1,5 mg/l + kanamycin 75 mg/l. Sau bốn tuần, các chồi cao 1-2 cm được chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM (MS cơ bản + MES 1,0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l; bổ sung với vitamin B5 1 mg/l + L-asparagine 75 mg/l + L-pyroglutamic acid 100 mg/l + GA₃ 1,0 mg/l + IAA 0,1 mg/l + kanamycin 50 mg/l). Sự kéo dài chồi trong SEM kéo dài trong sáu tuần. Khi chồi chuyển gen cao khoảng 2-4 cm, các chồi phát triển tốt được chọn và chuyển sang môi trường tạo rễ RM có bổ sung IBA và sàng lọc bằng kanamycin. Môi trường tạo rễ RM

bao gồm MS cơ bản + MES 1,0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l + nước dừa 100 ml/l bổ sung IBA 0,5 mg/l và kanamycin 50 mg/l. Khi cây chuyển gen *in vitro* phát triển rễ và 3-4 lá, chúng được trồng trên giá thể với tỷ lệ 2 đất phù sa: 1 trấu hun: 2 xơ dừa trong điều kiện nhà kính.

2.2.4.3. Phân tích cây chuyển gen

Phân tích cây Thuốc lá chuyển gen

Cây Thuốc lá chuyển gen trồng trong nhà lưới được sử dụng để phân tích sự hiện diện và biểu hiện của gen chuyển trong cây chuyển gen bằng PCR, RT-PCR, Western blot và ELISA.

DNA tổng số được phân lập từ lá non dựa trên phương pháp của Saghai-Marooof và cs (1984) [101]. Tách chiết RNA tổng số từ lá cây Thuốc lá chuyển gen bằng kit GenEluteTM Total RNA Miniprep (Sigma). Tổng hợp cDNA được thực hiện bằng kit First-Strand cDNA synthesis (Fermentas).

PCR được thực hiện để xác nhận sự hiện diện của gen chuyển *AcF3'5'H* trong cây Thuốc lá chuyển gen. Phân tích biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở cấp độ phiên mã được thực hiện bằng cách sử dụng RT-PCR. Cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R* (Bảng 2.1) được sử dụng để phân tích PCR và RT-PCR.

Cây Thuốc lá chuyển gen được xác nhận dương tính với RT-PCR được sử dụng để phân tích biểu hiện của protein tái tổ hợp *AcF3'5'H* (recombinant *AcF3'5'H* = *rAcF3'5'H*) bằng Western blot và ELISA. Protein tổng số chiết xuất từ lá Thuốc lá được phân tích bằng điện di trên gel 10% SDS-PAGE như mô tả của Laemmli [152]. Phân tích Western blot để xác định sự biểu hiện protein tái tổ hợp được thực hiện theo mô tả của Sun và cs [64]. Hàm lượng của protein *rAcF3'5'H* được xác định bằng ELISA [64]. Hàm lượng của protein *rAcF3'5'H* ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) được xác định theo công thức sau: $Y = 0,0019X + 0,0562$, trong đó Y là hàm lượng của protein *rAcF3'5'H* và R (hệ số tương quan) = 0,9993.

Phân tích cây Ô đầu chuyển gen

Cây Ô đầu chuyển gen trồng trong nhà kính được sử dụng để phân tích sự hiện diện và biểu hiện của gen chuyển trong cây chuyển gen bằng PCR, RT-PCR, Western blot và ELISA. Tách chiết DNA tổng số từ lá Ô đầu chuyển gen và cây đối chứng không chuyển gen theo Saghai-Marooof và cs (1984) [101]. Tách chiết RNA tổng số từ lá cây Ô đầu bằng kit GenElute™ Total RNA Miniprep (Sigma). Tổng hợp cDNA được thực hiện bằng kit First-Strand cDNA synthesis (Fermentas).

Sự hiện diện của gen chuyển *AcF3'5'H* trong bộ gen của cây chuyển gen Ô đầu ở thế hệ T₀ được xác định bằng PCR. Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *AcF3'5'H* ở mức độ phiên mã được thực hiện bằng cách sử dụng RT-PCR. Cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-SacI-R* (Bảng 2.1) được sử dụng để phân tích PCR và RT-PCR.

Protein tổng số chiết xuất từ lá Ô đầu chuyển gen được biến tính và phân tích bằng điện di trên gel 10% SDS-PAGE như mô tả của Laemmli và cs (1970) [152] và sau đó được chuyển sang màng nitrocellulose. Các màng đã bị chặn bằng sữa tách béo 5% trong PBS-T qua đêm. Các màng chứa protein được ủ với kháng thể c-myc trong 3 giờ, lắc ở nhiệt độ phòng và ủ với các kháng thể thứ cấp (kháng IgG-HRP) trong 2 giờ. Kết quả được xác định bằng cách sử dụng TMB (3,3', 5,5'-tetramethyl benzidine). Hàm lượng của protein tái tổ hợp AcF3'5'H (rAcF3'5'H) được xác định bằng ELISA theo Sun và cs (2006) [64]. Protein tổng số được pha loãng đến nồng độ 200 µg/ml. Protein H5 được gắn đuôi cmyc của virus cúm A/H5N1 được sử dụng làm đối chứng. Việc xây dựng đường chuẩn dựa trên nồng độ của protein H5 pha loãng. Hàm lượng của protein rAcF3'5'H (µg/µl) được xác định theo công thức sau: $Y = 0,0019X + 0,0562$, trong đó Y là hàm lượng của protein rAcF3'5'H và R (hệ số tương quan) = 0,9993.

2.2.4.4. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số trong cây Thuốc lá và Ô đầu bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ

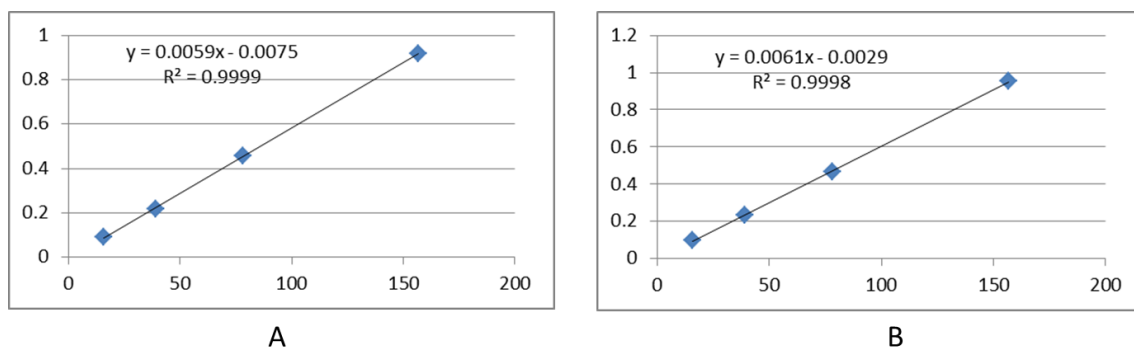
Flavonoid từ lá cây Thuốc lá và lá cây Ô đầu được chiết bằng methanol, sau đó cho phản ứng với AlCl₃ rồi đem đo quang phổ ở bước sóng 415 nm theo Kalita và cs (2013) [112]. Đường chuẩn quercetin được xây dựng bằng cách phân tích dãy chuẩn có nồng độ từ 10 µg/ml đến 100 µg/ml, ở cây Thuốc lá $Y = 0,0059X - 0,0075$ (hệ số tương quan $R^2 = 0,9999$), ở cây Ô đầu $Y = 0,0061X - 0,0029$ (hệ số tương

quan $R^2 = 0,9998$), trong đó Y là hàm lượng của Quercetin (hình 2.3). Đường chuẩn mô tả sự phụ thuộc của độ hấp thụ phân tử (trục tung) vào nồng độ dung dịch chuẩn tương ứng ($\mu\text{g/ml}$). Mẫu lá tươi (cây Thuốc lá, Ô đầu) 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 ($\mu\text{g/g}$); C_c : nồng độ quercetin trong dung dịch chuẩn làm việc ($\mu\text{g/ml}$); 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.



Hình 2.3. Đồ thị đường chuẩn xác định flavonoid toàn phần theo quercetin. A: Đồ thị đường chuẩn xác định flavonoid toàn phần theo quercetin trong cây Thuốc lá; B: Đồ thị đường chuẩn xác định flavonoid toàn phần theo quercetin trong cây Ô đầu.

2.2.5. Xử lý số liệu thống kê

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm Statistical Package for the Social Science (SPSS) để xác định các trị số thống kê như:

giá trị trung bình, phương sai, độ lệch chuẩn, sai số trung bình mẫu. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm tra bằng Duncan với $P < 0,05; 0,01; 0,001$.

2.3. ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm được thực hiện từ tháng 8/2016 đến tháng 12/2020.

Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen vào cây Thuốc lá, cây Ô đầu 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.

Các thí nghiệm phân tích hàm lượng flavonoid tổng số trong lá cây Thuốc lá, cây Ô đầu được thực hiện tại Phòng Công nghệ Thực phẩm – Viện kiểm nghiệm và vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia, Bộ Y tế.

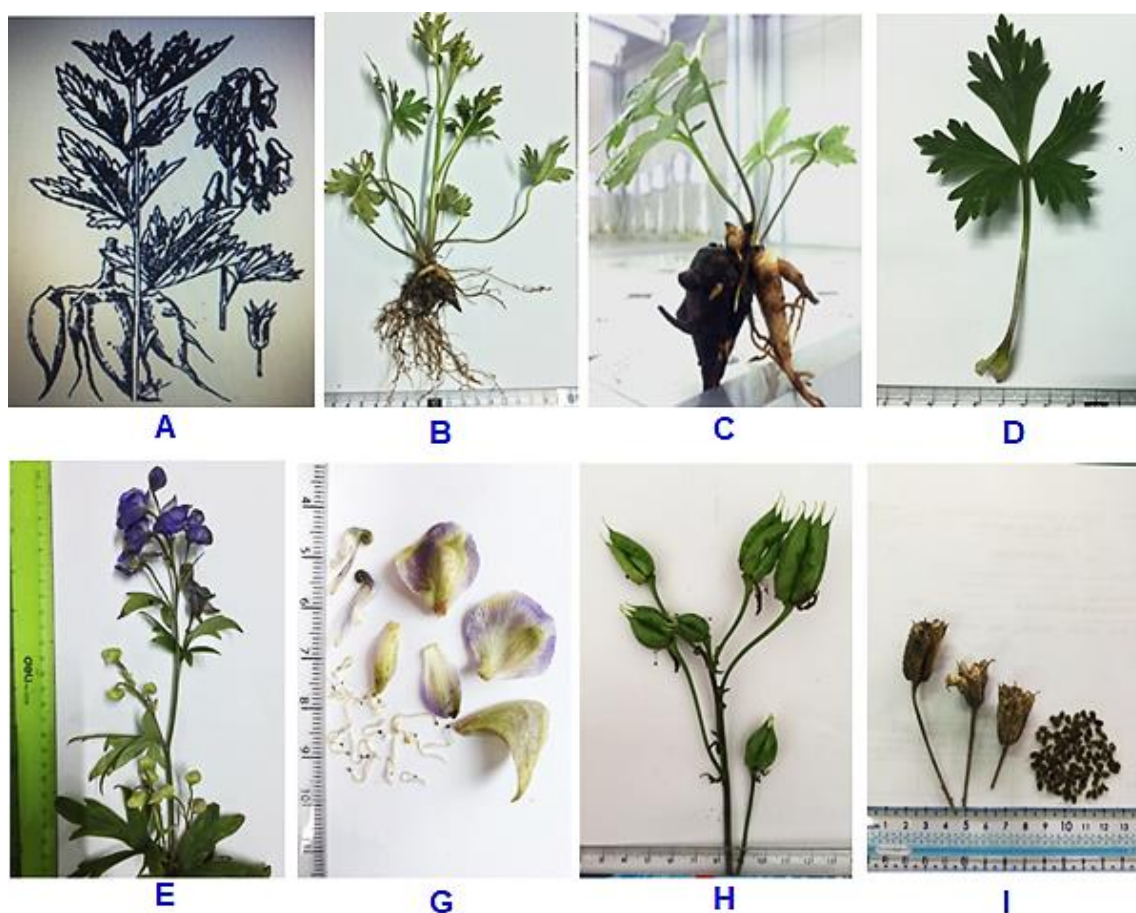
Luận án được hoàn thành tại Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ ĐỊNH DANH LOÀI Ô ĐẦU (*Aconitum carmichaelii*)

3.1.1. Đặc điểm hình thái các mẫu Ô đầu thu ở Hà Giang

Kết quả so sánh hai mẫu Ô đầu thu từ các loài thuộc huyện Hoàng Su Phì và Quản Bạ, tỉnh Hà Giang cho thấy các mẫu Ô đầu giống nhau về hình thái, gồm rễ, thân, lá, hoa (Hình 3.1 A- E).



Hình 3.1. Cây Ô đầu. A: Hình vẽ Ô đầu theo Đỗ Tất Lợi (2004) [11]; B: Ô đầu gồm rễ và hình thành củ; C: Cây Ô đầu gồm củ mẹ, củ con; D: Lá Ô đầu và cuống lá; E: Cảnh mang hoa và hoa Ô đầu; G: Các bộ phận của hoa Ô đầu; H: Quả Ô đầu; I: Quả khô và hạt Ô đầu (B, C, D, E, G, H, I: Ảnh do tác giả chụp).

Ô đầu là cây thân thảo mọc thẳng đứng, sống một năm hoặc nhiều năm, cao khoảng 0,6-1 m, thân màu xanh, ít phân cành, có lông ngắn (Hình 3.1 A). Rễ cây Ô đầu là rễ chùm, từ củ mọc ra nhiều rễ con với độ dài khác nhau trung bình dài từ 1-15 cm, rễ mọc thẳng không cong queo, trên rễ có nhiều lông nhỏ. Rễ có màu nâu vàng, đâm sâu xuống đất và phát triển theo chiều ngang (đối với củ phụ từ), phát triển theo chiều dọc đối với củ có hình con quay. Củ có hình nón, dài 3-5 cm, đường kính 1-2,5 cm mọc thành chùm trong đó có củ mẹ và nhiều củ con. Củ mẹ là do rễ cái phình thành ngay ở dưới thân cây, củ mẹ có đặc điểm là nhẹ, rỗng và ở giữa có màu xám. Củ con được mọc ra từ cạnh cổ rễ cái, củ con thì chắc, nặng, phía trên đầu củ con có mang lá ngầm. Rễ củ thu hái vào tháng 7-10, trước khi cây ra hoa, là lúc củ có kích thước to nhất. Rễ cây Ô đầu có vị nhạt, sau hơi chát và tê lưỡi. (Hình 3.1 B, C). Lá đơn nguyên, 3 thùy, mỗi thùy lại chẻ thành nhiều thùy không đều nhau (2 hoặc 3 thùy), mép lá hình răng cưa, mọc tròn xung quanh củ, không có lá kèm, xanh đậm, nhẵn và có lông ở mép lá. Mặt trên có màu đậm hơn mặt dưới. Ngoài ra còn có một số lá có hình dạng khác như: lá không có hình răng cưa, lá chẻ 2 thùy gân lá dạng bản. Lá cây con hình tim, gần như tròn, tựa như lá ngải cứu. Lá cây Ô đầu mọc so le và sắp xếp theo hình xoắn ốc. Cuống lá dài, trung bình từ 1- 4 cm, có màu xanh hoặc màu tím đậm, trên cuống cũng có lông nhỏ. Phiến lá rộng khoảng từ 5-12 cm, gân lá hình lông chim, nhẵn hai mặt, có màu sắc giống với phiến lá. (Hình 3.1 A, D). Đầu ngọn thân hoặc kẽ lá xuất hiện cụm hoa mọc thành chùm dày nhiều hoa to màu xanh tím, dài 10-20 cm, cuống hoa dài 2-6 cm, dưới cụm hoa có lá bắc nhỏ chia 3 thùy hình mác (Hình 3.1 E). Hoa lưỡng tính, không đều, có 5 đài gồm 1 lá đài trên hình mũ hơi dẹt, 2 lá đài bên hình trứng và 2 lá đài dưới hình thuôn, có lông tơ trên mặt ngoài, có túi rỗng ở đỉnh để chứa mật hoa. Tròng hoa nằm trong lá đài trên, nhị nhiều (45-50 nhị), chỉ nhị rộng có cánh ở dưới, bao phấn nứt dọc hình cầu hoặc elip, vòi nhụy ngắn hơn bầu nhụy. Hoa nở vào tháng 10-11 (Hình 3.1 E, F). Quả Ô đầu thuộc dạng quả nang, màu xanh, có mỏ ngắn gồm 5 đại mỏng hình elip, đường kính 0,3-0,5 cm, dài khoảng 1,5-2,7 cm, có cuống dài 2-6 cm (Hình 3.1 G). Trong mỗi đại chứa 10- 25 hạt dẹt, màu nâu đen, dài 3-5 mm, rộng 2-3 mm, trên mặt có vảy (Hình 3.1 H).

Sau khi đối chiếu các đặc điểm hình thái quan sát được ở các mẫu Ô đầu với các đặc điểm cây Ô đầu theo mô tả của Phạm Hoàng Hộ (1999) [7], Đỗ Tất Lợi (2004) [11] và đồng thời tra cứu trên trang web của Tropicos [183] cho thấy các mẫu Ô đầu thu tại huyện Hoàng Su Phì và Quản Bạ, tỉnh Hà Giang thuộc chi Ô đầu (*Aconitum* L), họ Hoàng Liên (Ranunculaceae), bộ Hoàng Liên (Ranunculales), phân lớp Hoàng Liên (Ranunculidae), lớp Hai lá mầm (Magnoliopsida), ngành Thực vật có hoa, Mộc lan, Hạt kín (Magnoliophyta).

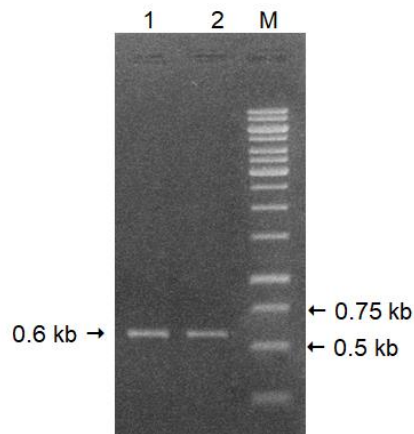
Tuy nhiên, sử dụng phương pháp hình thái so sánh rất khó xác định được mẫu Ô đầu khi cây đang trong giai đoạn phát triển (chưa ra hoa) và dễ nhầm lẫn với loài thuộc chi *Aconitum*. Vì vậy, để có thể tránh được sự nhầm lẫn với các loài gần gũi mà những quan sát hình thái sinh trưởng và phát triển chưa đủ để định danh loài và phân biệt loài hoặc mẫu cây đã bị biến dạng, cần kết hợp phương pháp hình thái so sánh với việc sử dụng mã vạch DNA (trình tự vùng *ITS*, đoạn gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB2*) trong nhận diện loài Ô đầu.

3.1.2. Đặc điểm trình tự nucleotide của vùng *ITS* và các đoạn gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB2*

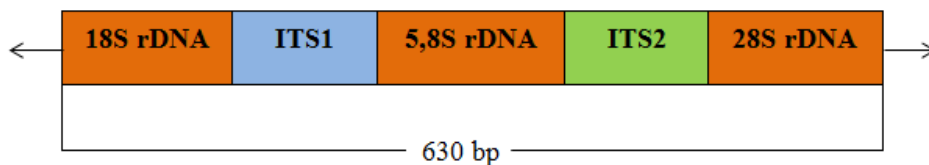
3.1.2.1. Đặc điểm trình tự vùng *ITS*

DNA tổng số được tách chiết từ lá non của 2 mẫu Ô đầu được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi *ITS-F/ITS-R*. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% cho thấy ở cả 2 lần chạy chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng hơn 600 bp, tương ứng với kích thước dự kiến của vùng *ITS* (Hình 3.2).

Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được vùng *ITS* có kích thước 630 bp (Phụ lục 1). Vùng *ITS* được phân lập từ loài Ô đầu (*A. carmichaelii*) bao gồm một phần của đoạn gen *18S rDNA*, đoạn không mã hóa *ITS1* và gen *5,8S rDNA*, đoạn không mã hóa *ITS2* và một phần của đoạn gen *28S rDNA* được mô tả ở hình 3.3.



Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân vùng *ITS*. M: Marker 1 kb; 1: Mẫu Ô đầu Hoàng Su Phì (HSP); 2: Mẫu Ô đầu Quán Bạ (QB)



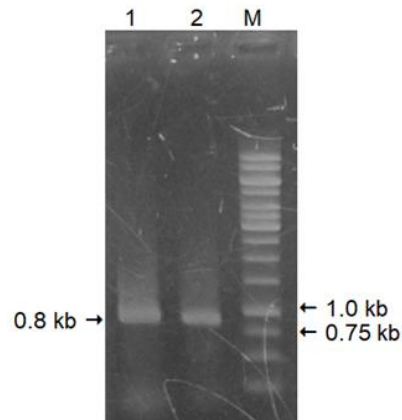
Hình 3.3. Sơ đồ vùng *ITS* của mẫu Ô đầu

Bằng phần mềm BLAST trong NCBI cho thấy vùng *ITS* phân lập từ 2 mẫu nghiên cứu Ô đầu Hà Giang, Việt Nam (*ITS-QB*, *ITS-HSP*) có tỷ lệ tương đồng là 98,41%, 98,25 % (đối với *ITS* phân lập từ mẫu QB), và 97,94%, 97,78% (đối với *ITS* phân lập từ mẫu HSP) với hai trình tự *ITS* của *A. carmichaelii* (mã số trên GenBank là AY571352 và MH922985) (Phụ lục 2). Kết quả này đã khẳng định trình tự nucleotide phân lập được là vùng *ITS* thuộc loài *A. carmichaelii*. Trình tự vùng *ITS* của 2 mẫu nghiên cứu (*ITS-HSP*, *ITS-QB*) đã được GenBank chấp nhận và công bố với các mã số lần lượt là MH410519.1, MH410520.1.

3.1.2.2. Đặc điểm trình tự đoạn gen *matK*

PCR nhân bản đoạn gen *matK* với cặp mồi *matK-F/matK-R* từ DNA tổng số và kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8 % cho thấy ở cả 2 lần chạy chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng hơn 800 bp tương ứng với

kích thước dự kiến của đoạn gen *matK* (Hình 3.4). Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được đoạn gen *matK* có kích thước là 822 bp (Phụ lục 3).

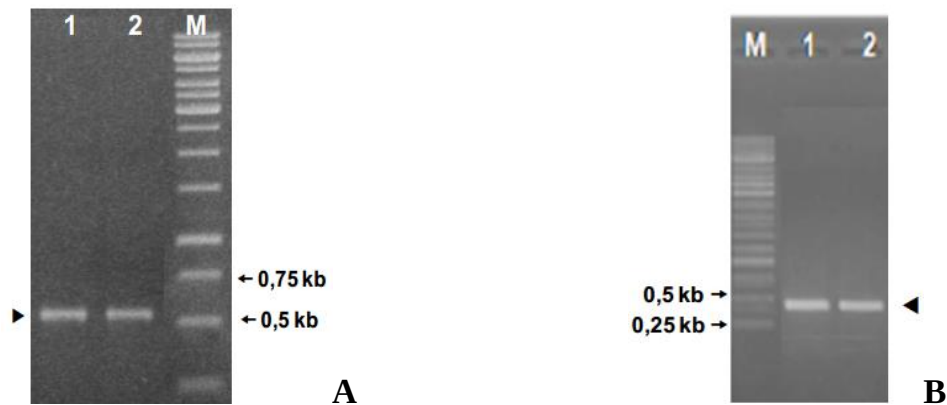


Hình 3.4. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân đoạn gen *matK*. M: Marker 1 kb; 1: *matK*-QB, 2: *matK*-HSP

Kết quả phân tích BLAST dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* của các mẫu Ô đầu được thể hiện ở Phụ lục 4. Tỷ lệ tương đồng của các chuỗi *matK* được phân lập từ các mẫu Ô đầu Hà Giang, Việt Nam là 98,30% so với hai trình tự *matK* của *A. carmichaelii* (mã số trên GenBank là KY407560 và KX347251). Do đó, những kết quả này đã chứng minh rằng đoạn DNA phân lập từ các mẫu ở Hoàng Su Phì và Quản Bạ, Hà Giang, Việt Nam là đoạn gen *matK* của các loài *A. carmichaelii*. Trình tự đoạn gen *matK* của 2 mẫu nghiên cứu (*matK*-QB, *matK*-HSP) đã được GenBank chấp nhận và công bố với các mã số lần lượt là LS398143.1 và LS398144.1.

3.1.2.3. Đặc điểm trình tự đoạn gen *rpoC1* và *rpoB2*

Kết quả khuếch đại đoạn gen *rpoC1* bằng PCR với cặp mồi *rpoC1-F/rpoC1-R* thu được đoạn DNA có kích thước hơn 0,55 kb (Hình 3.5A). Kích thước của đoạn DNA nhân bản được đúng như kích thước dự kiến của đoạn gen *rpoC1*.



Hình 3.5. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *rpoC1* (A) và đoạn gen *rpoB2* (B). M: Marker 1 kb; 1: HSP, 2: QB

Kết quả giải trình tự nucleotide thu được đoạn gen *rpoC1* phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang có kích thước gồm 543 nucleotide (Phụ lục 5), trong đó có 150 base loại A, 163 base loại T, 131 base loại G, 99 base loại C. Kết quả phân tích bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự đoạn gen *rpoC1* được phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang có độ tương đồng cao, 99% so với trình tự gen *rpoC1* trong hệ gen lục lạp của cây Ô đầu mang mã số KX347251, KT820663, KT820666, KT820667, KT820668, KT820669, KT820670 trên GenBank. Như vậy có thể khẳng định đoạn gen phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang là đoạn gen *rpoC1* của Ô đầu.

Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài Ô đầu thuộc chi *Aconitum* dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1* trên sơ đồ hình cây cho thấy từ các mẫu Ô đầu được chia làm hai nhánh chính (Phụ lục 6). Các trình tự mang mã số KT820663, KT820665, KT820666, KT820667, KT820668, KT820669, KT820670, KX347251 và *rpoC1*-HG thuộc nhánh I và trình tự mang mã số KT820664 thuộc nhánh II. Nhánh thứ nhất lại chia làm 2 nhánh phụ, trong đó trình tự mang mã số KX347251 và *rpoC1*-HG thuộc nhánh phụ thứ nhất và các trình tự còn lại thuộc nhánh phụ thứ hai. Khoảng cách di truyền giữa 2 nhánh chính I và II là 0,2%. Trình tự đoạn gen *rpoC1* phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang (*rpoC1*-HG) và

trình tự mang mã số *KX347251* cùng loài *A. carmichaelii* thuộc cùng một nhánh phụ của nhánh I.

Kết quả khuếch đại đoạn gen *rpoB2* bằng PCR với cặp mồi *rpoB2-F/rpoB2-R* thu được đoạn DNA có kích thước gần 0,5 kb (Hình 3.5B). Kích thước của đoạn DNA nhân bản được đúng như kích thước dự kiến của đoạn gen *rpoB2*. Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy đoạn gen *rpoB2* phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang có kích thước gồm 471 nucleotide (Phụ lục 7), gồm 142 base loại A, 132 base loại T, 113 base loại G, 84 base loại C. Phân tích bằng BLAST từ NCBI cho kết quả trình tự đoạn gen *rpoB2* được phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang có độ tương đồng 99% so với trình tự gen *rpoB2* trong hệ gen lục lạp của cây Ô đầu mang mã số *KX347251* trên GenBank. Kết quả phân tích bằng BLAST đã khẳng định đoạn gen phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang là đoạn gen *rpoB2* của Ô đầu.

Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài Ô đầu thuộc chi *Aconitum* dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoB2* (Phụ lục 8). Sơ đồ hình cây cho thấy 9 loài Ô đầu thuộc cùng chi *Aconitum* được phân thành hai nhánh chính, nhánh thứ nhất gồm 2 mẫu là *A. carmichaelii* *KX347251.1* và mẫu Ô đầu Hà Giang. Nhánh thứ hai gồm 8 mẫu và chia thành 2 nhánh phụ. Khoảng cách di truyền giữa hai nhánh chính I và II là 0,2%. Trình tự đoạn gen *rpoB2* phân lập từ cây Ô đầu Hà Giang (*rpoB2-HG*) và trình tự mang mã số *KX347251* cùng loài *A. carmichaelii* thuộc cùng một nhánh phụ của nhánh I.

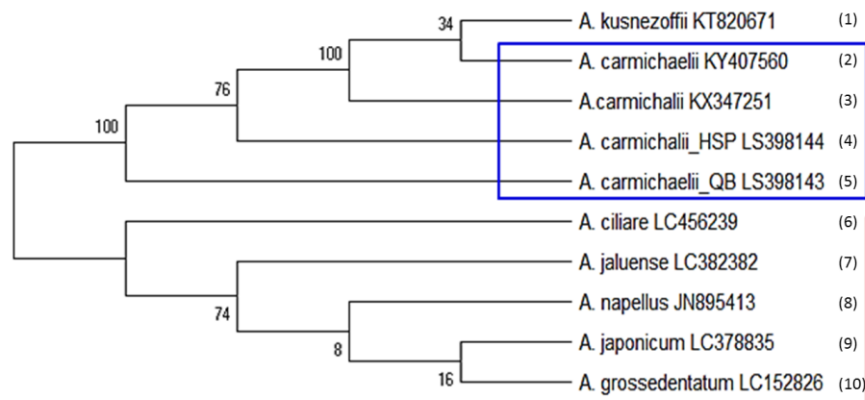
3.1.3. Thảo luận kết quả định danh mẫu Ô đầu

Ô đầu (*A. carmichaelii* Debx.) là loài cây thảo dược mọc tự nhiên hoặc được trồng để làm thuốc. Bằng phương pháp hình thái so sánh, các mẫu Ô đầu được xác định có các đặc điểm cơ quan dinh dưỡng, cơ quan sinh sản giống nhau và giống với các đặc điểm mô tả về cây Ô đầu theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [7], Đỗ Tất Lợi (2004) [11]. Tuy nhiên, một số đặc điểm của các mẫu Ô đầu có nhiều điểm tương đồng với các loài cùng chi *Aconitum*, nên chưa thể nhận diện được các mẫu Ô đầu này thuộc cùng một loài hay khác loài. Do các loài thuộc chi *Aconitum* được đặt tên khác nhau và trước kia không công bố rộng rãi nên một loài lại có thể có nhiều tên

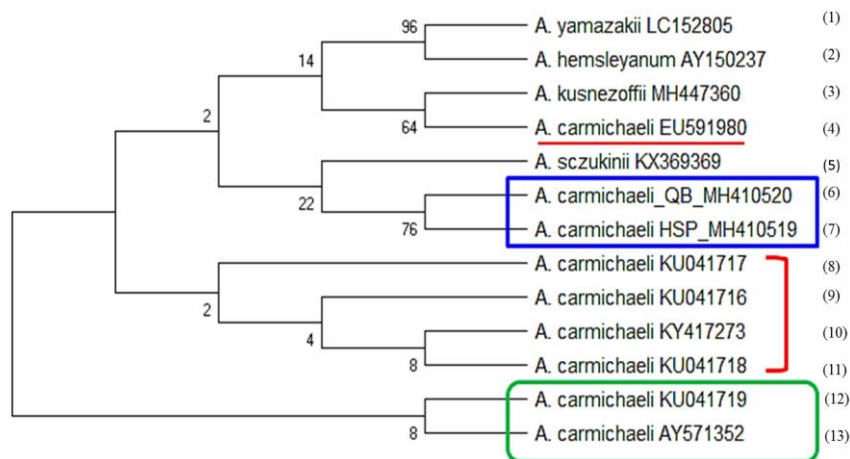
khác nhau. Mặt khác căn cứ vào đặc điểm thực vật để phân loại cũng khó khăn, do đặc điểm giữa các loài khác nhau không nhiều, cùng một loài sống trong các điều kiện khác nhau, có thể có sự thay đổi về hình thái. Vì vậy, việc kết hợp phương pháp hình thái so sánh với mã vạch DNA (vùng *ITS*, đoạn gen *matK*, *rpoC1* và *rpoB2*) có thể giúp định danh ở mức độ loài đối với nhóm cây được liệu nói chung và cây Ô đầu nói riêng trong các trường hợp khó phân biệt hai loài gần nhau khi chỉ dựa trên hình thái hoặc mẫu cây đã bị biến dạng ... Từ hệ gen mẫu Ô đầu, vùng *ITS* được phân lập có kích thước 630 bp; ba đoạn gen *matK*, *rpoC1* và *rpoB2* có kích thước tương ứng là 822 bp, 543 bp và 471 bp. Bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự đoạn gen *matK*, *rpoC1* và *rpoB2* của các mẫu nghiên cứu có tỷ lệ tương đồng lần lượt là 98%, 99%, 99% với trình tự gen lục lạp của loài *A. carmichaelii* do Jihai Gao và cs (2016) giải trình tự, mang mã số KY006977 trên GenBank [55]. Đồng thời, trình tự vùng *ITS* của 2 mẫu nghiên cứu có tỷ lệ tương đồng 97% với trình tự vùng *ITS* ở loài *A. carmichaelii* do Luo và cs (2005) giải trình tự có mã số trên GenBank là AY571352 [171]. Kết quả này làm cơ sở để xác định các mẫu Ô đầu thu tại tỉnh Hà Giang, Việt Nam thuộc loài *A. carmichaelii*, chi *Aconitum*, họ Hoàng Liên (*Ranunculaceae*).

Nghiên cứu này tập trung phân tích hai mã vạch *matK* và *ITS* để xác định chỉ thị đáng tin cậy trong định danh loài *A. carmichaelii*. Kết quả phân tích tiến hóa dựa trên trình tự đoạn gen *matK* bằng phần mềm MEGAX [84] được thể hiện ở hình 3.6. Lịch sử tiến hóa của các mẫu Ô đầu nghiên cứu dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* được suy luận bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML) và mô hình Tamura-Nei model [81]. Cây đồng thuận bootstrap suy luận từ 1000 lần lặp lại được lấy để đại diện cho lịch sử tiến hóa của đơn vị phân loại được phân tích [49]. Phân tích này liên quan đến 10 trình tự nucleotide và tất cả các trình tự được căn chỉnh, tổng cộng 722 vị trí trong bộ dữ liệu cuối cùng.

Trên hình 3.6, hai mẫu Ô đầu thu từ Quản Bạ và Hoàng Su Phì (Hà Giang) phân bố cùng nhóm với hai mẫu Ô đầu có mã số KY407560 và KX347251 và thuộc cùng một loài *A. carmichaelii* với hệ số bootstrap từ 76-100%.



Hình 3.6. Cây phát sinh loài phân tử dựa trên trình tự nucleotide của gen *matK* được thiết lập theo phương pháp Maximum Likelihood bằng phần mềm MEGAX. Hệ số bootstrap (1000 lần lặp lại) được hiển thị bên cạnh các nhánh. 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 là tên loài thuộc chi *Aconitum* cùng với mã số của trình tự gen *matK* trên GenBank. 4, 5 là loài Ô đầu Hoàng Su Phì và Quân Bạ cùng với mã số của trình tự gen *matK* trên GenBank.



Hình 3.7. Cây phát sinh loài phân tử dựa trên trình tự nucleotide của vùng *ITS* được thiết lập theo phương pháp Maximum Likelihood bằng phần mềm MEGAX. Các loài thuộc chi *Aconitum* được nhóm lại và hệ số bootstrap (1000 lần lặp lại) được hiển thị bên cạnh các nhánh. Tất cả các vị trí chứa khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã bị loại bỏ và có tổng cộng 610 vị trí nucleotide trong tập dữ liệu cuối cùng. 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 là tên loài thuộc chi *Aconitum* cùng với mã số của trình tự vùng *ITS* trên GenBank. 6, 7 là loài Ô đầu Quân Bạ và Hoàng Su Phì cùng với mã số của trình tự vùng *ITS* trên GenBank.

Trong khi đó cây phát sinh loài phân tử dựa trên trình tự nucleotide của vùng *ITS* ở hình 3.7, loài Ô đầu *A. carmichaelii* (bao gồm cả hai mẫu thu tại Quận Bạ và Hoàng Su Phì) phân bố ở cả hai nhánh và các nhánh phụ với hệ số bootstrap rất thấp, không đảm bảo độ tin cậy.

Ở Việt Nam, Vũ Đức Lợi và cs (2014) [12] đã bước đầu sử dụng trình tự vùng gen *ITS* trong nhận diện loài Ô đầu (*A. carmichaelii*), tuy nhiên kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mã vạch *ITS* có độ tin cậy chưa cao trong định danh loài *A. carmichaelii* (hình 3.7), vì thế chúng tôi cho rằng trình tự *matK* là một ứng cử viên mã vạch DNA tốt hơn để định danh loài Ô đầu (*A. carmichaelii*) và là giải pháp trong phân tích tiến hóa và phát sinh loài phân tử của chi *Aconitum*.

3.2. KẾT QUẢ THIẾT LẬP HỆ THỐNG NUÔI CẤY *IN VITRO* VÀ TẠO RỄ TƠ Ở CÂY Ô ĐẦU

3.2.1. Thiết lập hệ thống nuôi cấy *in vitro* phục vụ chuyển gen ở cây Ô đầu

3.2.1.1. Tạo vật liệu khởi đầu cho nuôi cấy *in vitro* từ đoạn thân cây Ô đầu

Trong quá trình nuôi cấy *in vitro* ở thực vật, khử trùng mẫu là bước đầu tiên và cũng là bước quan trọng. Đối với bước khử trùng mẫu, sự lựa chọn loại hóa chất, nồng độ và thời gian khử trùng sẽ ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả khử trùng. Trong nghiên cứu này, dung dịch HgCl_2 0,1% được sử dụng làm chất khử trùng bề mặt với thời gian xử lý khác nhau: 3 phút, 5 phút, 7 phút, 9 phút và 11 phút. Kết quả thể hiện ở bảng 3.1 và hình 3.8.

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đến quá trình tạo vật liệu khởi đầu cho nuôi cấy *in vitro* từ đoạn thân cây Ô đầu cho thấy thời gian khử trùng tăng lên đã làm giảm khả năng nhiễm của mẫu, cao nhất ở thời gian xử lý mẫu 9 phút cho tỷ lệ mẫu không bị nhiễm là 91,36 %, thấp nhất ở thời gian xử lý mẫu 3 phút cho tỷ lệ mẫu không bị nhiễm là 26,27%, chồi mập, dài và xanh bình thường. Tuy nhiên, chất lượng chồi của mẫu lại tỷ lệ nghịch với thời gian khử trùng. Thời gian xử lý mẫu càng cao thì chồi mầm có sức sống giảm, chồi nhỏ, ngắn và màu vàng (trên 9 phút). Như vậy, trong thí nghiệm này, thời gian khử trùng

9 phút là thích hợp thể hiện ở tỷ lệ mẫu nảy chồi không bị nhiễm cao nhất và các chồi mầm có chất lượng tốt hơn so với các công thức còn lại.

Bảng 3.1. Kết quả tạo vật liệu khởi đầu cho nuôi cấy *in vitro* từ đoạn thân cây Ô đầu (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu nảy chồi nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu nảy chồi không bị nhiễm (%)	Chất lượng chồi
CT1	3	73,73 ^d	26,27 ^a	++
CT2	5	43,88 ^c	56,12 ^b	++
CT3	7	18,95 ^b	81,05 ^c	++
CT4	9	8,64 ^a	91,36 ^d	++
CT5	11	48,66 ^c	51,34 ^b	+

Ghi chú: Chồi tốt là chồi mập, dài, xanh bình thường (++); Chồi kém là chồi nhỏ, ngắn, vàng (+). Các chữ cái khác nhau trong các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) bằng Test Duncan; $n = 30$.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của HgCl_2 0,1% sau thời gian khử trùng 9 phút đến sự phát sinh chồi từ đoạn thân ở cây Ô đầu sau 4 tuần

3.2.1.2. Cầm ứng đa chồi và tạo cây Ô đầu *in vitro*

Ảnh hưởng của BAP và kinetin đến phát sinh chồi cây Ô đầu

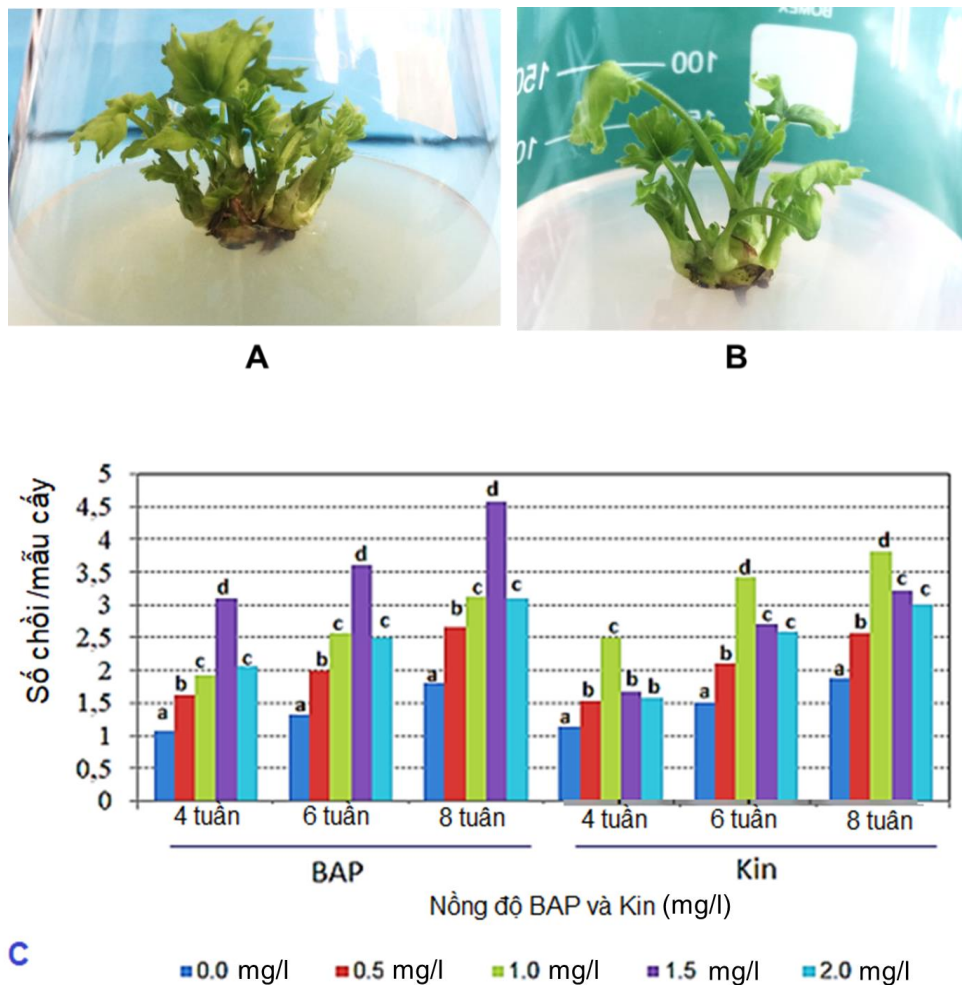
Các mẫu cấy là các đoạn thân mang đốt của cây Ô đầu được nuôi cấy trên môi trường với các nồng độ cytokinin khác nhau (BAP hoặc kinetin dao động từ 0 đến 2,0 mg/l).

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BAP và kinetin đến cảm ứng tạo chồi từ đoạn thân cây Ô đầu

Nồng độ (mg/l)	BAP			kinetin		
	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
Sau 4 tuần						
0,0	1,07 ^a ± 0,05	0,95 ^a ± 0,07	+	1,13 ^a ± 0,06	1,02 ^a ± 0,05	+
0,5	1,63 ^b ± 0,10	1,12 ^b ± 0,08	++	1,13 ^b ± 0,06	1,10 ^b ± 0,10	++
1,0	1,93 ^c ± 0,12	1,45 ^c ± 0,15	++	2,50^c ± 0,12	1,82^d ± 0,15	+++
1,5	3,10^d ± 0,15	1,85^d ± 0,18	+++	1,67 ^b ± 0,09	1,45 ^c ± 0,14	++
2,0	2,07 ^c ± 0,10	1,55 ^c ± 0,12	+	1,57 ^b ± 0,10	1,39 ^c ± 0,12	+
Sau 6 tuần						
0,0	1,33 ^a ± 0,09	1,18 ^a ± 0,06	+	1,50 ^a ± 0,09	1,10 ^a ± 0,09	+
0,5	2,00 ^b ± 0,12	1,43 ^b ± 0,10	+	2,10 ^b ± 0,11	1,36 ^b ± 0,19	+
1,0	2,57 ^c ± 0,10	1,88 ^c ± 0,16	++	3,43^d ± 0,16	2,68^d ± 0,21	+++
1,5	3,60^d ± 0,13	2,80^d ± 0,21	+++	2,70 ^c ± 0,10	1,68 ^c ± 0,17	++
2,0	2,50 ^c ± 0,09	1,85 ^c ± 0,15	++	2,60 ^c ± 0,09	1,65 ^c ± 0,15	++
Sau 8 tuần						
0,0	1,80 ^a ± 0,10	1,67 ^a ± 0,09	+	1,87 ^a ± 0,08	1,62 ^a ± 0,10	+
0,5	2,67 ^b ± 0,10	2,13 ^b ± 0,11	+	2,57 ^b ± 0,10	2,07 ^b ± 0,13	+
1,0	3,13 ^c ± 0,10	2,58 ^c ± 0,13	++	3,80^d ± 0,14	3,38^d ± 0,18	+++
1,5	4,57^d ± 0,14	3,50^d ± 0,16	+++	3,20 ^c ± 0,09	2,35 ^c ± 0,15	++
2,0	3,10 ^c ± 0,10	2,55 ^c ± 0,12	++	3,00 ^c ± 0,11	2,37 ^c ± 0,16	++

Ghi chú: Chồi sinh trưởng tốt là chồi mập, lá to màu xanh đậm (+++); Chồi sinh trưởng trung bình là chồi nhỏ, lá nhỏ màu xanh nhạt (++); Chồi sinh trưởng kém là chồi nhỏ, lá nhỏ màu vàng (+). Các chữ cái khác nhau trong các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) bằng Test Duncan; $n = 30$.

Trong số 5 nồng độ được thử nghiệm, BAP ở 1,5 mg/l là hiệu quả nhất. Số chồi cao nhất trên mỗi mẫu sau 4, 6 và 8 tuần nuôi cấy lần lượt là $3,10 \pm 0,15$, $3,60 \pm 0,13$ và $4,57 \pm 0,14$ (chồi/mẫu). Kết quả tái sinh chồi ở 5 nồng độ kinetin cho thấy số chồi cao nhất thu được khi sử dụng kinetin 1,0 mg/l sau 4, 6, và 8 tuần là $2,50 \pm 0,12$, $3,43 \pm 0,16$ và $3,80 \pm 0,14$ (chồi/mẫu) ($P < 0,05$). Do đó, nồng độ BAP 1,5 mg/l và kinetin 1,0 mg/l thích hợp cho tái sinh đa chồi *in vitro* từ mẫu cấy là đoạn thân mang đốt ($p < 0,05$) (Bảng 3.2).



Hình 3.9. So sánh khả năng cảm ứng tạo chồi từ mô phân sinh của các mẫu cấy sau 8 tuần. A: Môi trường MS cơ bản + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + BAP 1,5 mg/l; B: Môi trường MS cơ bản + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + kinetin 1,0 mg/l; C: Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin. Các chữ cái khác nhau phía trên các cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được kiểm tra bằng Duncan (SPSS); $n = 30$.

Như vậy, môi trường MS cơ bản được bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l và BAP 1,5 mg/l cho số lượng chồi/mẫu cấy là cao nhất ($4,57 \pm 0,14$; sau 8 tuần nuôi cấy). Trong số hai cytokinin được thử nghiệm thì BAP cho hiệu quả hơn so với kinetin trong cảm ứng tạo đa chồi và số lượng chồi được tạo cao hơn so với kinetin ($P < 0,05$) (Hình 3.9).

Ảnh hưởng của α -NAA và IBA đến sự phát sinh rễ in vitro ở cây Ô đầu

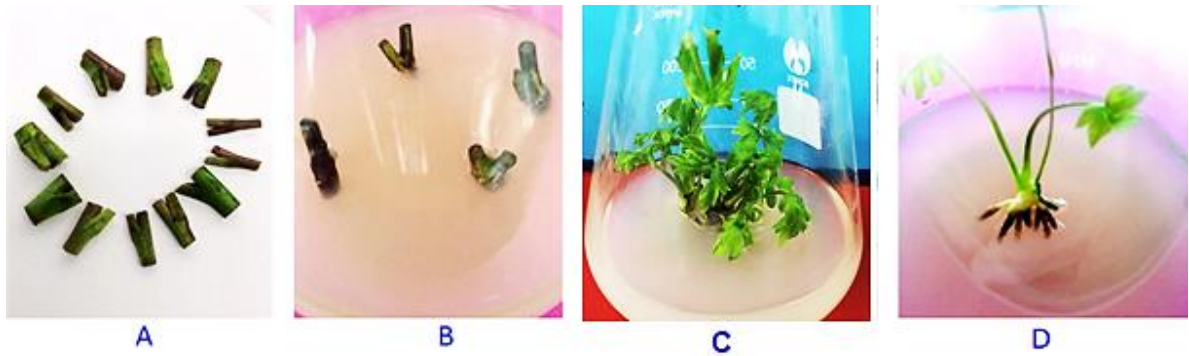
α - NAA và IBA là các chất kích thích sinh trưởng nhóm auxin, được đưa vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng cường quá trình sinh tổng hợp và trao đổi chất, thúc đẩy sự sinh trưởng của tế bào. Trong thí nghiệm này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của α - NAA và IBA đến sự phát sinh rễ ở cây Ô đầu. Sau khi đã tạo được đa chồi, chồi cao khoảng 2 - 3 cm được cắt bỏ bớt lá và cấy vào môi trường tạo rễ. Chồi được cấy vào môi trường MS cơ bản có bổ sung đồng đều sucrose 30 g/l, agar 9 g/l và bổ sung chất kích thích sinh trưởng α -NAA và IBA 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 (mg/l). Theo dõi sự phát sinh rễ và chất lượng rễ của các chồi sau 4, 6 và 8 tuần, kết quả được thể hiện ở bảng 3.3.

Bảng 3.3 cho thấy α -NAA và IBA ảnh hưởng khác nhau đến kết quả cảm ứng tạo rễ của cây *in vitro*. Sau 4, 6, 8 tuần nuôi cấy nồng độ α -NAA 0,7 mg/l và IBA 0,5 mg/l đều cho số rễ/chồi cao nhất. Trong số các nồng độ IBA khác nhau được thử nghiệm, khả năng tạo rễ trong ống nghiệm tối đa của mỗi chồi với môi trường MS bổ sung IBA 0,5 mg/l và cao nhất là $3,6 \pm 0,16$ rễ/chồi và rễ phát triển tốt, rễ dài, mập; trong khi đó, khả năng tạo rễ *in vitro* tối đa của mỗi chồi trong môi trường MS được bổ sung α -NAA 0,7 mg/l là $3,07 \pm 0,07$ (sau 8 tuần nuôi cấy). Một số ít rễ đã được quan sát thấy trong các chồi ở các nồng độ α -NAA và IBA khác nhau, nhưng ở công thức không bổ sung α -NAA và IBA không quan sát thấy rễ phát sinh từ chồi sau 4, 6, 8 tuần. Như vậy, từ các đoạn thân mang đốt của cây Ô đầu có thể tái sinh chồi, ra rễ và tạo cây *in vitro* trong ống nghiệm trên môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng α -NAA và IBA (Hình 3.10).

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của α -NAA và IBA đến sự tạo rễ của chồi Ô đầu trên môi trường MS cơ bản

Nồng độ (mg/l)	α -NAA			IBA		
	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
Sau 4 tuần						
0,0	0	0		0	0	
0,3	$0,60^a \pm 0,13$	$0,23^a \pm 0,13$	+	$0,60^a \pm 0,13$	$0,75^a \pm 0,12$	+
0,5	$1,13^b \pm 0,13$	$0,77^b \pm 0,12$	++	$1,87^c \pm 0,17$	$1,60^c \pm 0,15$	++
0,7	$1,40^c \pm 0,16$	$1,22^c \pm 0,16$	+++	$1,20^b \pm 0,17$	$1,38^b \pm 0,14$	+
0,9	$1,07^b \pm 0,15$	$0,85^b \pm 0,14$	+	$1,20^b \pm 0,11$	$1,35^b \pm 0,17$	+
Sau 6 tuần						
0,0	0	0		0	0	
0,3	$1,07^a \pm 0,12$	$1,13^a \pm 0,13$	++	$1,20^a \pm 0,20$	$1,57^a \pm 0,11$	++
0,5	$2,33^c \pm 0,25$	$1,25^b \pm 0,15$	++	$2,53^d \pm 0,13$	$3,23^d \pm 0,14$	+++
0,7	$2,40^c \pm 0,13$	$1,80^c \pm 0,11$	+++	$1,47^b \pm 0,19$	$2,15^c \pm 0,16$	++
0,9	$1,27^b \pm 0,12$	$1,17^a \pm 0,11$	+	$1,93^c \pm 0,15$	$2,04^b \pm 0,12$	+
Sau 8 tuần						
0,0	0	0		0	0	
0,3	$1,53^a \pm 0,17$	$2,05^a \pm 0,15$	++	$1,73^a \pm 0,21$	$1,90^a \pm 0,14$	++
0,5	$2,73^c \pm 0,12$	$2,31^c \pm 0,12$	++	$3,60^d \pm 0,16$	$3,72^d \pm 0,20$	+++
0,7	$3,07^d \pm 0,07$	$2,98^d \pm 0,15$	+++	$2,27^b \pm 0,15$	$2,32^c \pm 0,14$	++
0,9	$1,87^b \pm 0,17$	$2,12^b \pm 0,10$	++	$2,87^c \pm 0,13$	$2,21^b \pm 0,08$	+

Ghi chú: Rễ tốt là rễ mập, dài, phân nhánh nhiều, màu trắng sữa hoặc trắng xanh (+++); Rễ trung bình là rễ nhỏ, dài, ít phân nhánh, màu trắng xanh (++); Rễ kém là rễ nhỏ, ngắn, không phân nhánh, màu vàng nâu (+). Các chữ cái khác nhau trong các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) bằng Test Duncan; $n = 30$.



Hình 310. Hình ảnh cảm ứng đa chồi từ các đoạn thân và tạo cây Ô đầu *in vitro* trên môi trường MS cơ bản bổ sung BAP 1,5 mg/l sau 8 tuần. A: Đoạn thân đã được khử trùng; B: Các mẫu cây trên môi trường đồng nuôi cấy; C: Đa chồi phát sinh từ đoạn thân; D: Cảm ứng tạo rễ *in vitro* trên môi trường MS cơ bản bổ sung IBA 0,5 mg/l

Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây in vitro và sự sinh trưởng của cây con ngoài vườn ươm

Việc lựa chọn giá thể phù hợp để ra cây ngoài vườn ươm là khâu quan trọng ảnh hưởng đến sự thành công của quá trình nuôi cấy *in vitro*. Giá thể phù hợp là giá thể cho tỷ lệ cây sống cao, sinh trưởng phát triển tốt. Trong điều kiện *in vitro*, cây con được nuôi cấy trong môi trường có đầy đủ chất dinh dưỡng, ánh sáng nhân tạo và vô trùng. Kết quả khảo sát giá thể trồng cây *in vitro* được trình bày ở bảng 3.4 và hình 3.11. Các cây con *in vitro* đạt chiều cao từ 4-5 cm, mọc 4-5 lá, 2-3 rễ, chiều dài rễ đạt từ 2-3 cm, rễ mập được đưa ra ngoài vườn ươm. Khi đưa cây con *in vitro* ra khỏi môi trường cần phải rửa sạch agar bám trên bề mặt rễ.

Sử dụng 3 loại giá thể để trồng thăm dò: Đất phù sa (CT1); đất phù sa + trấu hun + xơ dừa (tỷ lệ 2:1:2) (CT2); đất thịt trung bình (CT3). Kết quả theo dõi ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và chất lượng cây Ô đầu sau 4 tuần cho thấy, các loại giá thể khác nhau cho tỷ lệ cây sống và chất lượng cây khác nhau rõ rệt (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và chất lượng cây Ô đầu giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần

Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chất lượng cây
Đất phù sa	61,70 ^a	+
Đất phù sa + trấu hun + xơ dừa, tỷ lệ 2:1:2	93,56^c	+++
Đất thịt trung bình	79,23 ^b	++

Ghi chú: Cây sinh trưởng tốt là cây to, cao, phiến lá rộng, lá xanh đậm (+++); Cây sinh trưởng trung bình là cây thấp, lá xanh đậm (++); Cây sinh trưởng kém là cây nhỏ, thấp, lá nhỏ, lá xanh nhạt (+). Các chữ cái khác nhau trong các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) bằng Test Duncan; $n = 30$.



Hình 3.11. Cây Ô đầu chuyển ra trồng trên giá thể trong nhà lưới sau 4 tuần

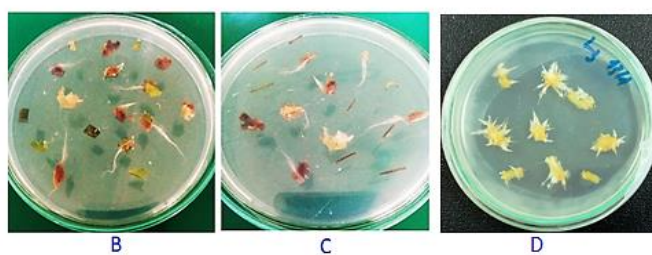
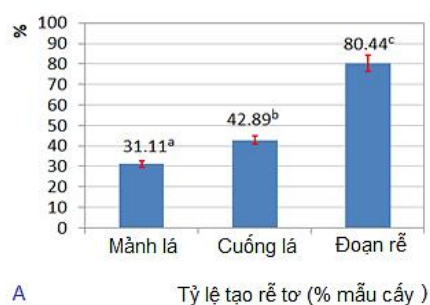
Tỷ lệ cây sống ở các giá thể sau 4 tuần trồng dao động từ 61,70-93,56%. Trên giá thể đất phù sa + trấu hun + xơ dừa (tỷ lệ 2:1:2), tỷ lệ sống đạt 93,56%, cây sinh trưởng phát triển tốt hơn so với các công thức khác, cây phát triển nhanh, cây hình thành thêm lá mới, có màu xanh đậm, không có hiện tượng rụng lá cũ. Những cây trồng trên giá thể đất thịt trung bình, tỷ lệ cây sống kém hơn đạt 79,23%, cây sinh trưởng phát triển bình thường, lá cây có màu xanh nhạt. Cây trồng trên giá thể đất phù sa, tỷ lệ cây sống thấp nhất chỉ đạt 61,70%, cây hầu như không phát triển trên giá thể này, không hình thành lá mới, lá cây có màu xanh nhạt, có hiện tượng rụng lá cũ. Vì vậy, giá thể đất phù sa + trấu

hun + xơ dừa (tỷ lệ 2:1:2) là phù hợp nhất để trồng cây Ô đầu con khi chuyển từ môi trường nuôi cấy *in vitro* ra ngoài vườn ươm.

3.2.2. Nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây Ô đầu

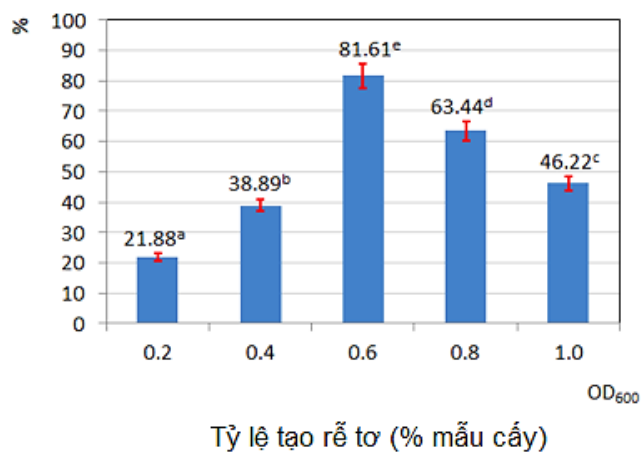
3.2.2.1. Cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* ở cây Ô đầu

Hướng tiếp cận tăng sinh khối bằng công nghệ nuôi cấy rễ tơ nhằm thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây được liệu hiện đang được quan tâm và ứng dụng có hiệu quả. Trong nghiên cứu này, bước đầu khảo sát và xác định điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ và nhân nuôi tăng sinh khối rễ tơ từ cây Ô đầu tạo cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm khai thác có hiệu quả các hợp chất có giá trị dược học từ cây Ô đầu.



Hình 3.12. Hình ảnh kết quả khảo sát vật liệu cảm ứng tạo rễ tơ Ô đầu. A: Biểu đồ tỷ lệ tạo rễ tơ của mẫu cây từ mảnh lá, cuống lá và đoạn rễ được lây nhiễm bởi chủng *R. rhizogenes* ATTC 15834 ($OD_{600} = 0,6$ và AS 100 $\mu\text{mol/l}$) trong 15 phút và đồng nuôi cấy trong 3 ngày. Các thanh dọc trên các cột thể hiện sai số tiêu chuẩn (SE); các số trên các cột là tỷ lệ tạo rễ tơ (% mẫu cấy). Các chữ cái khác nhau phía trên các cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được kiểm tra bằng Duncan; $n = 30$. B: Rễ tơ hình thành từ các mảnh lá; C: Rễ tơ hình thành từ cuống lá; D: Rễ tơ hình thành từ các đoạn rễ.

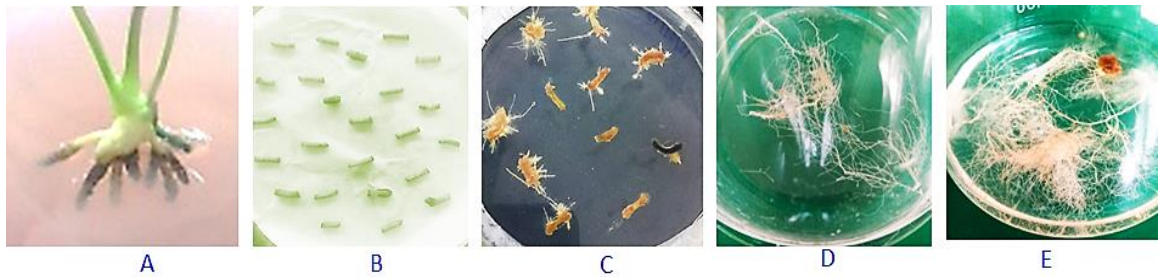
Sử dụng mảnh lá, cuống lá, các đoạn rễ của cây *in vitro* làm vật liệu cho cảm ứng tạo rễ tơ. Tiến hành lây nhiễm vật liệu bởi vi khuẩn *R. rhizogenes* với mật độ khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600} = 0,6$; nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$; thời gian lây nhiễm 15 phút, thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày, nồng độ kháng sinh diệt khuẩn cefotaxime 500 mg/l, kết quả khảo sát loại vật liệu thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ được thể hiện ở hình 3.12.



Hình 3.13. Cảm ứng tạo rễ tơ từ các đoạn rễ *in vitro* được lây nhiễm *R. rhizogenes* trong thời gian 6 tuần tại giá trị $OD_{600} = 0,6$ và AS 100 $\mu\text{mol/l}$ trong 15 phút, đồng nuôi cấy trong 3 ngày. Các thanh dọc trên các cột thể hiện sai số chuẩn; các số trên các cột là tỷ lệ tạo rễ tơ (% mẫu cấy). Các chữ cái khác nhau phía trên các cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được kiểm tra bằng Duncan; $n = 30$.

Như vậy, điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Ô đầu từ các đoạn rễ *in vitro* thông qua lây nhiễm chủng *R. rhizogenes* ATTC 15834 là $OD_{600} = 0,6$, thời gian nhiễm là 15 phút sau đó được đồng nuôi cấy trong 3 ngày trên MS + sucrose 30 g/l + cefotaxime 500 mg/l được bổ sung với AS 100 $\mu\text{mol/l}$.

Hình 3.14 mô tả tóm tắt quá trình cảm ứng tạo rễ tơ và nhân sinh khối rễ tơ.



Hình 3.14. Hình ảnh cảm ứng tạo rễ tơ từ đoạn rễ của cây Ô đầu *in vitro* trong môi trường MS. A: Rễ cây Ô đầu *in vitro* A; B: Các đoạn rễ bị nhiễm *R. rhizogenes* trên môi trường đồng nuôi cấy; C: Các dòng rễ tơ sau 6 tuần; D: Sinh khối rễ tơ Ô đầu sau 4 tuần trong môi trường lỏng chứa cefotaxime 500 mg/l; E: Sinh khối rễ tơ Ô đầu sau 6 tuần trong môi trường lỏng.

3.2.2.2. Khảo sát môi trường nhân nuôi tăng sinh khối rễ tơ Ô đầu

Tiến hành khảo sát ba trạng thái môi trường nhân nuôi sinh khối rễ tơ Ô đầu, đó là môi trường ở trạng thái rắn, bán lỏng và lỏng trong điều kiện lắc sau 6 tuần được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Sự sinh trưởng của rễ tơ Ô đầu sau 6 tuần trên các loại môi trường khác nhau

Trạng thái môi trường	Khối lượng rễ tơ tươi ban đầu (g/bình)	Sinh khối rễ tơ Ô đầu sau 6 tuần		
		Khối lượng rễ tơ tươi (g/bình)	Khối lượng rễ tơ tăng so với ban đầu (lần)	Khối lượng rễ tơ khô (g/bình)
Lỏng	0,55	$3,22^a \pm 0,33$	5,85	$0,339^A \pm 0,013$
Bán lỏng	0,55	$2,26^b \pm 0,02$	4,11	$0,213^B \pm 0,006$
Rắn	0,55	$1,64^c \pm 0,04$	2,98	$0,151^C \pm 0,002$

Ghi chú: các chữ cái khác nhau phía trên các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) với kết quả Test bằng Duncan; $n = 15$.

Bảng 3.5 cho thấy, rễ tơ nuôi trên môi trường lỏng có sinh khối rễ cao nhất (3,22 g khối lượng tươi/bình), tiếp theo là môi trường bán lỏng (2,26 g khối lượng

tươi/bình) và cuối cùng là môi trường rắn (1,64 g khối lượng tươi/bình). So với khối lượng ban đầu, sau 6 tuần, khối lượng rễ tơ được tạo ra trong môi trường lỏng, bán lỏng và rắn lần lượt tăng 5,85 lần, 4,11 lần và 2,98 lần. Khối lượng rễ tơ khô ở môi trường nuôi lắc lỏng là 0,39 g, môi trường lắc bán lỏng là 0,213 g và môi trường rắn là 0,151 g.

3.2.3. Thảo luận kết quả thiết lập hệ thống nuôi cấy *in vitro* và tạo rễ tơ ở cây Ô đầu

Quá trình biến nạp di truyền qua trung gian *A. tumefaciens*, hệ thống tái sinh *in vitro* có vai trò đặc biệt quan trọng trong việc quyết định sự thành công của quá trình chuyển gen vào mô và tái sinh cây chuyển gen và ở nghiên cứu này đoạn thân mang đốt của cây Ô đầu đã được chọn làm mẫu cấy để tái sinh chồi. Cách lựa chọn này phù hợp với các nghiên cứu ở một số loại cây trồng khác, vì các mẫu cấy chứa mô phân sinh [138] hoặc là vật liệu tái sinh từ mô sẹo [58]. Đối với chi *Aconitum*, báo cáo của Rawat và cs (2013) cho rằng hệ thống tái sinh *in vitro* từ cây Ô đầu được thực hiện từ mẫu cấy đoạn thân mang đốt. Cảm ứng đa chồi đạt được trên môi trường MS có bổ sung BAP 0,5 mg/l và naphthalene acetic acid (NAA) 0,1 mg/l, với tỷ lệ tái sinh thành công khoảng 85,43% [76]. Singh và cs (2020) đã báo cáo về việc nhân giống *in vitro* từ đoạn rễ của *Aconitum ferox*, một loại cây thuốc có nguy cơ tuyệt chủng trên dãy Himalaya. Các ngọn rễ *Aconitum ferox* được sử dụng để tạo mô sẹo sau đó được chuyển sang môi trường MS có bổ sung BAP để tái sinh chồi [96]. Trong nghiên cứu này, môi trường thích hợp để tạo đa chồi tái sinh từ các đoạn thân của cây Ô đầu là MS cơ bản được bổ sung BAP 1,5 mg/l hoặc kinetin 1,0 mg/l. Sau 8 tuần, ở môi trường MS cơ bản bổ sung BAP 1,5 mg/l tạo ra $4,57 \pm 0,14$ (chồi/mẫu), trong khi ở môi trường MS cơ bản bổ sung kinetin 1,0 mg/l tạo ra $3,80 \pm 0,14$ (chồi/mẫu). Do đó, môi trường MS bổ sung BAP 1,5 mg/l đã được chọn cho hệ thống tái sinh cây Ô đầu phục vụ chuyển gen.

Để tăng sinh khối và sản xuất các hoạt chất sinh học trong nuôi cấy rễ tơ của cây dược liệu, các nghiên cứu lây nhiễm *R. rhizogenes* vào mô cây dược liệu để tạo ra rễ tơ đã được quan tâm và nghiên cứu thành công với nhiều loài cây dược liệu

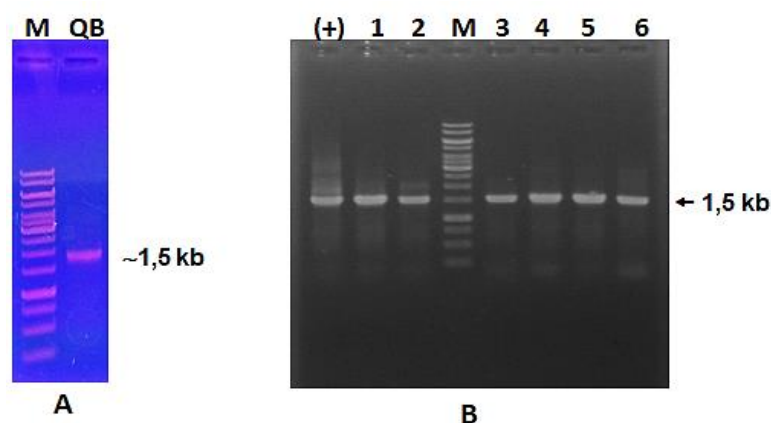
khác nhau [58], [76], [96]. Một hệ thống cảm ứng rễ tơ hiệu quả cho loài *Dracocephalum kotschy*, một cây thuốc có nguy cơ tuyệt chủng, đã được phát triển thông qua trung gian *R. rhizogenes*. Báo cáo này cho thấy tần số biến nạp đã tăng lên khi môi trường MS thiếu NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , KNO_3 và CaCl_2 , dẫn đến tần số cảm ứng tạo rễ tơ tăng từ 52,3% - 80,0% [25]. Đối với cây Thổ nhân sâm, rễ tơ được tạo từ mảnh lá lây nhiễm chủng *R. rhizogenes* LB510. Rễ tơ được nuôi cấy trong môi trường MS lỏng không có chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ sucrose khác nhau ảnh hưởng đến sự tích lũy sinh khối của rễ tơ và sinh khối tối đa đạt được của môi trường MS được bổ sung sucrose 6%, cao hơn khoảng 3 lần so với đối chứng [20]. Một quy trình tối ưu hóa cho sự biến nạp qua trung gian *R. rhizogenes* của đậu tương và khởi phát sự phát triển rễ tơ trong ống nghiệm từ lá mầm đã được mô tả bởi Chen và cs (2018) [87]. Sau 10-12 ngày bị nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy, rễ tơ được tạo ra trong môi trường nuôi cấy và 90-99 % mẫu cấy bị nhiễm khuẩn của 5 giống khác nhau đã tạo ra rễ tơ trong vòng một tháng. Đối với cây *A. heterozygous*, một loài thuộc chi *Aconitum*, cảm ứng tạo rễ tơ từ mô sẹo đã được nghiên cứu. Mô sẹo phôi bị nhiễm *R. rhizogenes* để tạo ra rễ tơ và sự phát triển tốt nhất của rễ tơ trên môi trường $\frac{1}{4}\text{MS}$ với sucrose 30 g/l [110]. Gần đây, đã có nhiều nghiên cứu được công bố về kết quả của việc tạo ra rễ tơ từ các cây dược liệu khác nhau, tuy nhiên, nghiên cứu về cảm ứng tạo rễ tơ ở các loài thuộc chi *Aconitum* rất hạn chế và chưa có nghiên cứu nào được công bố về cảm ứng tạo rễ tơ từ loài *A. carmichaelii*. Trong nghiên cứu này, rễ tơ được tạo ra từ các đoạn rễ của cây Ô đầu *in vitro* bằng lây nhiễm *R. rhizogenes*. Các đoạn rễ *in vitro* bị nhiễm *R. rhizogenes* với $\text{OD}_{600} = 0,6$ trong 15 phút, nuôi cấy trong 3 ngày trên môi trường MS (MS + sucrose 30 g/l + cefotaxime 500 mg/l) được bổ sung AS 100 $\mu\text{mol/l}$. Sau 6 tuần nuôi cấy, rễ tơ trong môi trường lỏng, ở điều kiện rung lắc làm tăng sinh khối rễ tơ cao nhất (3,18 g khối lượng tươi/bình), khối lượng rễ tơ tăng gấp 5,85 lần so với khối lượng rễ tươi ban đầu. Các hoạt chất trong rễ và củ của cây Ô đầu có rất nhiều giá trị y học và dược phẩm quan trọng, do đó, nghiên cứu tăng sinh khối rễ tơ là một hướng nghiên cứu đầy hứa hẹn để tăng thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây Ô đầu.

3.3. KẾT QUẢ PHÂN LẬP GEN, THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA FLAVONOID 3'5' HYDROXYLASE VÀ TẠO CHỦNG *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* MANG VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT

3.3.1. Phân lập gen *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu

Mẫu lá non từ cây Ô đầu được sử dụng để tách chiết RNA tổng số và xử lý bằng DNase. Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số bằng phản ứng phiên mã ngược. Khuếch đại gen *AcF3'5'H* (cDNA) bằng PCR với cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F*/*F3'5'H-NotI-R*, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR nhận gen *AcF3'5'H* thu được bằng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 1,5 kb, đúng như tính toán theo lý thuyết (Hình 3.15A). Sản phẩm PCR nhận bản gen *AcF3'5'H* tinh sạch được ghép nối vào vector tách dòng pBT (kích thước 2705 bp) để tạo vector tái tổ hợp *pBT_AcF3'5'H*. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào *E. coli* DH5 α , các khuẩn lạc được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh ampicillin, có chất cảm ứng IPTG và cơ chất X-Gal. Sáu dòng khuẩn lạc trắng được lựa chọn để tiến hành phản ứng colony-PCR nhằm kiểm tra sự có mặt của gen *AcF3'5'H*. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR ở hình 3.15B cho thấy một băng DNA có kích thước khoảng 1,5 kb là kích thước của gen *AcF3'5'H*. Các dòng khuẩn lạc cho kết quả dương tính với colony-PCR được nuôi tăng sinh và sử dụng để tách chiết plasmid phục vụ giải trình tự nucleotide.

Kết quả giải trình tự đoạn DNA từ plasmid tái tổ hợp *pBT_AcF3'5'H* trên thiết bị tự động và phân tích đã thu được trình tự nucleotide có kích thước 1521 bp. Kết quả phân tích bằng BLAST trong NCBI đã cho thấy đoạn DNA chính là trình tự nucleotide của đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu, có độ tương đồng 99,47% so với trình tự gen mang mã số JN635708.1 trên GenBank (Trình tự gen sử dụng để thiết kế cặp mồi PCR *F3'5'H-NcoI-F*/*F3'5'H-NotI-R*). Kết quả phân tích BLAST bước đầu kết luận đoạn gen phân lập từ cây Ô đầu thu tại huyện Quản Bạ, Hà Giang là gen *AcF3'5'H* mRNA của cây Ô đầu (Hình 3.16).



Hình 3.15. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose. A: Kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *AcF3'5'H* từ cDNA (M: Marker 1 kb; QB: Sản phẩm PCR nhân gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu thu tại Quận Bạ, Hà Giang); B: sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *AcF3'5'H* từ 6 dòng khuẩn lạc màu trắng (M: Marker 1 kb; Làn điện di từ số 1-6: sản phẩm colony-PCR)

☒ select all 20 sequences selected

[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of result](#)

		Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Aconitum carmichaelii flavonoid-3',5'-hydroxylase mRNA, co	2765	2765	100%	0.0	99.47%	JN635708.1
☒	Aconitum carmichaeli var. truppelianum flavonoid 3'5'-hydrox	2699	2699	100%	0.0	98.69%	KY272865.1
☒	Aconitum vilmorinianum flavonoid-3',5'-hydroxylase mRNA, c	2501	2501	99%	0.0	96.38%	JQ806761.1
☒	Delphinium chefoense flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) m	1701	1701	94%	0.0	88.12%	KX825847.1

Hình 3.16. Kết quả phân tích BLAST gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu

Trình tự đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* có kích thước 1521 bp mã hóa 506 amino acid. So với trình tự gen *F3'5'H* mang mã số JN635708, trình tự đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* phân lập từ loài Ô đầu thu từ huyện Quận Bạ, Hà Giang có 6 vị trí nucleotide sai khác, đó là các vị trí 96 (G → A), 736 (T → A), 839 (A → T), 973 (C → G), 1376 (G → C), 1513 (G → C) (Phụ lục 9).

Kết quả so trình tự amino acid suy diễn từ gen *AcF3'5'H* với protein suy diễn từ gen *F3'5'H* mang mã số JN635708.1 trên GenBank được thể hiện bảng 3.6 và phụ lục 10.

Bảng 3.6. Những vị trí sai khác về trình tự amino acid suy diễn của gen *AcF3'5'H* và trình tự gen mang mã số *JN635708.1*

TT	Vị trí nucleotide	<i>JN635708.1</i>	<i>AcF3'5'H</i>
1	246	F	I
2	280	N	I
3	317	E	V
4	325	L	V
5	459	G	A
6	481	F	Y
7	505	V	L

Bảng 3.6 cho thấy protein suy diễn từ đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu Quân Bạ, Hà Giang có sự sai khác ở 7 amino acid ở các vị trí 246, 280, 317, 325, 459, 481, 505. Sự sai khác về trình tự amino acid suy diễn của gen *AcF3'5'H* có ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme F3'5'H hay không cần có những nghiên cứu sâu hơn để làm sáng tỏ mối liên hệ này.

Từ dữ liệu trên NCBI và bằng chương trình phân tích tương đồng BLAST đã chọn được 15 trình tự gen *F3'5'H* trong 100 trình tự tập đầu để phân tích. Kết quả so sánh 15 trình tự *F3'5'H* cho thấy trình tự *F3'5'H* được nhân bản từ *A. carmichaelii* có quan hệ gần với các loài thuộc chi *Aconitum*, và chiếm từ 99% đến 100% phạm vi truy vấn và mức độ liên quan đến các loài thuộc chi *Aconitum*, với tổng điểm là 2501 đến 2765 và nhận dạng trình tự 96,38 đến 99,47% (Bảng 3.7).

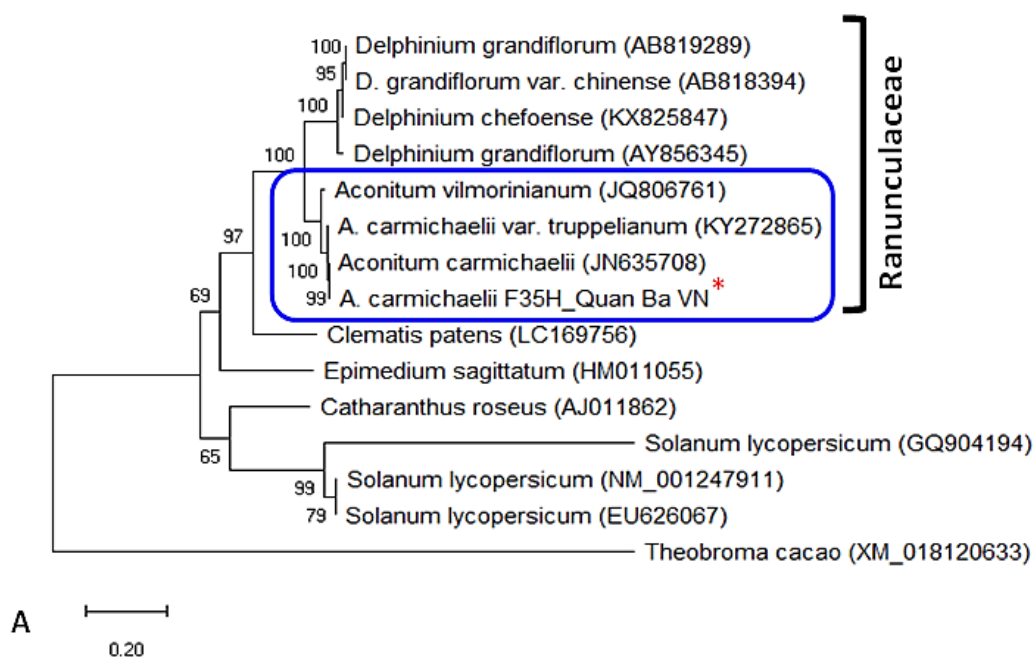
So với gen *F3'5'H* của các loài trong cùng họ Ranunculaceae, gen *AcF3'5'H* gần gũi hơn với gen *F3'5'H* của các loài thuộc chi *Delphinium* và *Clematis*, và có phạm vi truy vấn từ 93% đến 94% và liên quan đến các loài thuộc chi *Aconitum*, với điểm tổng là 876 đến 1701 và độ tương đồng là 86,52% đến 88,12%. Tuy nhiên, khi so sánh với các loài thuộc các họ khác, phạm vi truy vấn và điểm tổng thấp hơn nhiều, lần lượt là 2% đến 91% và điểm tổng là 54,7 đến 512.

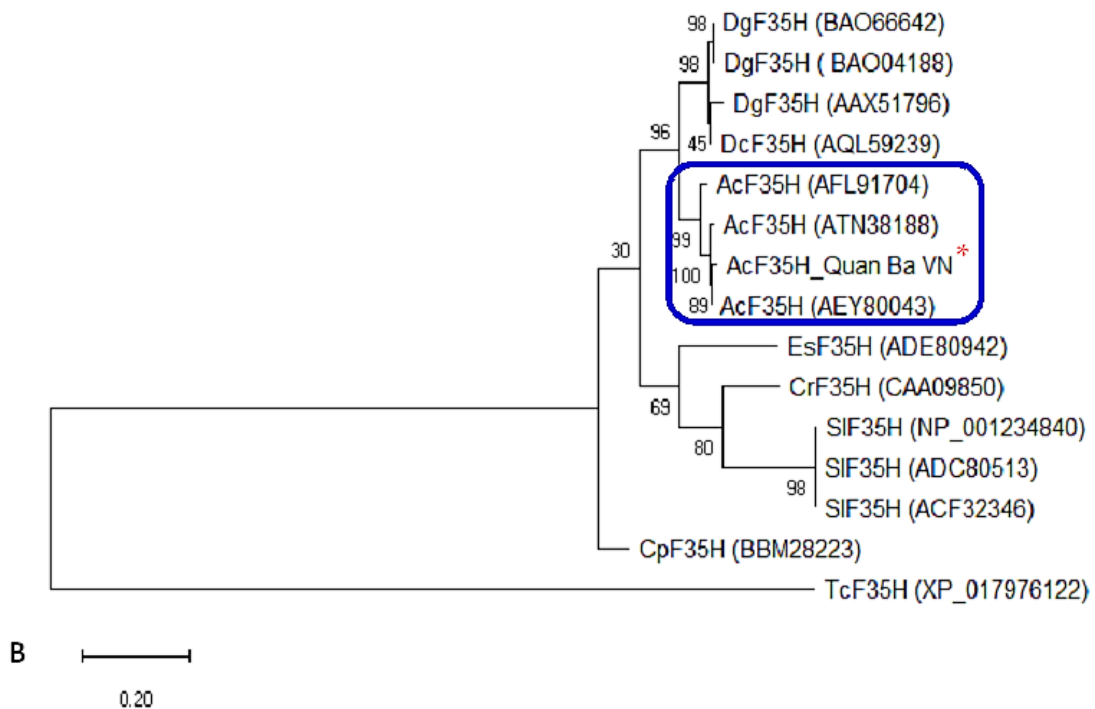
Bảng 3.7. Các đối tượng thực vật có trình tự gen $F3'5'H$ trong 100 trình tự xuất hiện nhiều nhất trong GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

TT	Loài	Mã số trên GenBank	Phạm vi truy vấn (%)	Điểm tổng	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Aconitum carmichaelii</i>	Quan Ba, Viet Nam			
2	<i>Aconitum carmichaelii</i>	JN635708	100%	2765	99,47%
3	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>truppelianum</i>	KY272865	100%	2699	98,69%
4	<i>Aconitum vilmorinianum</i>	JQ806761	99%	2501	96,38%
5	<i>Delphinium chefoense</i>	KX825847	94%	1701	88,12%
6	<i>Delphinium grandiflorum</i>	AY856345	95%	1698	87,81%
7	<i>D. grandiflorum</i> var. <i>chinense</i>	AB818394	98%	1657	86,59%
8	<i>Delphinium grandiflorum</i>	AB819289	98%	1652	86,52%
9	<i>Clematis patens</i>	LC169756	93%	876	77,90%
10	<i>Epimedium sagittatum</i>	HM011055	91%	512	73,65%
11	<i>Catharanthus roseus</i>	AJ011862	80%	343	72,56%
12	<i>Solanum lycopersicum</i>	EU626067	85%	278	70,88%
13	<i>Solanum lycopersicum</i>	NM_001247 911	85%	267	70,77%
14	<i>Solanum lycopersicum</i>	GQ904194	33%	200	73,89%
15	<i>Theobroma cacao</i>	XM_018120 633	2%	54.7	92,11%

Sự đa dạng của trình tự gen *F3'5'H* cũng được suy ra từ kết quả của phân tích tiến hóa phân tử bằng phần mềm MEGAX. Kết quả ở hình 3.17 cho thấy, gen *AcF3'5'H* của loài *A. carmichaelii* nằm cách xa gen *F3'5'H* của các họ thực vật khác (Hình 3.17A), và protein F3'5'H của loài thuộc chi *Aconitum* cũng cho thấy sự khác biệt tương tự (Hình 3.17B).

Từ các kết quả phân tích BLAST trong NCBI và phân tích sự phát sinh phân tử của gen *F3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu có thể khẳng định rằng đoạn gen phân lập từ cây Ô đầu thu tại Quán Bạ, Hà giang là gen *AcF3'5'H* của loài Ô đầu *A. carmichaelii*. Trình tự gen *AcF3'5'H* đã được đăng ký trên GenBank với mã số MZ339222.1.





Hình 3.17. Phân tích tiến hóa phân tử của gen *F3'5'H* (A) và protein F3'5'H (B) theo phương pháp Maximum Likelihood Method. Hệ số bootstrap (1000 lần lặp lại) được hiển thị bên cạnh các nhánh. **A:** Kết quả phân tích liên quan đến 15 trình tự nucleotide. Các vị trí mã hóa được bao gồm là 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. Tất cả các vị trí chứa khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã bị loại bỏ. Có tổng cộng 1482 vị trí trong tập dữ liệu cuối cùng. **B:** Kết quả phân tích liên quan đến trình tự 15 amino acid. Tất cả các vị trí chứa khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã bị loại bỏ. Có tổng cộng 488 vị trí trong tập dữ liệu cuối cùng. * Gen *AcF3'5'H* và protein F3'5'H của *A. carmichaelii*.

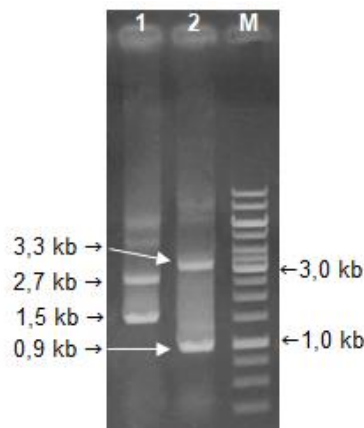
3.3.2. Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen *AcF3'5'H*

Để chuyển được gen *AcF3'5'H* vào thực vật và có thể kiểm tra biểu hiện sản phẩm protein tái tổ hợp của gen, chúng tôi đã thiết kế vector biểu hiện gen thực vật pCB301 mang promoter CaMV35S để điều khiển biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở thực vật. Các thí nghiệm tạo vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H* được thực hiện theo các bước như mô tả ở sơ đồ hình 2.2.

3.3.2.1. Tạo cấu trúc độc lập mang gen chuyển *AcF3'5'H*

Vector *pBT_AcF3'5'H* mang gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu thu tại huyện Quán Bạ, Hà Giang, vector trung gian *pRTRA7/3* chứa promoter CaMV35S có chức năng khởi động phiên mã, trình tự nucleotide xác định chuỗi peptide c-myc và trình tự nucleotide xác định đoạn KDEL phân lập từ virus gây khảm súp lơ.

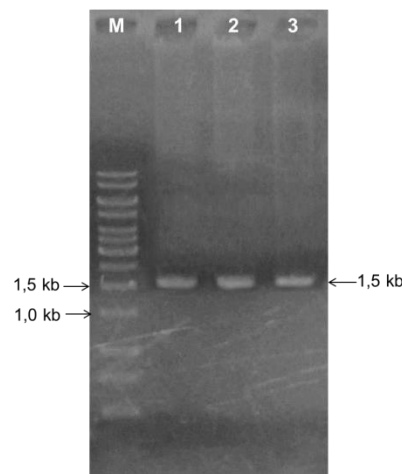
Tiến hành thí nghiệm xử lý song song vector tái tổ hợp *pBT_AcF3'5'H* và vector *pRTRA7/3* bằng cặp enzyme *NcoI/NotI* để nhận gen *AcF3'5'H* và vector mở vòng *pRTRA7/3* (Hình 3.18).



Hình 3.18. Điện di đồ sản phẩm cắt mở vòng *pBT_AcF3'5'H* và cắt *pRTRA7/3* bằng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI*. M: Marker 1 kb; 1: Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp *pBT_AcF3'5'H* bằng *NcoI/NotI*; 2: Sản phẩm cắt vector *pRTRA7/3* bằng *NcoI/NotI*.

Trên hình 3.18, ở làn điện di số 1 có hai băng điện di có kích thước 1,5 kb và 2,7 kb (làn điện di số 1), trong đó, phân đoạn DNA 1,5 kb chính là gen *AcF3'5'H* cần thu nhận. Sản phẩm cắt vector *pRTRA7/3* bằng cặp enzyme *NcoI/NotI* ở hình 3.12 (làn điện di số 2) cho thấy có 2 băng DNA trong đó, phân đoạn 3,3 kb chính là đoạn *pPTRA7/3* mở vòng mang các trình tự *35S_cmyc_KDEL* chứa promoter 35S, trình tự nucleotide mã hóa peptide c-myc và trình tự nucleotide mã hóa peptide KDEL. Cấu trúc *35S_cmyc_KDEL* sử dụng để thiết kế vector chuyển gen.

Ghép nối gen *AcF3'5'H* với vector *pRTRA7/3* mở vòng nhờ T4 DNA ligase tạo vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_AcF3'5'H* mang cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_KDEL_polyA*. Nhân dòng vector tái tổ hợp *pRTRA7/3_AcF3'5'H* trong *E. coli* DH5 α và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *AcF3'5'H* bằng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R* (Hình 3.19).



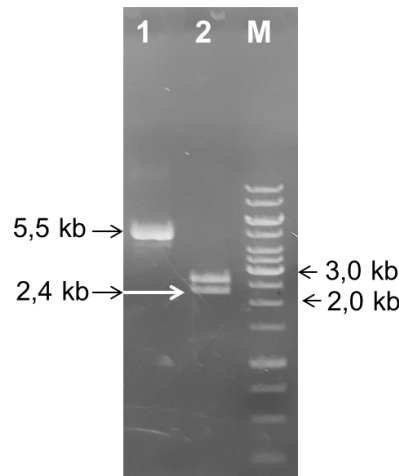
Hình 3.19. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *AcF3'5'H* từ các dòng khuẩn lạc *E. coli* DH5 α . M: Marker 1 kb; 1-3: Colony-PCR từ các dòng khuẩn lạc được biến nạp *pRTRA7/3_AcF3'5'H*

Kết quả điện di kiểm tra ở hình 3.19 cho thấy, cả 3 dòng khuẩn lạc đều xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 1,5 kb tương ứng với kích thước của gen *AcF3'5'H*. Như vậy, đã chọn được ba dòng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp mang gen *AcF3'5'H*. Plasmid tái tổ hợp *pRTRA_AcF3'5'H* tách chiết và tinh sạch từ các khuẩn lạc dương tính với colony-PCR được sử dụng để thu nhận cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* phục vụ tạo vector chuyển gen ở thực vật.

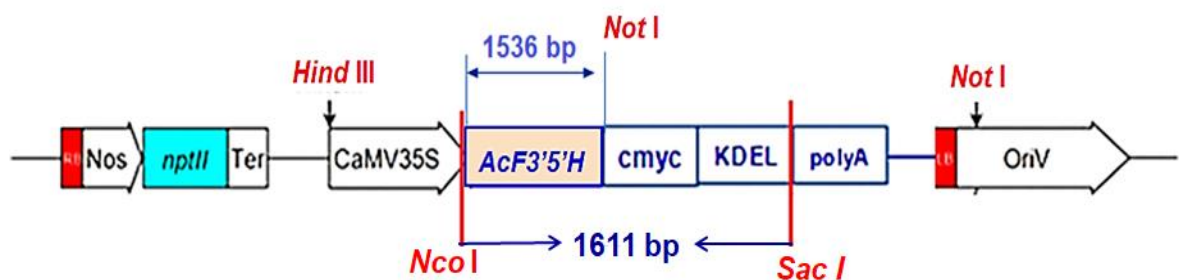
3.3.2.2. Tạo vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*

Sử dụng *HindIII* cắt vector *pRTRA7/3_AcF3'5'H* để thu nhận cấu trúc mang gen chuyển *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_KDEL_polyA* (2,4 kb) và vector chuyển gen mở vòng *pCB301* (5,5 kb) (Hình 3.20). Sử dụng T4 ligase để gắn cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_KDEL_polyA* vào vector *pCB301* tạo vector chuyển gen

pCB301_AcF3'5'H. Cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-SacI-R* được thiết kế cho PCR để nhân bản gen *AcF3'5'H* có kích thước 1536 bp. Trong vector *pCB301_AcF3'5'H* gen *AcF3'5'H* có 1536 bp, gắn thêm trình tự nucleotide mã hóa peptid cmyc (33 bp), KDEL (12 bp) và đoạn DNA chứa vị trí cắt của enzyme *SacI* (30 bp), cho nên đoạn DNA *AcF3'5'H_cmyc_KDEL* trong vector *pCB301_AcF3'5'H* có 1611 bp (Hình 3.21).

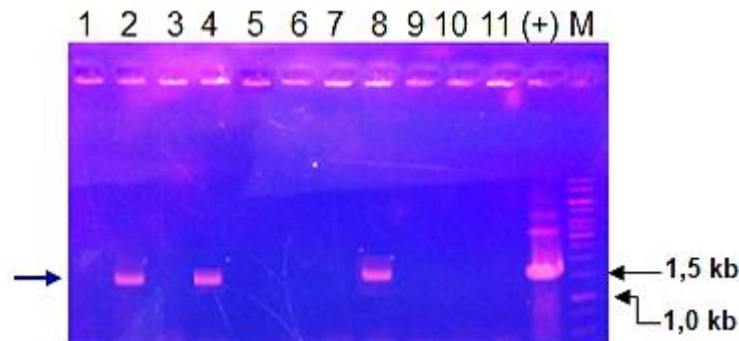


Hình 3.20. Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid bằng *HindIII*. M: Marker 1 kb; 1: plasmid *pCB301* được cắt bởi *HindIII*; 2: Plasmid *pRTRA7/3_AcF3'5'H* được cắt bởi *HindIII*.



Hình 3.21. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*. RB: Bờ phải; *Nos*: Tổng hợp nopalín; *nptII*: gen kháng kanamycin; *Ter*: terminator; *CaMV35S*: promoter *CaMV35S*; *AcF3'5'H*: gen Flavonoid 3'5'hydroxylase (*AcF3'5'H*) phân lập từ cây Ô đầu; *cmyc*: trình tự nucleotide mã hoá peptid c-myc; *KDEL*: trình tự nucleotide mã hoá peptide KDEL; *poly A*: Chuỗi polyA; LB: Bờ trái; *OriV*: Vùng khởi động sao chép của *A. tumefaciens*; Các vị trí cắt của enzyme giới hạn *HindIII*, *NotI*, *NcoI*, *SacI* được hiện thị trên sơ đồ.

Biến nạp *pCB301_AcF3'5'H* vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α để nhân dòng và chọn dòng *E. coli* DH5 α sau khi biến nạp nuôi trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin. Thực hiện phân tích bằng colony-PCR từ một số khuẩn lạc với cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R* để lựa chọn dòng *E. coli* DH5 α mang vector chuyển gen *AcF3'5'H* (Hình 3.22).



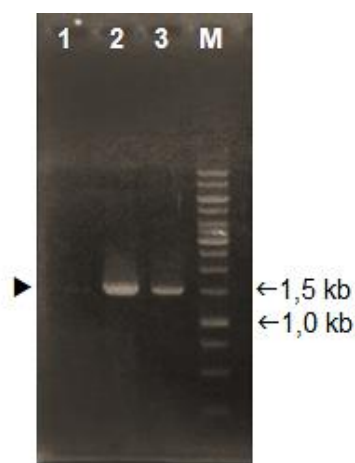
Hình 3.22. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *AcF3'5'H* từ khuẩn lạc *E. coli* tái tổ hợp. M: Marker 1 kb; 1-11: các dòng khuẩn lạc; (+): plasmid *pBT_AcF3'5'H*.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR ở hình 3.22 đã xác nhận các dòng vi khuẩn chứa vector tái tổ hợp *pCB301_AcF3'5'H*. Kết quả chọn dòng cho thấy, trong 11 dòng khuẩn lạc được kiểm tra có 3 dòng dương tính với colony-PCR. Những dòng khuẩn lạc dương tính này được nuôi trong LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc (kanamycin) để nhân dòng vector tái tổ hợp cho biến nạp vào *A. tumefaciens* phục vụ chuyển gen.

3.3.3. Tạo *A. tumefaciens* CV58 chứa vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*

Plasmid *pCB301_AcF3'5'H* tách chiết từ các dòng vi khuẩn *E. coli* dương tính với colony-PCR được tinh sạch, sau đó biến nạp vào *A. tumefaciens* CV58. Nuôi trong 48 giờ ở nhiệt độ 28°C và khi các khuẩn lạc xuất hiện trên mặt thạch thì tiến hành kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR cặp mồi đặc hiệu *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R* để chọn dòng khuẩn lạc mang vector chuyển gen *AcF3'5'H* (Hình 3.23). Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR ở hình 3.23 cho thấy, trong 3 dòng khuẩn lạc được kiểm tra có 2 dòng cho kết quả dương tính, trên gel điện di xuất hiện

một băng DNA duy nhất với kích thước khoảng 1,5 kb, tương ứng với kích thước của gen chuyển *AcF3'5'H*.



Hình 3.23. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR với cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R* từ các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* CV58. M: Marker 1 kb; 1, 2, 3: các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* CV58 chứa vector *pCB301_AcF3'5'H*.

Như vậy, vector chuyển gen thực vật *pCB301_AcF3'5'H* đã được thiết kế thành công và tạo được hai dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*. Các dòng *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen mang gen chuyển *AcF3'5'H* được lưu giữ phục vụ cho các thí nghiệm chuyển gen ở thực vật.

3.3.4. Thảo luận kết quả thiết kế vector biểu hiện gen *AcF3'5'H* và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen thực vật

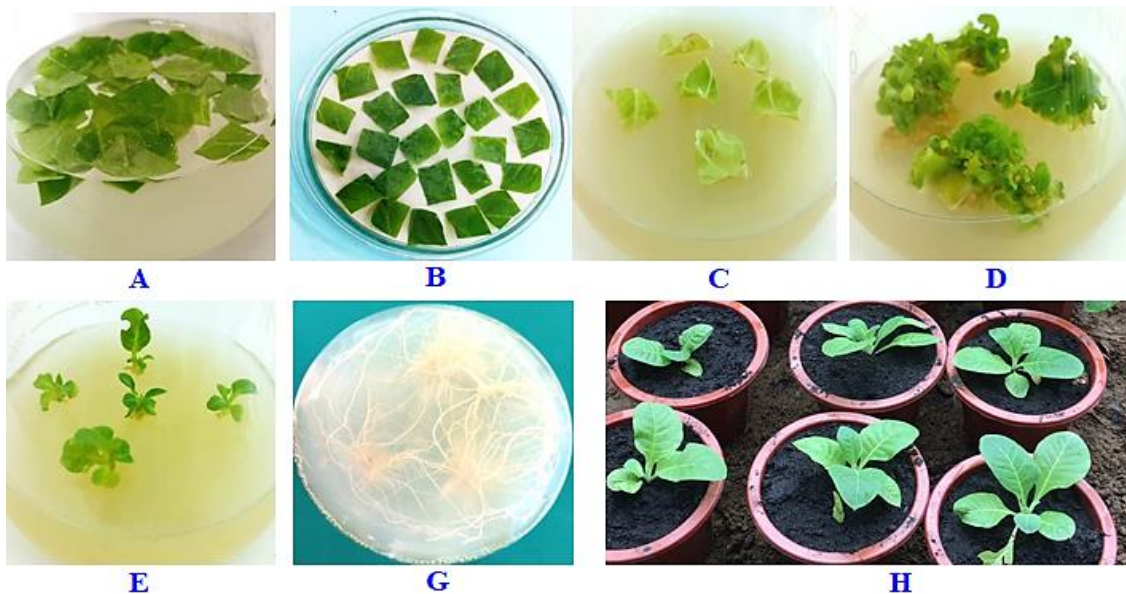
Sinh tổng hợp flavonoid là một con đường chuyển hóa thứ cấp quan trọng liên quan đến sự tham gia của nhiều enzyme, chẳng hạn như CHS, IFS, F3'H, F3'5'H, FLS và FST (Hình 1.3). Một số nghiên cứu về sự biểu hiện của các gen mã hóa các enzyme này làm tăng tích lũy flavonoid đã được thực hiện. Báo cáo của Hu và cs (2019) cho rằng, sự biểu hiện quá mức của *CHS* làm tăng sự tích lũy flavonoid trong thuốc lá và *CHS* là một gen ứng cử viên cho kỹ thuật di truyền để tăng cường khả năng chịu hạn của thực vật và cải thiện phản ứng của chúng đối với stress oxy hóa [32]. Vũ Thị Như Trang và cs (2018) đã chứng minh rằng sự biểu hiện của gen *GmCHI* từ đậu tương cho phép cây Thổ nhân sâm cải thiện hàm lượng flavonoid tổng số [146]. Trong số các enzyme quan trọng của con đường sinh tổng hợp

flavonoid, F3'5'H là enzyme quan trọng xúc tác cho các phản ứng hình thành flavonoid (Hình 1.3) [53], [126], [168]. Sự tăng hoạt động của F3'5'H cho phép tổng hợp anthocyanin và các loại flavonoid khác [178]. Vì vậy, tăng cường biểu hiện gen *F3'5'H* sẽ làm tăng hàm lượng và hoạt tính enzyme F3'5'H và sẽ làm tăng tích lũy hàm lượng flavonoid trong thực vật. Chính vì vậy, gen *Aconitum carmichaelii F3'5'H* (*AcF3'5'H*) được chọn làm đối tượng tác động và kỹ thuật chuyển gen được áp dụng nhằm làm tăng hàm lượng flavonoid trong chiến lược tạo cây Ô đầu có hàm lượng được chất cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được vùng mã hóa của gen *AcF3'5'H* có 1521 nucleotide, mã hóa cho 506 amino acid phân lập được từ cây Ô đầu (*A. carmichaelii*) thu tại tỉnh Hà Giang, Việt Nam phù hợp với công bố của Ma và cs (2012) [89]. Gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu mã hóa protein enzyme AcF3'5'H là một trong hai enzyme chìa khóa tham gia vào quá trình tổng hợp flavonoid và isoflavonoid trong con đường phenylpropanoid. Ở cây Ô đầu, hoạt động của gen *AcF3'5'H* mạnh nhất ở các mô lá, do vậy lựa chọn promoter điều khiển hoạt động của gen chuyển *AcF3'5'H* là rất quan trọng. Promoter CaMV35S (35S) là một promoter mạnh có nguồn gốc từ virus gây bệnh khảm lá súp lơ (Cauliflower Mosaic Virus - CaMV). Promoter 35S có thể khởi động phiên mã cho gen trong tất cả các loại mô bào thực vật. Trong nghiên cứu của chúng tôi, promoter 35S được lựa chọn và là thành phần của cấu trúc mang gen chuyển (*35S_AcF3'5'H_cmyc*) trong vector chuyển gen *pCB301*. Trong cấu trúc *pCB301_AcF3'5'H*, promoter CaMV35S khởi động phiên mã của gen chuyển *AcF3'5'H*, làm tăng tổng hợp enzyme AcF3'5'H trong cây chuyển gen. Trong vector chuyển gen, gen *nptII* được lựa chọn làm chỉ thị chọn lọc ở giai đoạn tái sinh *in vitro*. Gen *nptII* mã hóa protein có đặc tính kháng kháng sinh kanamycin. Kanamycin được bổ sung trong cả giai đoạn tái sinh chồi, kéo dài chồi và ra rễ của các cây Ô đầu được chuyển gen. Lúc này, cấu trúc mang gen chuyển có thêm đoạn DNA mã hóa kháng nguyên c-myc để làm cơ sở phát hiện và định lượng protein tái tổ hợp rAcF3'5'H trong cây chuyển gen bằng Western blot và ELISA. Như vậy, có thể thấy việc thiết kế cấu trúc hoàn chỉnh và phù hợp với tế bào chủ trong khâu thiết kế vector biểu hiện gen thực vật là cơ sở bước đầu quyết định sự thành công của kỹ thuật tạo cây biến đổi gen.

3.4. PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN *AcF3'5'H* Ở CÂY THUỐC LÁ

3.4.1. Biến nạp di truyền và biểu hiện protein tái tổ hợp F3'5'H ở cây Thuốc lá chuyển gen *AcF3'5'H*

Tiến hành biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* thông qua lây nhiễm bởi *A. tumefaciens* vào mô lá Thuốc lá (Hình 3.24). Kết quả thí nghiệm biến nạp trình bày ở bảng 3.8 cho thấy, sau 3 lần biến nạp ở lô thí nghiệm thu được 81 mẫu tạo cụm chồi và qua chọn lọc bằng kháng sinh có 268 chồi sống sót. Ở môi trường tạo rễ có 174 chồi ra rễ và chọn lọc được 96 cây để chuyển ra trồng trong bầu đất. Kết quả cuối cùng lựa chọn được 28 cây sống sót trong điều kiện nhà lưới. Lô đối chứng là các mảnh lá Thuốc lá không biến nạp tái sinh trong môi trường không có kháng sinh chọn lọc (ĐC0) và có kháng sinh (ĐC1). Lô ĐC0 chuyển 10 cây ra trồng trong chậu ở điều kiện nhà lưới. Ở lô ĐC1, các mảnh lá không tái sinh chồi trong môi trường chứa kanamycin. Các cây Thuốc lá chuyển gen và đối chứng không chuyển gen được sử dụng để phân tích sự có mặt và sự hoạt động của vector mang gen chuyển *AcF3'5'H*.



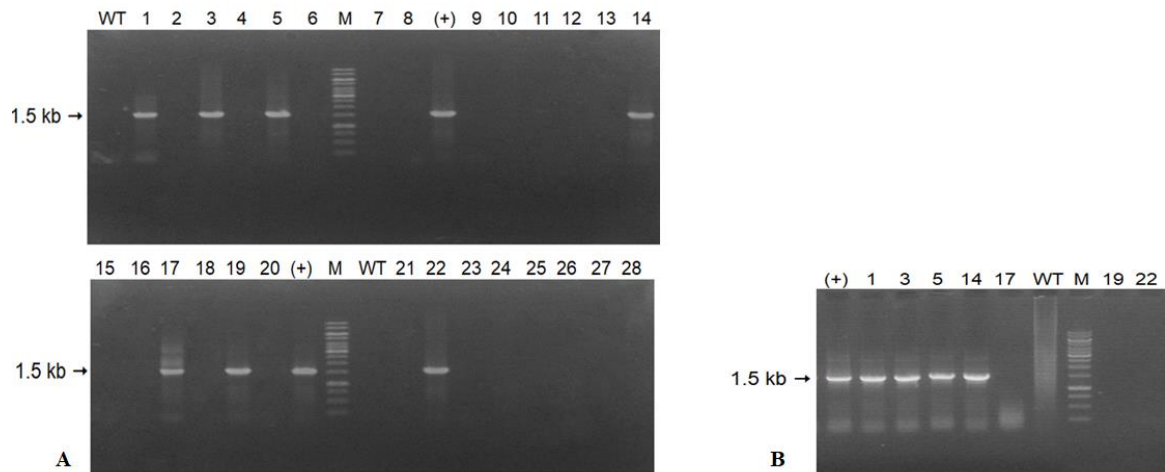
Hình 3.24. Hình ảnh biến nạp và tái sinh cây Thuốc lá chuyển gen *AcF3'5'H*. A: Các mảnh lá Thuốc lá trong dịch khuẩn; B: Đồng nuôi cấy trên môi trường CCM; C,D: Tái sinh đa chồi trong môi trường chọn lọc chứa kanamycin; E: Kéo dài chồi; G: Ra rễ trên môi trường RM; H: Cây Thuốc lá chuyển gen trồng trên giá thể.

Bảng 3.8. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* vào Thuốc lá

Thí nghiệm và đối chứng		Số mẫu	Số mẫu sống tạo cụm chồi	Tổng số chồi	Số chồi sống sót ra rễ	Số cây ra bầu đất	Số cây sống sót
Thí nghiệm	Lần biến nạp 1	30	29	96	63	35	11
	Lần biến nạp 2	30	27	87	57	30	8
	Lần biến nạp 3	30	25	85	54	31	9
Tổng		90	81	268	174	96	28
Đối chứng 0 (ĐC0)		30	30	95	57	41	10
Đối chứng 1 (ĐC1)		30	0	0	0	0	0

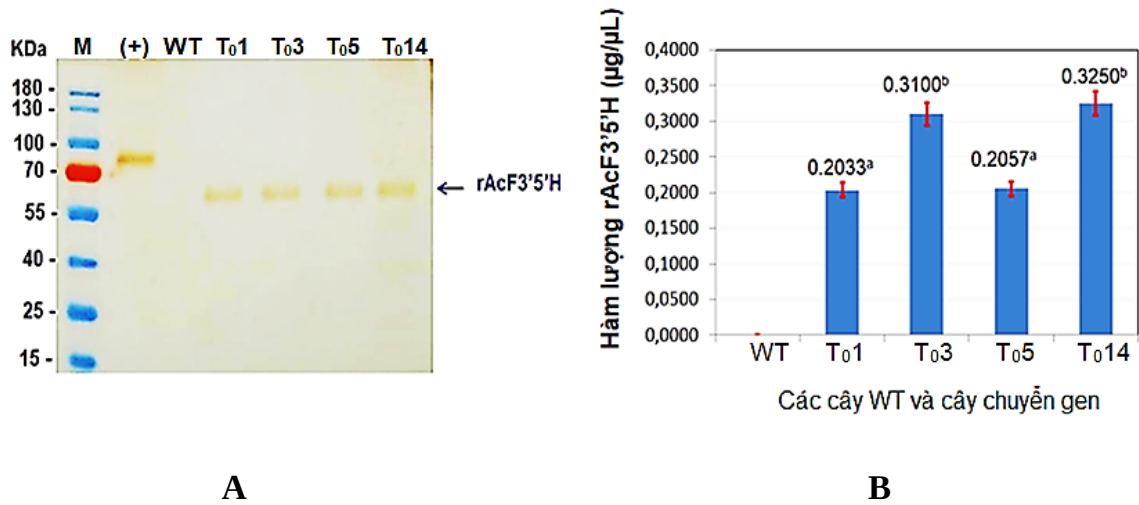
Ghi chú: ĐC1: Mẫu không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh. ĐC0: Mẫu không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh

Thu lá non của 28 cây Thuốc lá chuyển gen, tách chiết DNA tổng số và thực hiện phân tích sự có mặt của gen chuyển *AcF3'5'H* bằng PCR với cặp mồi *F3'5'H-NcoI-F/F3'5'H-NotI-R*. Kết quả cho thấy trong số 28 cây Thuốc lá chuyển gen *AcF3'5'H*, có 7 cây dương tính theo PCR, tương ứng với một băng DNA có kích thước xấp xỉ 1,5 kb xuất hiện ở các lần điện di 1, 3, 5, 14, 17, 19, và 22 (Hình 3.25 A). Các cây chuyển gen dương tính với PCR T₀₁, T₀₃, T₀₅, T₀₁₄, T₀₁₇, T₀₁₉ và T₀₂₂ được phân tích thêm bằng RT-PCR và kết quả phân tích cho thấy chỉ có các cây chuyển gen T₀₁, T₀₃, T₀₅ và T₀₁₄ mới có sản phẩm RT-PCR (Hình 3.25 B).



Hình 3.25. Điện di đồ kiểm tra sự có mặt và sự phiên mã của gen chuyển *AcF3'5'H* trong cây chuyển gen. A: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen chuyển *AcF3'5'H*. (+): plasmid *pCB301_AcF3'5'H*; WT: cây Thuốc lá không chuyển gen; M: Marker 1 kb; 1-28: Cây Thuốc lá chuyển gen. B: Hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR, khẳng định sự phiên mã của gen chuyển *AcF3'5'H* ở cây Thuốc lá chuyển gen. M: Marker 1 kb; (+): plasmid *pCB301_AcF3'5'H*; WT: cây Thuốc lá không chuyển gen; Các lần điện di 1, 3, 5, 14, 17, 19 và 22 là các cây chuyển gen đã dương tính với PCR, tương ứng với T₀1, T₀3, T₀5, T₀14, T₀17, T₀19 và T₀22.

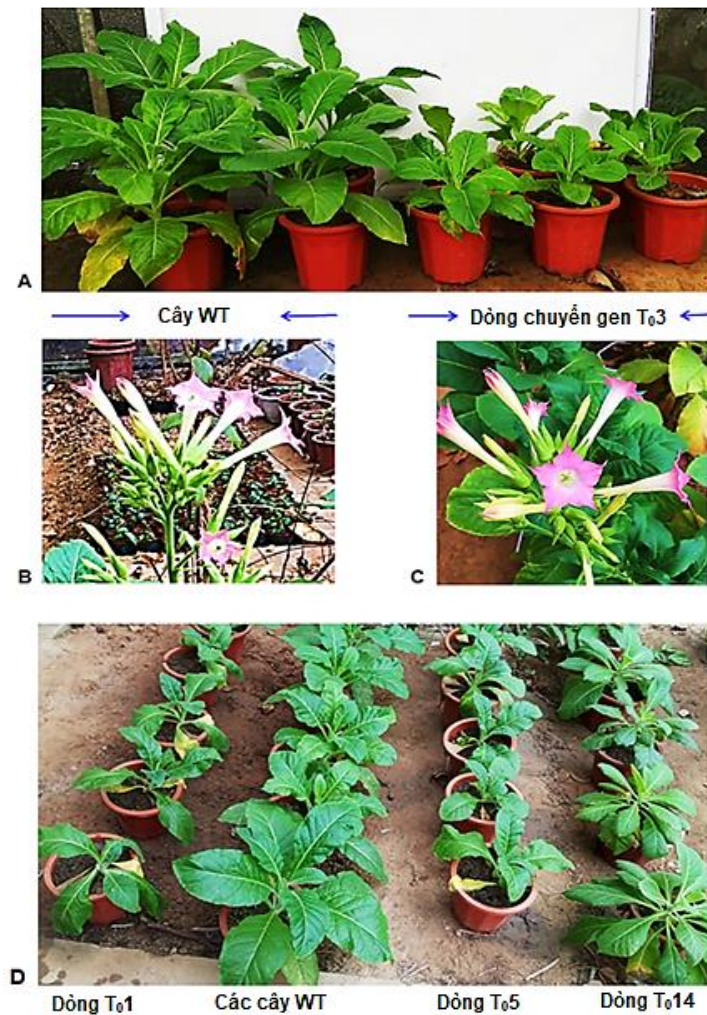
Sự biểu hiện của protein rAcF3'5'H từ cây chuyển gen T₀1, T₀3, T₀5 và T₀14 được phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Western blot, và kết quả thu được được thể hiện trong Hình 3.26A. Phân tích Western blot trong Hình 3.26A cho thấy tất cả các dòng chuyển gen T₀ đều có dải màu với kích thước xấp xỉ 57 kDa, tương ứng với khối lượng phân tử của protein rAcF3'5'H, bao gồm trình tự amino acid của c-myc và KDEL. Kết quả phân tích hàm lượng protein rAcF3'5'H trong Hình 3.26B cho thấy hàm lượng protein rAcF3'5'H của cây chuyển gen dao động từ 0,2033 µg/µl đến 0,3250 µg/µl (P < 0,001). Do đó, khi bổ sung protein F3'5'H nội sinh, hàm lượng protein F3'5'H trong cây chuyển gen tăng từ 20,33% lên 32,50% so với cây WT. Những kết quả này chứng minh rằng gen chuyển *AcF3'5'H* đã được kết hợp vào bộ gen cây thuốc lá chuyển gen và biểu hiện tạo protein tái tổ hợp.



Hình 3.26. Sự biểu hiện của protein rAcF3'5'H ở cây Thuốc lá chuyển gen thế hệ T₀. A: Phân tích sự biểu hiện của protein rAcF3'5'H bởi Western blot. M: Thang protein tiêu chuẩn; (+): Protein H5 của virus cúm A/H5N1 có gắn c-myc là đối chứng dương tính; WT: cây Thuốc lá không biến nạp; T₀₁, T₀₃, T₀₅ và T₀₁₄: các cây Thuốc lá chuyển gen. B: Hàm lượng protein rAcF3'5'H (µg/µl) trong cây Thuốc lá chuyển gen T₀. WT: cây Thuốc lá không chuyển gen; T₀₁, T₀₃, T₀₅, T₀₁₄: cây Thuốc lá chuyển gen. Các thanh dọc thể hiện sai số tiêu chuẩn. Các chữ cái khác nhau (a, b) phía trên các cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,001$) được kiểm tra bằng Duncan trong SPSS; $n = 3$.

3.4.2. Hàm lượng flavonoid tổng số trong lá của các dòng Thuốc lá chuyển gen

Kết quả quan sát các cây Thuốc lá chuyển gen và cây WT cho thấy các cây chuyển gen có hình thái và sự sinh trưởng bình thường. Tuy nhiên, các dòng chuyển gen có chiều cao cây thấp hơn và tốc độ tăng trưởng chậm hơn so với các cây WT. Ngoài ra, cánh hoa của các dòng chuyển gen có màu tím sẫm hơn so với cánh hoa của cây WT (Hình 3.27).



Hình 3.27. Hình thái của cây Thuốc lá WT và các dòng chuyển gen. A- Cây WT và dòng chuyển gen T₀₃; B- Hoa của cây WT; C- Hoa của dòng chuyển gen T₀₃; D- Cây WT và dòng chuyển gen T₀₁, T₀₅, T₀₁₄.

Hàm lượng flavonoid tổng số trong lá của 4 dòng Thuốc lá chuyển gen và cây WT đã được xác định và trình bày ở bảng 3.9. Kết quả phân tích cho thấy, bốn dòng chuyển gen, T₀₁, T₀₃, T₀₅ và T₀₁₄, có hàm lượng flavonoid từ $691,20 \pm 2,02$ đến $907,83 \pm 5,14$ ($\mu\text{g/g}$) và cao hơn từ 169,23 đến 222,27 (%) so với các cây WT ($408,43 \pm 5,11$ $\mu\text{g/g}$). Các kết quả phân tích này đã chứng minh rằng sự biểu hiện của gen *AcF3'5'H* ở 4 dòng Thuốc lá chuyển gen là T₀₁, T₀₃, T₀₅ và T₀₁₄ đã làm tăng hàm lượng flavonoid trong cây Thuốc lá chuyển gen.

Bảng 3.9. Hàm lượng flavonoid tổng số của các dòng Thuốc lá chuyển gen T₀1, T₀3, T₀5, T₀14 và cây đối chứng

Mẫu nghiên cứu	Hàm lượng flavonoid tổng số ($\mu\text{g/g}$)	Tăng so với WT (%)
WT	408,43 ^a $\pm$ 5,11	0
T ₀ 1	691,20 ^b $\pm$ 2,02	69,23
T ₀ 3	907,83 ^d $\pm$ 5,14	222,27
T ₀ 5	713,60 ^c $\pm$ 4,21	174,72
T ₀ 14	900,37 ^d $\pm$ 0,81	220,45

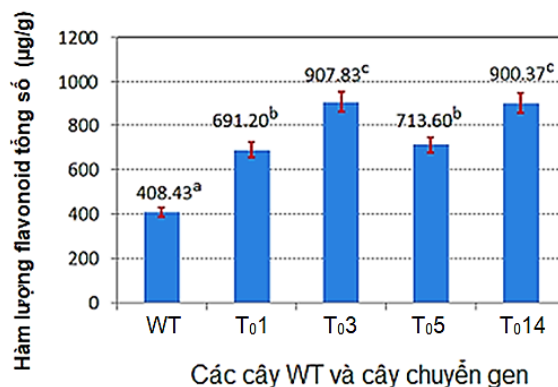
Ghi chú: Ký hiệu $\pm$ thể hiện sai số tiêu chuẩn. Các chữ cái khác nhau (a, b, c) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được đo bằng các thử nghiệm của Duncan (SPSS); $n = 3$.

Từ các kết quả phân tích trên cây Thuốc lá có thể rút ra nhận xét rằng vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H* hoạt động tốt trong cây thuốc lá chuyển gen và có thể sử dụng để chuyển vào cây Ô đầu và các cây trồng khác.

3.4.3. Thảo luận kết quả biến nạp và biểu hiện gen *AcF3'5'H* trong cây Thuốc lá

Các nghiên cứu về sự biểu hiện của gen *F3'5'H* có nguồn gốc từ các loài thực vật khác nhau hoặc phân tích biểu hiện quá mức gen chức năng đã được thực hiện. Theo hướng phân tích về sự biểu hiện quá mức của gen *F3'5'H*, Wu và cs (2020) cho thấy gen *GbF3'5'H1* có chức năng trong quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa liên quan đến flavonoid và sự biểu hiện quá mức của gen *GbF3'5'H1* cải thiện hàm lượng epicatechin và gallocatechin trong cây Bạch quả [170]. Trong nghiên cứu của chúng tôi về cây Ô đầu, thân và lá của cây được xác định như một nguồn dược liệu mới [175]. Lá và hoa của Ô đầu chứa carotenoid, sterol và flavonoid [12]. Như vậy, phân tích mối liên quan giữa sự biểu hiện của gen *F3'5'H* từ Ô đầu và sự tích tụ flavonoid trong các loài thực vật khác nhau là cần thiết. Thuốc lá được dùng làm cây mô hình nghiên cứu chức năng của gen thực vật và thử nghiệm ứng dụng để cải thiện

một số đặc tính của cây trồng. Gen mã hóa *F3'5'H* của cây Dạ yên thảo biểu hiện ở cây Thuốc lá đã làm thay đổi quá trình tổng hợp sắc tố anthocyanin [168]. Gen *CsF3'5'H* của cây chè được biểu hiện mạnh mẽ trong chồi và biểu hiện ở mức độ thấp trong rễ. Kết quả phân tích biểu hiện gen *CsF3'5'H* ở cây Thuốc lá cho thấy sự biểu hiện quá mức của gen *CsF3'5'H* đã tạo ra dẫn xuất delphinidin mới và làm tăng hàm lượng dẫn xuất cyanidin của cây Thuốc lá chuyển gen [178]. Trong nghiên cứu này, gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu được thiết kế tạo cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_KDEL_polyA* đã được chuyển vào mô Thuốc lá và tạo cây Thuốc lá chuyển gen *AcF3'5'H* và kết quả cho thấy protein tái tổ hợp rAcF3'5'H được biểu hiện trong bốn dòng Thuốc lá chuyển gen T₀1, T₀3, T₀5 và T₀14 (Hình 3.26). Hàm lượng flavonoid trong lá của các dòng Thuốc lá chuyển gen T₀1, T₀3, T₀5, T₀14 lần lượt đạt $691,20 \pm 2,02$, $907,83 \pm 5,14$, $713,60 \pm 4,21$ và $900,37 \pm 0,81$ (Bảng 3.9). So với ở cây không chuyển gen, hàm lượng flavonoid trong lá của các dòng Thuốc lá chuyển gen tăng từ 69,23% lên 222,27% (Hình 3.28).



Hình 3.28. Hàm lượng favonoid tổng số (µg/g) của 4 dòng Thuốc lá chuyển gen T₀1, T₀3, T₀5, T₀14, và cây WT. WT: cây Thuốc lá không biến nạp; T₀1, T₀3, T₀5, T₀14: cây Thuốc lá chuyển gen T₀. Các thanh dọc thể hiện sai số tiêu chuẩn. Các chữ cái khác nhau (a, b, c) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,001$) được kiểm tra bằng Duncan trong SPSS; $n = 3$.

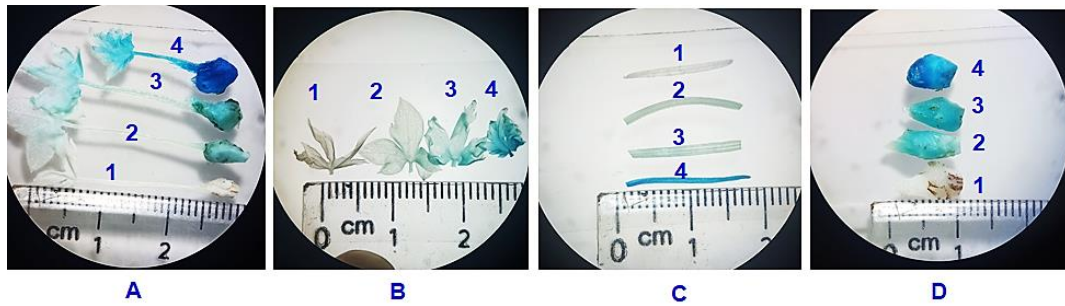
Trong phạm vi nghiên cứu này, hàm lượng flavonoid và hàm lượng protein tái tổ hợp rAcF3'5'H của 4 dòng Thuốc lá biến đổi gen có tương quan thuận, với hệ số

tương quan (R) = 99,09%; phương trình hồi quy là $Y = 1766,72X + 342,14$, trong đó Y là hàm lượng flavonoid ($\mu\text{g/g}$) và X là hàm lượng protein rAcF3'5'H ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ($P < 0,05$). Nghiên cứu của chúng tôi là báo cáo đầu tiên về kết quả biểu hiện của gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu trên cây Thuốc lá. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp rAcF3'5'H làm tăng hàm lượng flavonoid trong cây Thuốc lá chuyển gen. Do đó, gen *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu được nghiên cứu trong công trình này được coi là một gen ứng cử viên cho kỹ thuật di truyền để tăng cường tích lũy flavonoid trong thực vật.

3.5. BIẾN NẠP DI TRUYỀN VÀ PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN *AcF3'5'H* Ở CÂY Ô ĐẦU

3.5.1. Biến nạp gen *uidA* vào cây Ô đầu

Gen *uidA* mã hóa protein Beta-glucuronidase (EC:3.2.1.31; GUS), từ *E. coli*, chủng K12 được sử dụng như một gen chỉ thị trong nghiên cứu chuyển gen. Vector chuyển gen *pCB-gusplus* chứa gen chỉ thị *uidA* được sử dụng trong thí nghiệm chuyển gen vào cây Ô đầu thông qua lây nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58/pGV2260 mang vector chuyển gen *pCB-gusplus* vào chồi Ô đầu *in vitro*. Thí nghiệm nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *uidA*, như mật độ *A. tumefaciens*, nồng độ AS và thời gian lây nhiễm, và nồng độ kháng sinh chọn lọc đã được thực hiện. Thí nghiệm được tiến hành với 90 mẫu được lây nhiễm và lặp lại ba lần. Sau 2 tuần thu được 18 mẫu tạo chồi (đạt 18,88%) và chọn được 56 chồi chuyển sang môi trường bổ sung kháng sinh chọn lọc để kéo dài chồi. Sau 4 tuần, số chồi sống sót là 26 chồi được chuyển sang môi trường ra rễ, trong đó có 15 chồi ra rễ và chọn được 8 cây chuyển gen sống sót trong điều kiện nhà kính. Lá và rễ của tám cây được nhuộm bằng X-gluc để kiểm tra sự biểu hiện của gen *uidA*. Cả 8 cây đều dương tính, có màu xanh chàm đặc trưng trên lá và rễ (Hình 3.29), cho hiệu suất chuyển gen là 8,88%. Hình 3.29 cho thấy, sự biến nạp gen *uidA* thông qua lây nhiễm *A. tumefaciens* ở cây Ô đầu đạt hiệu quả cao ở mật độ khuẩn tương ứng với giá trị $\text{OD}_{600} = 0,8$; với nồng độ AS $100 \mu\text{mol/l}$; thời gian lây nhiễm 30 phút, nồng độ kháng sinh diệt khuẩn là 50 mg/l .

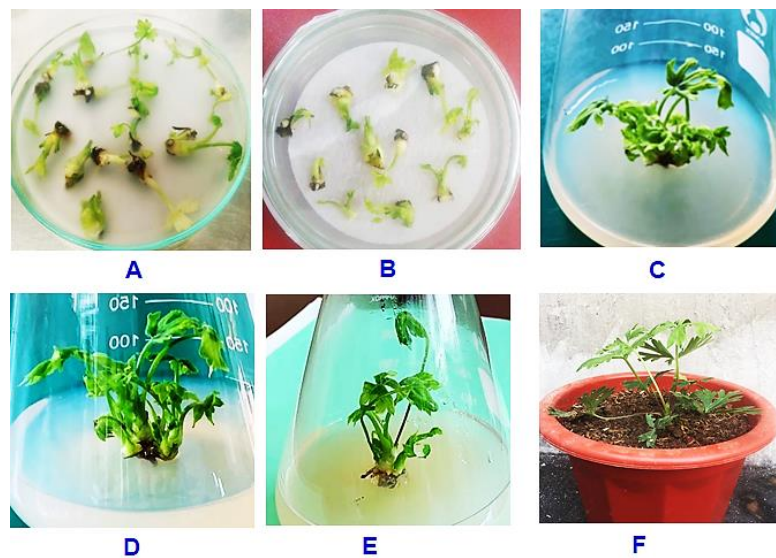


Hình 3.29. Kết quả phân tích nhuộm mô hóa GUS *in vitro* ở Ô đầu với mật độ *A. tumefaciens* (OD) khác nhau. 1: Ô đầu không biến nạp; 2: OD₆₀₀ = 0,4; 3: OD₆₀₀ = 0,6; 4: OD₆₀₀ = 0,8. (A) Cây Ô đầu nhuộm GUS; (B) lá Ô đầu nhuộm GUS; (C) Các cuống lá Ô đầu nhuộm GUS; (D) thân củ Ô đầu nhuộm GUS.

3.5.2. Biến nạp và biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu

3.5.2.1. Biến nạp di truyền cấu trúc *35S_AcF3'5'H_cmyc* vào cây Ô đầu

Trên cơ sở kết quả chuyển gen chỉ thị *uidA*, cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* được biến nạp vào chồi Ô đầu *in vitro* thông qua sự lây nhiễm của *A. tumefaciens* tái tổ hợp (Hình 3.30).



Hình 3.30. Hình ảnh biến nạp gen *AcF3'5'H* và tái sinh *in vitro* của cây Ô đầu. (A) Các chồi riêng lẻ được ngâm trong dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector *pCB301_AcF3'5'H*. (B) Đồng nuôi cấy trên CCM. (C) Cảm ứng tạo đa chồi trên SIM1 và SIM2. (D) Các chồi được nuôi cấy trên môi trường kéo dài chồi SEM; (E) Ra rễ trên môi trường RM. (F) Cây Ô đầu chuyển gen được trồng trong giá thể.

Trên bảng 3.10, sau ba lần biến nạp, với 180 mẫu ở các nhóm thí nghiệm, thu được 86 cụm chồi và 215 chồi sống chuyển sang môi trường SEM, bổ sung kháng sinh chọn lọc để kéo dài chồi và 95 chồi chuyển sang môi trường ra rễ RM. Kết quả chọn được 54 cây chuyển gen trồng vào giá thể. Trong số này, 24 cây sống sót trong điều kiện nhà kính. Song song với thí nghiệm chuyển gen, hai lô đối chứng là ĐC0 và ĐC1 cũng được thực hiện với 30 mẫu ở mỗi lô để so sánh. Ở lô đối chứng ĐC0, 30 mẫu cây chồi Ô đầu không biến nạp (WT) được tái sinh trong môi trường không có kháng sinh, tạo ra 116 chồi. Từ 92 chồi được chuyển sang môi trường ra rễ chọn được 30 cây chuyển gen được cấy vào bầu, trong đó có 10 cây sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà kính. Ở lô ĐC1, chồi Ô đầu không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh bổ sung kháng sinh, kết quả là các chồi không tạo cụm chồi. Các cây chuyển gen và cây WT được chuyển ra trồng trong chậu và sử dụng để phân tích sự có mặt và sự biểu hiện của gen chuyển *AcF3'5'H* (Hình 3.31).

Bảng 3.10. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* vào Ô đầu

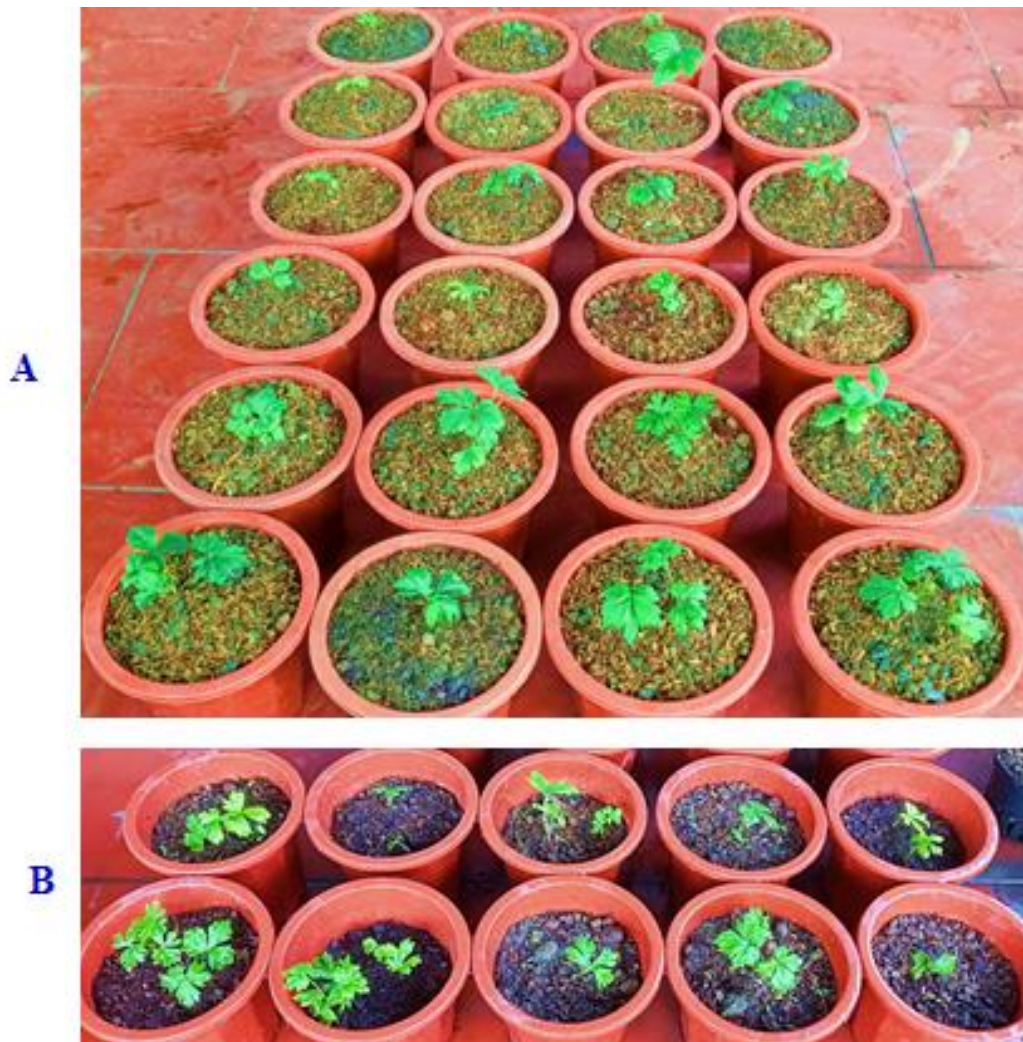
Thí nghiệm và đối chứng		Số mẫu	Số mẫu sống tạo cụm chồi	Tổng số chồi	Số chồi sống sót ra rễ	Số cây ra bầu đất	Số cây sống sót
Thí nghiệm	Lần biến nạp 1	60	25	68	26	15	6
	Lần biến nạp 2	60	32	77	38	21	9
	Lần biến nạp 3	60	29	70	31	18	9
Tổng		180	86	215	95	54	24
Đối chứng 0 (ĐC0)		30	30	116	92	30	10
Đối chứng 1 (ĐC1)		30	0	0	0	0	0

Ghi chú: ĐC1: Mẫu không biến nạp cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh. ĐC0: Mẫu không biến nạp cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh

3.5.2.2. Phân tích biểu hiện của gen chuyển *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu chuyển gen T_0

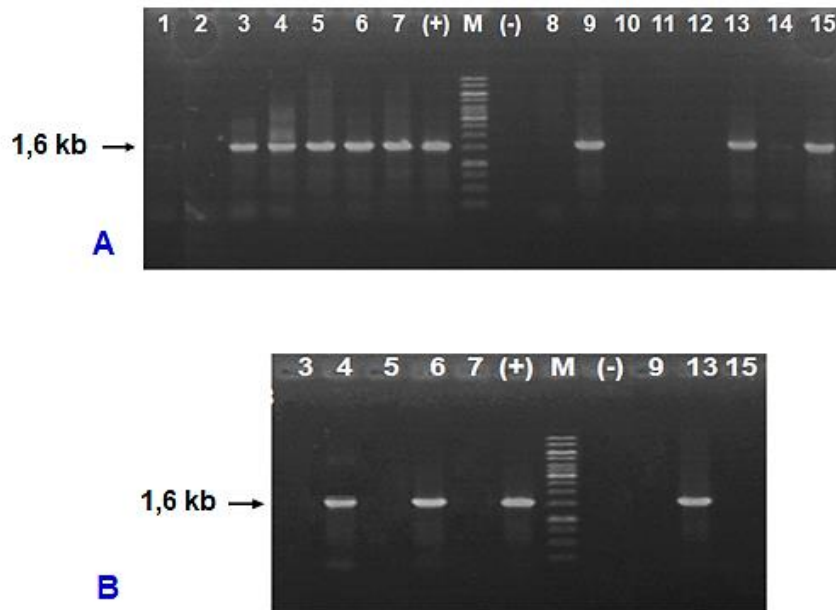
Mười lăm cây chuyển gen phát triển tốt được chọn để phân tích PCR nhằm xác nhận sự hiện diện của gen chuyển *AcF3'5'H* trong cây Ô đầu biến nạp. Các cây

ở thế hệ T_0 được ký hiệu từ T_0-1 đến T_0-15 . Kết quả phân tích PCR với cặp mồi $F3'5'H-NcoI-F/F3'H-SacI-R$ cho thấy 8 cây dương tính với gen chuyển; cụ thể là cây T_0-3 , T_0-4 , T_0-5 , T_0-6 , T_0-7 , T_0-9 , T_0-13 , và T_0-15 (Hình 3.32A). Tám cây T_0 được xác định là dương tính với PCR được tiếp tục phân tích bằng RT-PCR để xác nhận sự phiên mã của gen chuyển. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.32 B. Kết quả RT-PCR cho thấy chỉ 3 trong số 8 cây (T_0-4 , T_0-6 và T_0-13) có băng DNA với kích thước xấp xỉ 1,6 kb tương ứng với kích thước của $AcF3'5'H$.



Hình 3.31. Cây Ô đầu biến nạp ở thế hệ T_0 (A) và cây WT (B) sau 2 tuần kể từ khi chuyển từ bình nuôi cây sang chậu trong điều kiện nhà lưới

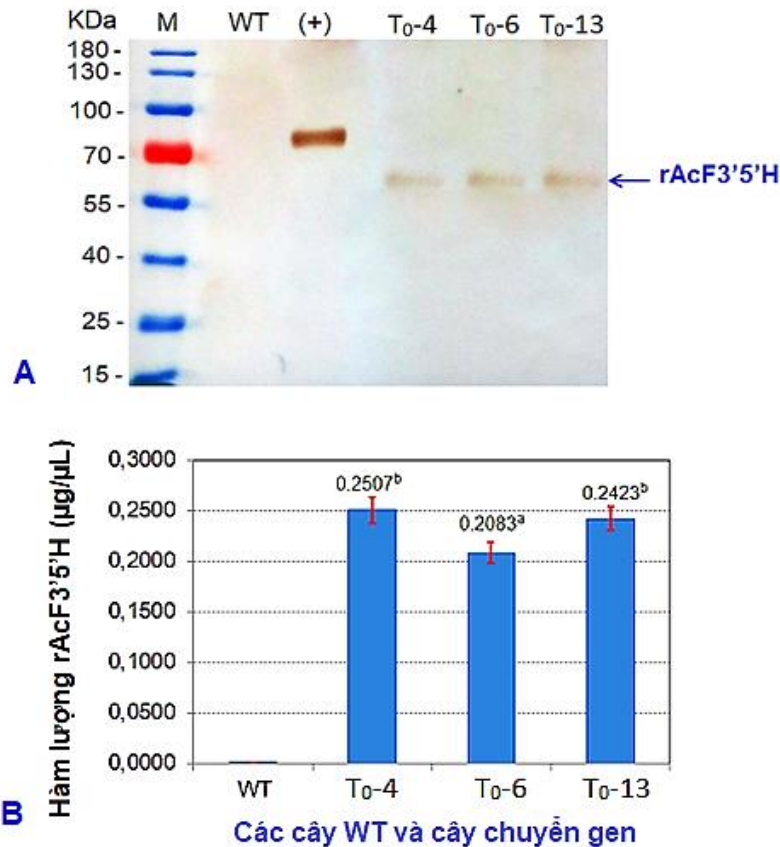
Những cây T₀-4, T₀-6 và T₀-13, được sử dụng để phân tích sự biểu hiện của protein rAcF3'5'H bằng điện di SDS-PAGE và phương pháp Western blot. Trong Hình 3.33A, cây T₀-4, T₀-6 và T₀-13 đều có băng màu với kích thước > 55 kDa tương ứng với trọng lượng phân tử của protein rAcF3'5'H.



Hình 3.32. Điện di đồ xác nhận sự hiện diện và sự phiên mã của gen chuyển *AcF3'5'H*. (A): PCR phát hiện sự hiện diện của gen chuyển *AcF3'5'H* trong cây Ô đầu chuyển gen và không chuyển gen; M: Marker 1 kb; (+): plasmid *pCB301_AcF3'5'H*; (-): cây Ô đầu không chuyển gen (WT); Các làn điện di từ 1 đến 15 là các cây chuyển gen thế hệ T₀. (B): RT-PCR xác nhận sự phiên mã gen chuyển *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu. M: Marker 1 kb; (+): plasmid *pCB301_AcF3'5'H*; (-): cây Ô đầu không chuyển gen (WT); Các làn điện di 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 15 là cây dương tính với PCR, tương ứng với T₀-3, T₀-4, T₀-5, T₀-6, T₀-7, T₀-9, T₀-13 và T₀-15.

Như vậy, kết quả phân tích Western blot cho thấy gen chuyển *AcF3'5'H* đã được dịch mã biểu hiện thành protein AcF3'5'H tái tổ hợp trong ba dòng Ô đầu

chuyển gen ở thể hệ T_0 . Kết quả phân tích hàm lượng protein rAcF3'5'H từ ba cây chuyển gen bằng ELISA được thể hiện trong Hình 3.33B. Hàm lượng protein rAcF3'5'H của cây chuyển gen nằm trong khoảng từ 0,2083 đến 0,2507 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Những kết quả này chứng minh gen chuyển *AcF3'5'H* đã được hợp nhất vào hệ gen cây Ô đầu chuyển gen, phiên mã và biểu hiện protein tái tổ hợp.



Hình 3.33. Biểu hiện quá mức của protein rAcF3'5'H trong cây Ô đầu chuyển gen ở thể hệ T_0 . (A): Kết quả phân tích Western blot để xác nhận sự biểu hiện của protein rAcF3'5'H ở cây Ô đầu chuyển gen. M: Thang protein tiêu chuẩn; WT: cây không biến nạp (+): protein H5 của virus cúm A/H5N1 có gắn c-myc là đối chứng dương tính; T₀-4, T₀-6, T₀-13: cây Ô đầu chuyển gen. (B): So sánh hàm lượng protein rAcF3'5'H ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) trong cây Ô đầu chuyển gen T_0 . WT: cây không chuyển gen; T₀-4, T₀-6, T₀-13: Cây chuyển gen T_0 . Các thanh dọc thể hiện sai số tiêu chuẩn. Các chữ cái khác nhau (a, b) phía trên các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$) được kiểm tra bằng Duncan (SPSS); $n = 3$.

3.5.2.3. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số từ lá của dòng Ô đầu chuyển gen

Các dòng Ô đầu chuyển gen ở thế hệ T_0 và cây WT không có sự khác biệt về hình thái (Hình 3.34).



Hình 3.34. Cây Ô đầu không chuyển gen (A) và cây Ô đầu chuyển gen ở thế hệ T_0 (B) sau 8 tuần kể từ khi chuyển từ bình nuôi cây sang chậu trong điều kiện nhà lưới

Lá của ba loại cây chuyển gen và WT được sử dụng để phân tích hàm lượng flavonoid tổng số, kết quả được trình bày ở bảng 3.11. Ba dòng T_0 -4, T_0 -6 và T_0 -13 có hàm lượng flavonoid cao lần lượt là $773,50 \pm 12,87$, $661,73 \pm 2,85$ và $761,61 \pm 9,10$ ($\mu\text{g/g}$). Kết quả này cao hơn 39,13 đến 62,63% so với cây WT ($475,62 \pm 10,16$ $\mu\text{g/g}$). Những kết quả này đã chứng minh rằng sự biểu hiện quá mức của gen *AcF3'5'H* ở ba dòng Ô đầu chuyển gen (T_0 -4, T_0 -6 và T_0 -13) đã làm tăng hàm lượng flavonoid trong các dòng chuyển gen ở thế hệ T_0 .

Bảng 3.11. Hàm lượng flavonoid tổng số của ba dòng Ô đầu chuyển gen (T_0 -4, T_0 -6, T_0 -13) và cây WT

Cây WT và các dòng chuyển gen	Hàm lượng flavonoid tổng số $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ ($\mu\text{g/g}$)	Tỷ lệ tăng so với cây WT (%)
WT	$475,62 \pm 10,16^a$	0
T_0 -4	$773,50 \pm 12,87^c$	62,63
T_0 -6	$661,73 \pm 2,85^b$	39,13
T_0 -13	$761,61 \pm 9,10^c$	60,13

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được test bằng Duncan (SPSS); $n = 3$.

3.5.3. Thảo luận kết quả biến nạp và biểu hiện mạnh gen *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu

Hiện nay, nghiên cứu tăng cường tổng hợp các hoạt chất sinh học trong cây được liệu bằng kỹ thuật biểu hiện mạnh gen mã hóa enzyme chìa khóa trong quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp đang được quan tâm [66], [146], [150]. Cây được liệu Ô đầu chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, như alkaloid, flavonoid và polysaccharid. Các alkaloid của cây thuốc này có hoạt tính kháng khuẩn, kháng virus và chống oxy hóa [141], [162]. Flavonoid được tìm thấy ở tất cả các bộ phận của thân, hoa, rễ và thân rễ, nhưng hàm lượng thấp [12]. Để cải thiện hàm lượng flavonoid trong cây Ô đầu, nghiên cứu này đã chọn cách tiếp cận biểu hiện quá mức gen mã hóa enzyme quan trọng liên quan đến con đường sinh tổng hợp flavonoid ở Ô đầu là *F3'5'H*.

Kết quả thí nghiệm biến nạp gen chỉ thị *uidA* vào Ô đầu từ mẫu cây là chồi *in vitro* thông qua lây nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens* cho thấy, mật độ *A. tumefaciens* thích hợp là $OD_{600} = 0,8$, nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$ và thời gian nhiễm khuẩn là 30 phút. Chọn lọc kháng sinh với kanamycin 50 mg/l, và hiệu suất chuyển gen đạt được là 8,88%. Kết quả này là cơ sở cho sự thành công trong biến nạp di truyền và tạo cây Ô đầu chuyển gen.

Trong số các enzyme tham gia xúc tác các phản ứng của con đường tổng hợp flavonoid ở thực vật, *F3'H* và *F3'5'H* tham gia vào các phản ứng cuối cùng để tạo thành các hợp chất flavonoid (Hình 1.3). Do đó, gen mã hóa enzyme *F3'5'H* đã được chọn để phân tích sự biểu hiện quá mức ở cây Ô đầu bằng phương pháp biến nạp qua trung gian *A. tumefaciens*. Trong những năm qua, các nghiên cứu về phân lập và phân tích biểu hiện *F3'5'H* ở các loài thực vật đã được thực hiện nhằm xác định chức năng gen. Ishiguro và cs (2012) đã phân lập *F3'H* và *F3'5'H* từ thư viện cDNA của *A. kelloggii*, và phân tích biểu hiện ở cây dã yên thảo chuyển gen cho thấy rằng sự biểu hiện của các gen này làm tăng hàm lượng cyanidin và delphinidin cũng như anthocyanidin [77]. Sự gia tăng tích lũy anthocyanidin cũng làm thay đổi màu hoa ở cây chuyển gen. Một nghiên cứu ở hoa Cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus*), cây chuyển gen mang gen kháng thuốc diệt cỏ (gen đột biến mã hóa acetolactate synthase

-ALS) và gen mã hóa F3'5'H cho thấy sự gia tăng tích lũy delphinidin và anthocyanin so với cây hoang dã, nhưng không gây hại cho sức khỏe của con người hoặc động vật [136]. Trong nghiên cứu này, gen *AcF3'5'H* được phân lập từ mRNA của cây Ô đầu với đoạn mã hóa *AcF3'5'H* có kích thước 1521 bp, mã hóa 506 amino acid. Cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* trong vector chuyển gen pCB301 chứa trình tự promoter 35S, *c-myc* và *KDEL* được *A. tumefaciens* chuyển vào chồi *in vitro*, và tạo ra cây Ô đầu chuyển gen. Protein rAcF3'5'H được biểu hiện và hàm lượng protein rAcF3'5'H ở cây chuyển gen tăng từ 20,83% lên 25,07% so với ở cây không chuyển gen. Sự gia tăng hàm lượng protein rAcF3'5'H đã làm tăng hàm lượng flavonoid tổng số trong các dòng chuyển gen T₀-4, T₀-6 và T₀-13 từ 39,13% lên 62,63% so với ở cây WT. Những kết quả này đã chứng minh rằng, sự biểu hiện quá mức của *AcF3'5'H* ở ba dòng Ô đầu chuyển gen (T₀-4, T₀-6, và T₀-13) đã làm tăng hàm lượng flavonoid trong cây chuyển gen. Đây là báo cáo đầu tiên về sự biến nạp gen và phân tích sự biểu hiện quá mức của gen *F3'5'H* ở cây Ô đầu.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

1. Bằng phương pháp hình thái so sánh kết hợp với phân tích mã vạch DNA dựa trên trình tự vùng *ITS*, các đoạn gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB2* đã xác định các mẫu Ô đầu thu tại huyện Quản Bạ và Hoàng Su Phì, tỉnh Hà Giang, Việt Nam thuộc cùng loài *A. carmichaelii*, chi *Aconitum*, họ Hoàng Liên (*Ranunculaceae*). Trình tự *matK* là một ứng cử viên mã vạch DNA tốt để định danh loài Ô đầu (*A. carmichaelii*) và là giải pháp trong phân tích tiến hóa và phát sinh loài phân tử của chi *Aconitum*.
2. Môi trường thích hợp cảm ứng tạo đa chồi ở cây Ô đầu là MS cơ bản + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + BAP 1,5 mg/l. Mô rễ là vật liệu thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Ô đầu. Lây nhiễm mô rễ bởi *R. rhizogenes* với $OD_{600} = 0,6$; AS 100 $\mu\text{mol/l}$; thời gian nhiễm khuẩn 15 phút; thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày; nồng độ cefotaxime 500 mg/l là những điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Ô đầu. Môi trường MS ở trạng thái lỏng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nuôi lắc thích hợp cho sự tăng trưởng rễ tơ ở cây Ô đầu.
3. Vùng mã hóa của gen *AcF3'5'H* được phân lập từ mRNA của cây Ô đầu có kích thước 1521 nucleotide, mã hóa 506 amino acid. Vector chuyển gen thực vật *pCB301_AcF3'5'H* với sự điều khiển của promoter 35S, chứa gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu, gắn thêm cấu trúc c-myc và KDEL đã được thiết kế thành công và tạo được hai dòng *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*.
4. Vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H* được biến nạp thành công vào mô lá Thuốc lá và tạo được cây Thuốc lá chuyển gen *AcF3'5'H*. Gen chuyển *AcF3'5'H* đã biểu hiện tạo protein tái tổ hợp rAcF3'5'H và làm tăng hàm lượng flavonoid trong cây Thuốc lá chuyển gen từ $691,20 \pm 2,02$ đến $907,83 \pm 5,14$ ($\mu\text{g/g}$) và cao hơn từ 69,23 đến 222,27 (%) so với các cây WT ($408,43 \pm 5,11$ $\mu\text{g/g}$).
5. Mẫu biến nạp để nhiễm vi khuẩn *Agrobacterium* là chồi *in vitro*, mật độ *A. tumefaciens* thích hợp là $OD_{600} = 0,8$, nồng độ AS 100 $\mu\text{mol/l}$ và thời gian nhiễm

khuẩn là 30 phút. Gen chuyển *AcF3'5'H* được biến nạp thành công vào cây Ô đầu bằng lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp vào chồi *in vitro*, và đã tạo được 3 dòng Ô đầu chuyển gen ở thế hệ T₀. Sự biểu hiện mạnh của gen chuyển *AcF3'5'H* đã làm tăng hàm lượng enzyme F3'5'H và làm tăng hàm lượng flavonoid tổng số trong lá của các dòng chuyển gen T₀-4, T₀-6 và T₀-13 từ 39,13% đến 62,63% so với cây WT.

Đề nghị

1. Tiếp tục phân tích và đánh giá 3 dòng Ô đầu chuyển gen nhằm chọn được dòng Ô đầu chuyển gen có hàm lượng flavonoid cao và ổn định.
2. Tiếp tục phân tích thành phần hóa học, tìm kiếm hợp chất có giá trị dược học và so sánh hàm lượng dược chất của rễ tơ, rễ *in vitro* và rễ, củ Ô đầu trồng để làm cơ sở chọn dòng rễ tơ có hàm lượng các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

Các bài báo

1. Thi Ngọc Lan Nguyen, Thi Thu Hoan Hoang, Huu Quan Nguyen, Quang Tan Tu, Thi Hong Tran, Thi Mai Thu Lo, Thi Thu Thuy Vu, Hoang Mau Chu (2021), “*Agrobacterium tumefaciens*–mediated genetic transformation and overexpression of the flavonoid 3’5’-hydroxylase gene increases the flavonoid content of the transgenic *Aconitum carmichaelii* Debx. plant”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*; <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10190-4> (SCIE)
2. Yen Thi Hai Nguyen, Hoan Thi Thu Hoang, Anh Thi Hoang Mai, Lan Thi Ngoc Nguyen, Quan Huu Nguyen, Nhan Thi Thanh Pham, Thuong Danh Sy, Mau Hoang Chu (2021), The *Aconitum carmichaelii* F3’5’H gene overexpression increases flavonoid accumulation in transgenic tobacco plants, *Horticulturae*, 7(10), 384, <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100384> (SCIE)
3. Hoàng Thị Thu Hoàn, Hoàng Thị Phương, Đặng Thị Lệ, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Chu Hoàng Mậu (2017), “Nghiên cứu đặc điểm hình thái, giải phẫu và phân loại học phân tử của cây ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.)”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, 168(08), tr. 161 – 167.
4. Hoàng Thị Thu Hoàn, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Chu Hoàng Mậu (2020), “Tách dòng phân tử và thiết kế vector chuyển gen mang gen *flavonoid 3’5’ Hydroxylase* phân lập từ cây ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.), *Tạp chí Khoa học & Công nghệ - Đại học Thái Nguyên* , 225(08), tr. 43 – 49.
5. Hoàng Thị Thu Hoàn, Trần Thị Hồng, Nguyễn Hữu Quân, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Chu Hoàng Mậu (2021), “Nghiên cứu hệ thống tái sinh *in vitro* và cảm ứng rễ tơ ở cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* debeaux)”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, 226(05), tr. 139 – 146.

Các trình tự gen trên GenBank

1. Hoang,H.T.T., Nguyen,Q.H., Nguyen,L.T.N. and Chu,M.H. (2021). *Aconitum carmichaelii* isolate QB flavonoid-3',5'-hydroxylase mRNA, complete cds. GenBank: MZ339222.1
2. Hoang,T.T.H., Nguyen,T.N.L., Le,V.S. and Chu,H.M. (2018). *Aconitum carmichaelii* isolate HSP internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MH410519.1.
3. Hoang,T.T.H., Nguyen,T.N.L., Le,V.S. and Chu,H.M. (2018). *Aconitum carmichaelii* isolate QB internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MH410520.1.
4. Hoang, T.T.H., Nguyen, T,N.L., Le, V,S and.Chu. and H,M. (2018). *Aconitum carmichaelii* plastid: chloroplast genomic DNA containing MatK gene region, isolate QB, Hagiang. GenBank: LS398143.1.
5. Hoang, T.T.H., Nguyen, T,N.L., Le, V,S and.Chu. and H,M. (2018). *Aconitum carmichaelii* plastid: chloroplast genomic DNA containing MatK gene region, isolate HSP, Hagiang. GenBank: LS398144.1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

- [1] Nguyễn Tiến Bản (2013), *Danh lục thực vật Việt Nam*, NXB Nông nghiệp Hà Nội, tr.153.
- [2] Lê Đình Bích, Trần Văn Ôn (2007), *Thực vật học*, NXB Y học Hà Nội, tr 238.
- [3] Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, NXB Y học Hà Nội, tr. 857-858, 860-862.
- [4] Bùi Hồng Cường (2007), *Nghiên cứu chế biến, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của phụ tử từ cây Ô đầu Sa Pa*, Luận án tiến sĩ dược học, tr. 3-45, 53-54, 88-113.
- [5] Nguyễn Văn Đàn (2009), *Hợp chất thiên nhiên dùng làm thuốc*, NXB Y học Hà Nội, tr. 226–232.
- [6] Phan Trung Hải, Quách Ngô Diễm Phương, Nguyễn Như Nhút (2016), "Nghiên cứu cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ cây Hoa Móng tay (*Impatiens balsamina* L.) từ mười bốn chủng *Agrobacterium rhizogenes*", *Tạp chí phát triển KH&CN - ĐHQG TPHCM*, 19(2) tr 38-47.
- [7] Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam - Quyển 1*, NXB trẻ, tr. 325.
- [8] Phạm Thanh Kỳ (2007), *Dược liệu học*, NXB Y học Hà Nội tr. 176-178.
- [9] Nguyễn Thị Ngọc Lan, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu (2020), *Sinh học hiện đại một số vấn đề về nguyên lý và ứng dụng*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, tr. 181-218, 261-274.
- [10] 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 (1se), tr. 293-300.

- [11] Đỗ Tất Lợi (2005), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học Hà Nội, tr. 877-882.
- [12] Vũ Đức Lợi (2014), *Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Ô đầu (A.carmichaeli Debx.) trồng ở tỉnh Hà Giang*, Luận án tiến sĩ dược học, tr. 8-21, 43-51.
- [13] Phí Thị Cẩm Miện, Nguyễn Minh Đức, Kim Anh Tuấn, Nguyễn Đức Bách, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Lê Thị Vân Anh, Dương Phương Thảo (2020), "Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) thông qua *Agrobacterium rhizogenes* K599", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 62 (2) tr. 59-64.
- [14] Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Đình Trọng, Hoàng Hà, Lâm Đại Nhân, Chu Hoàng Hà (2012), "Nghiên cứu khả năng tạo rễ tơ của cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*", *Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam*, 50 (3B), tr. 166-173.
- [15] Nguyễn Như Nhứt, Bùi Văn Lê (2016), "Ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự cảm ứng rễ tơ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) của chủng *Agrobacterium rhizogenes* C26", *Tạp chí Khoa học-Trường Đại học Cần Thơ*, 44 (2016), tr. 96-103.
- [16] Trà Đông Phương, Vũ Thị Bạch Phượng, Quách Ngô Diễm Phương (2016), "Nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ cây cát cánh (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) từ bốn chủng *Agrobacterium rhizogenes*", *Tạp chí phát triển KH&CN - ĐHQG TP HCM*, Tập 19, số T5-2016, tr. 64-75.
- [17] Phạm Xuân Sinh, Phùng Hòa Bình (2003), *Dược học cổ truyền*, NXB Y học Hà Nội, tr. 196-197.
- [18] 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 Đà Nẵng*, tập 13, số 2, tr. 251-258.

- [19] Thủ Tướng Chính phủ (2013), *Quyết định Số: 1976/QĐ-TTg về việc Phê duyệt quy hoạch tổng thể phát triển dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030*.
- [20] Vũ Thị Như Trang, Chu Hoàng Mậu (2017), "Nghiên cứu tạo rễ tơ ở cây thảo nhàn sâm Việt Nam (*Talinum paniculatum* Gaertn.) ", *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, Tập 33, Số 2S (2017), tr. 233-241.

Tiếng Anh

- [21] Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK (2013), "Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities", *Biomed Research International*, Article ID 915436, <https://doi.org/10.1155/2013/915436>.
- [22] Benniamin A., Manickam V.S., Johnson M., Joseph L.H. (2004), "Micropropagation of *Crataeva magna* (Lour.) DC- a medicinal plant", *Indian Journal of Biotechnol*, 3, pp. 136–138.
- [23] 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.
- [24] Petit A., David C., Dahl G. A., Ellis J. G., Guyon P., CasseDelbart F., Tempé J. (1983), "Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation", *Molecular and General Genetics*, 190, pp. 204–214.
- [25] Sharafi A., Sohi H.H., Azadi P., Sharafi A.A. (2014), "Hairy root induction and plant regeneration of medicinal Plant *Dracocephalum kotschyi*", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 10.1007/s12298-013-0217-z, doi:10.1007/s12298-013-0217-z.

- [26] Siril E. A., Nisha J. (2013), "Micropropagation of annatto (*Bixa orellana* L.) from mature tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants with RAPD", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19 (1), pp. 147-155.
- [27] Bakkali A.T., Jaziri M., Foriers A. (1997), "Lawsonic acid accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53 (1), pp. 51 - 83.
- [28] Hana Alkhalidy, Yao Wang, Dongmin Liu (2018), "Dietary flavonoids in the prevention of T2D: An overview", *Nutrients*, 10 (4): 438.
- [29] Greetha Arumugam, Uma Rani Sinniah, Mallappa Kumara Swamy, Paul T. Lynch (2019), "Encapsulation of in vitro *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. shoot apices for propagation and conservation", *3 Biotech*, 9 (8): 298.
- [30] Mehtab Muhammad Aslam, Joseph K Karanja, Qian Zhang, Huifeng Lin, Tianyu Xia, Kashif Akhtar, Jianping Liu, Rui Miao, Feiyun Xu, Weifeng Xu (2020), "In vitro regeneration potential of white lupin (*Lupinus albus*) from *Cotyledonary Nodes*", *Plants (Basel)*, 9 (3): 318.
- [31] Elena Azzini, Jasminka Giacometti, Gian Luigi Russo (2017), "Antiobesity effects of anthocyanins in preclinical and clinical studies", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 2740364, <http://dx.doi.org/10.1155/2017/2740364>.
- [32] Hu B, Yao H, Peng X, Wang R, Li F, Wang Z, Zhao M, Jin L (2019), "Overexpression of chalcone synthase improves flavonoid accumulation and drought tolerance in tobacco", *Preprints*, 2019060103, DOI 10.20944/preprints201906.0103.v1.
- [33] Cheepala S. B., Sharma N. C., S. V. Sahi (2004), "Rapid in vitro regeneration of *Sesbania drummondii*", *Biologia Plantarum*, 48, pp. 13-18.
- [34] Muthusamy Balasubramanian, Murugesan Anbumegala, Ramasamy Surendran, Muthukrishnan Arun, Girija Shanmugam (2018), "Elite hairy roots

- of *Raphanus sativus* (L.) as a source of antioxidants and flavonoids", 3 *Biotech*, 8 (2): 128.
- [35] Pradeepa C. G. Bandaranayake, John I. Yoder (2018), "Factors affecting the efficiency of *Rhizobium rhizogenes* root transformation of the root parasitic plant *Triphysaria versicolor* and its host *Arabidopsis thaliana*", *Plant Methods*, 14: 61.
- [36] Siamak Shirani Bidabadi, S. Mohan Jain (2020), "Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration", *Plants (Basel)*, 9 (6): 702, doi: 10.3390/plants9060702.
- [37] Mursy R Boase, David H Lewis, Kevin M Davies, Gayle B Marshall, Deepa Patel, Kathy E Schwinn, Simon C Deroles (2010), "Isolation and antisense suppression of flavonoid 3'5'-hydroxylase modifies flower pigments and colour in cyclamen", *BMC Plant Biology*, 10 (107), pp. 1471-2229.
- [38] Alessandra Bracam, Gelsomina Fico, Ivano Morelli, Francesco De Simone, Franca Tomè, Nunziatina De Tommasi (2003), "Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species", *Journal of Ethnopharmacology*, 86 (1), pp. 63-67.
- [39] Kuo P. C., Damu A. G. (2004), "Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12 (3), pp. 537-544.
- [40] Giorgia Carletti, Giuseppe Nervo, Luigi Cattivelli (2014), "Flavonoids and melanins: A common strategy across two kingdoms", *International Journal of Biological Sciences*, 10(10), pp. 1159–1170.
- [41] Stefano Cesco, Guenter Neumann, Nicola Tomasi, Roberto Pinton, Laure Weisskopf (2010), "Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition", *Plant Soil*, 329, pp. 1–25.
- [42] Sabri Ahmed Cherrak, Nassima Mokhtari-Soulmane, Farid Berroukeche, Bachir Bensenane, Angéline Cherbonnel, Hafida Merzouk, Mourad Elhabiri

- (2016), "In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation", *PLos One*, 11(10): e0165575,
- [43] AJ Debnath, G. Gangopadhyay, D. Basu, SR Sikdar (2018), "An efficient protocol for in vitro direct shoot organogenesis of *Sesamum indicum* L. using cotyledon as explant", *3 Biotech*, 8 (3): 146.
- [44] Samir C. Debnath, Juran C. Goyali (2020), "In vitro propagation and variation of antioxidant properties in micropropagated vaccinium berry plants—A review", *Molecules*, 25 (4): 788.
- [45] Yuxing Deng, Caili Li, Heqin Li, Shanfa Lu (2018), "Identification and characterization of flavonoid biosynthetic enzyme genes in *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae)", *Molecules*, 23 (6): 1467.
- [46] Lim C. E., Park J. H., Park C. W. (1999), "Flavonoid variation of the *Aconitum jaluense* complex (Ranunculaceae) in Korea", *Plant Systematics and Evolution*, 218, pp. 125-131.
- [47] Espinosa-Leal, Puente-Garza, García-Lara (2018), "In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds", *Planta*, 248 (1), pp. 1–18.
- [48] Akbaş F, Isikalan C, Namli S, Karakuş P, Başaran D (2011), "Direct plant regeneration from in vitro-derived leaf explants of *Hypericum spectabile*, a medicinal plant", *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (11), pp. 2175-2181.
- [49] Joseph Felsenstein (1985), "Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap", *Evolution*, 39, pp. 783–791.
- [50] Gelsomina Fico, Alessandra Braca, Anna Rita Bilia, Franca Tomè, Ivano Morelli (2000), "Flavonol glycosides from the flowers of *Aconitum paniculatum*", *Journal of Natural Products*, 63 (11), pp. 1563-1565

- [51] Alessio Fini, Cecilia Brunetti, Martina Di Ferdinando, Francesco Ferrini, Massimiliano Tattini (2011), "Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants", *Plant Signaling and Behavior*, 6 (5), pp. 709-711.
- [52] Pei Ching Foo, Ze Hong Lee, Chee Keong Chin, Sreeramanan Subramaniam, Bee Lynn Chew (2018), "Shoot induction in white eggplant (*Solanum melongena* L. Cv. Bulat Putih) using 6-benzylaminopurine and kinetin", *Tropical Life Sciences Research*, 29 (2), pp. 119–129.
- [53] Zabala G, Zou J, Tuteja J, Gonzalez D, Clough SJ, Vodkin L (2006), "Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of Glycine max in response to *Pseudomonas syringae* infection", *BMC Plant Biology*, 6: 26 doi:10.1186/1471-2229-6-26.
- [54] Feng Gao, Yuan-Yuan Li, Dan Wang, Xing Huang, Qian Liu (2012), "Diterpenoid alkaloids from the Chinese traditional herbal “Fuzi” and their cytotoxic activity", *Molecules*, 17, pp. 5187-5194.
- [55] Jihai Gao, Dayan Zhang, Wei Wang, Cheng Peng (2016), "Complete chloroplast genome of medicinal plant *Aconitum carmichaelii*: genome characterization and phylogenetic analysis", *Mitochondrial DNA B Resour*, 1 (1), pp. 893–894.
- [56] Noemi Gutierrez-Valdes, Suvi T. Häkkinen, Camille Lemasson, Marina Guillet, Kirsi-Marja Oksman-Caldentey, Anneli Ritala, Florian Carden (2020), "Hairy root cultures—A versatile tool with multiple applications", *Frontiers in Plant Science*, 11: 33.
- [57] Ledford H (2008), "Botanical identities: DNA barcoding for plants comes a step closer", *Nature*, 415: 616.
- [58] Pandey H, Nandi SK, Kumar A, Palni UT, Chandra B, Palni LMS (2004), "In vitro propagation of *Aconitum balfourii* Stapf; an important aconite of

- Himalayan alpine", *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 21, pp. 69-84.
- [59] Autade R. H., Fargade S. R., Borhade P. G., Udmale S. K., Choudhary R. S. (2014), "In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bert. a natural, non caloric sweetener herb", *Journal of Cell and Tissue Research*, 14 (3), pp. 4659-4664.
- [60] Pei-Ying Hao, Ya-Lin Feng, Yi-Shen Zhou, Xin-Mi Song, Hong-Liang Li, Yan Ma, Cheng-Long Ye, Xiao-Ping Yu (2018), "Schaftoside interacts with NlCDK1 protein: A mechanism of rice resistance to brown planthopper, *nilaparvata lugens*", *Frontiers in Plant Science*, 9, 710.
- [61] Jeffrey B Harborne, Christine A Williams (2000), "Advances in flavonoid research since 1992 Review Article", *Phytochemistry*, 55 (6), pp. 481-504.
- [62] Samira Hassan, Ulrike Mathesius (2012), "The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions", *Journal of experimental botany*, 63 (9), pp. 3429-3444.
- [63] Quanren He, Jiyoung Kim, Raghubir P Sharma (2004), "Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases", *Toxicological Science*, 80 (2), pp. 335-342.
- [64] Sun HJ, Cui ML, Ma B, Ezura H (2006), "Functional expression of the tastemodifying protein, miraculin, in transgenic lettuce", *FEBS Lett*, 580, pp. 620-626.
- [65] Yu Hong, Yan Luo, Qi Gao, Chen Ren, Qiong Yuan, Qin-Er Yang (2017), "Phylogeny and reclassification of *Aconitum* subgenus *Lycoctonum* (Ranunculaceae)", *PloS one*, 12 (1): e0171038, doi: 10.1371/journal.pone.0171038.
- [66] Nguyen HQ, Le THT, Nguyen TNL, Nguyen TG, Sy DT, Tu QT, Vu TTT, Le VS, Chu HM, Vu TKL (2020), "Overexpressing GmCHI1A increases the

- isoflavone content of transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56, pp. 842–850.
- [67] Hau-Hsuan Hwang, Chih-Hao Wang, Hsiao-Huei Chen, Jia-Fang Ho, Shin-Fei Chi, Fan-Chen Huang, Hungchen Emilie Yen (2019), "Effective *Agrobacterium*-mediated transformation protocols for callus and roots of halophyte ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*)", *Botanical Studies*, 60: 1, PMID: 30617933.
- [68] Farag Ibraheem, Iffa Gaffoor, Surinder Chopra (2010), "Flavonoid phytoalexin-dependent resistance to anthracnose leaf blight requires a functional yellow seed1 in *Sorghum bicolor*", *Genetics*, 184 (4), pp. 915-926.
- [69] Sambrook J, Russell DW (2001), *Molecular cloning a laboratory manual*, vol 3.
- [70] Zhang J., Huang Z. H., Qiu X. H., Yang Y. M., Zhu D. Y., Xu W. (2012), "Neutral fragment filtering for rapid identification of new diester-diterpenoid alkaloids in roots of *Aconitum carmichaeli* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry", *PloS one*, 7(12), e52352.
- [71] J.C.Luis, F.Valdés, R.Martín, A.J.Carmona, Jesús G.Díaz (2006), "DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Aconitum napellus* sp. lusitanicum", *Fitoterapia*, 77 (6), pp. 469-471.
- [72] Neelofar Jabeen, Mohammad I Kozgar, Ghulam H. Dar, Abdul S. Shawl, Samiullah Khan (2012), "Distribution and taxonomy of genus *Aconitum* in kashmir: potent medicinal resource of Himalayan", *Chiang Mai Journal Sciences*, 40 (2), pp. 173 - 186.
- [73] Maria F Visintini Jaime, Flavia Redko, Liliana V Muschietti, Rodolfo H Campos, Virginia S Martino, Lucia V Cavallaro (2013), "In vitro antiviral activity of plant extracts from *Asteraceae medicinal* plants", *Virology Journal*, 10: 245.

- [74] Topping JE (1998), "Tobacco transformation", *Methods in Molecular Biology*, 81.
- [75] Nan Jiang, Andrea I, Doseff, Erich Grotewold (2016), "Flavones: From biosynthesis to health benefits", *Plants (Basel)*, 5 (2): 2.
- [76] Rawat JM, Agnihotri RK, Nautiyal S, Rawat B, Chandra A (2013), "In vitro propagation, genetic and secondary metabolite analysis of *Aconitum violaceum* Jacq.: a threatened medicinal herb.", *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, pp. 2589-2599 doi:<https://doi.org/10.1007/s11738-013-1294-x>.
- [77] Ishiguro K, Taniguchi M, Tanaka Y (2012), "Functional analysis of antirrhinum kelloggii flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3'5'-hydroxylase genes; critical role in flower color and evolution in the genus antirrhinum", *Plant Res*, 125 (3), pp. 451-456.
- [78] Wei K, Wang L, Zhang C, Wu L, Li H, Zhang F, Cheng H (2015), "Transcriptome analysis reveals key flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes in affecting the ratio of dihydroxylated to trihydroxylated catechins in camellia sinensis", *PLoS ONE*, 10(9): e0137925 doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137925>.
- [79] 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.
- [80] Ramar K., Ayyadurai V., Arulprakash T. (2014), "In vitro shoot multiplication and plant regeneration of *Physalis peruviana* L., an important medicinal plant", *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 3 (3), pp. 456-464.
- [81] Tamura K., Nei M. (1993), "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees", *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), pp. 512-526.

- [82] Olsen KM, Hehn A, Jugde H, Slimestad R, Larbat R, Bourgaud F, Lillo C (2010), "Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*", *BMC Plant Biology*, 10 (21), pp. 1471-2229.
- [83] Shashank Kumar, Abhay K. Pandey (2013), "Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview", *Scientific World Journal*, Article ID 162750, 16 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.
- [84] Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, Koichiro Tamura (2018), "MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547-1549.
- [85] Brijwal L, Tamta S (2015), "*Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC", *Springerplus*, 4: 443.
- [86] Adriano R. L., Ana C. O., Silva-Pinhati, Basílio-Palmieri A. C., Irving J. B., Freitas-Astua J., Mariangela C. (2007), "An in silico analysis of the key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Citrus sinensis*", *Genetics and Molecular Biology*, 30 (3), pp. 819 - 831.
- [87] Chen L., Cai Y., Liu X., Guo C., Sun S., Wu C., Jiang B., Han T., Hou W. (2018), "Soybean hairy roots produced in vitro by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation", *The crop journal* 6, pp. 162-171.
- [88] Lee W. L., Chang L. K. (2004), "Plant regeneration from stem nodal segments of *Orthosiphon stamineus* benth., a medicinal plant with diuretic activity", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40, pp. 115-118.
- [89] Ma L.L., Wang C.L., Wang J.H. (2012), *Aconitum carmichaelii* flavonoid-3',5'-hydroxylase mRNA, complete cds, GenBank: JN635708.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN635708>, 15-FEB-2012.
- [90] Lauener LA, Tamura M (1978), "synopsis of *Aconitum* subgenus *Paraconitum*: I", *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh*, 37, pp. 113-124.

- [91] Chiang LC, Ng LT, Cheng PW, Chiang W, Lin CC (2005), "Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*", *Clinical and Experimental Pharmacology*, 32 (10), pp. 811-816.
- [92] Loïc Lepiniec, Isabelle Debeaujon, Jean-Marc Routaboul, Antoine Baudry, Lucille Pourcel, Nathalie Nesi, Michel Caboche (2006), "Genetics and biochemistry of seed flavonoids", *Annu Rev Plant Biol*, 57, pp. 405-430.
- [93] Che-Yu Liang, Krishna Preethi Rengasamy, Li-Min Huang, Chia-Chi Hsu, Mei-Fen Jeng, Wen-Huei Chen, Hong-Hwa Chen (2020), "Assessment of violet-blue color formation in *Phalaenopsis orchids*", *BMC Plant Biology*, 20: 212.
- [94] Wan Ting Ling, Fui Chu Liew, Wei Yong Lim, Sreeramanan Subramaniam, Bee Lynn Chew (2018), "Shoot induction from axillary shoot tip explants of fig (*Ficus carica*) cv. Japanese BTM 6", *Tropical Life Sciences Research*, 29 (2), pp. 165–174.
- [95] Liu M, Tian HL, Wu JH, Cang RR, Wang RX, Qi XH, Xu Q, Chen XH (2015), "Relationship between gene expression and the accumulation of catechin during spring and autumn in tea plants (*Camellia sinensis* L.)", *Horticulture Research*, 10: 1038.
- [96] Singh M, Chettri A, Pandey A, Sinha S, Singh KK, Badola HK (2020), "In vitro propagation and phytochemical assessment of *Aconitum ferox* Wall: A threatened medicinal plant of sikkim Himalaya", *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90, pp. 313-321 doi:<https://doi.org/10.1007/s40011-019-01104-x>.
- [97] Zifkin M, Jin A, Ozga JA, Zaharia LI, Scherthaner JP, Gesell A, Abrams SR, Kennedy JA, Constabel CP (2012), "Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism", *Plant Physiol*, 158 (1), pp. 200-224.

- [98] Anis M., Husain M. K., Shahzad A. (2005), "In vitro plantlet regeneration of *Pterocarpus marsupium* Roxb., an endangered leguminous tree", *Current Science*, 88, pp. 861–863.
- [99] Banerjee M., Shrivastava S. (2008), "An improved protocol for in vitro multiplication of *Bacopa monnieri* (L.)", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), pp. 1355-1359.
- [100] Rahman M. M., Amin M. N., Islam M. Z. (2011), "Mass propagation of *Solanum surattense* Bum. using direct adventitious shoot organogenesis from internode", *Acta Agriculturae Slovenica*, 97 (1), pp. 11-17.
- [101] Saghai-Marooof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. (1984), "Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics", *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, pp. 8014-8018.
- [102] N. Mallikarjuna, K. R. Kranthi, D. R. Jadhav, S. Kranthi, S. Chandra (2004), "Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut", *Journal of Applied Entomology*, 128, pp. 321-328.
- [103] Cristina Mariani, Alessandra Braca, Sara Vitalini, Nunziatin De Tommasi, Francesco Visiolid Gelsomina Fico (2008), "Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae)", *Phytochemistry*, 69 (5), pp. 1220-1226.
- [104] Moisés Martínez-Castillo, Judith Pacheco-Yeppez, Nadia Flores-Huerta, Paula Guzmán-Téllez, Rosa A. Jarillo-Luna, Luz M. Cárdenas-Jaramillo, Rafael Campos-Rodríguez, Mineko Shibayama (2018), "Flavonoids as a natural treatment against entamoeba histolytica", *Front Cell Infect Microbiol*, 8: 209.
- [105] Dong Meng, Qing Yang, Biying Dong, Zhihua Song, Lili Niu, Litao Wang, Hongyan Cao, Hanghang Li, Yujie Fu (2019), "Development of an efficient

- root transgenic system for pigeon pea and its application to other important economically plants", *Plant Biotechnol Journal*, 17 (9), pp. 1804-1813.
- [106] John C. T. Menting, Robert K. Scopes, Trevor W. Stevenson (1994), "Characterization of flavonoid 3'5'-hydroxylase in microsomal membrane fraction of *Petunia hybrida* flowers", *Plant Physiology*, 106, pp. 633-642.
- [107] Pan MH, Lai CS, Ho CT (2010), "Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids", *Food Function*, 1 (1), pp. 15-31.
- [108] Justyna Mierziak, Kamil Kostyn, Anna Kulma (2014), "Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment", *Molecules*, 19 (10), pp. 16240–16265.
- [109] Carol Moreau, Mike J. Ambrose, Lynda Turner, Lionel Hill, T.H. Noel Ellis, Julie M.I. Hofer (2012), "The b gene of pea encodes a defective flavonoid 3'5'-hydroxylase, and confers pink flower color", *Plant Physiology*, 159 (2), pp. 759-768.
- [110] Jabeen N., Shawl A.S., Dar G.H., Jan A., Sultan P. (2006), "Callus induction and organogenesis from explants of *Aconitum heterophyllum*", *Biotechnol*, 5, pp. 287-291.
- [111] Xiaopeng Ni, Song Xue, Shahid Iqbal, Wanxu Wang, Zhaojun Ni, Muhammad Khalil-ur-Rehman, Zhihong Gao (2018), "Candidate genes associated with red colour formation revealed by comparative genomic variant analysis of red- and green-skinned fruits of Japanese apricot (*Prunus mume*)", *Peer Journal*, 6: e4625, doi: 10.7717/peerj.4625, PMCID: PMC5937475.
- [112] Kalita P, Barman TK, Pal TK, Kalita R (2013), "Estimation of total flavonoid content (tfc) and anti oxidant activities of methanolic whole plant extract of *biophytum sensitivum* linn", *journal of Drug delivery and Therapeutics*, 3, pp. 33-37.
- [113] Madesis P., Ganopoulos I., Ralli P., Tsiftaris A. (2012), "Barcoding the major mediterranean leguminous crops by combining universal chloroplast and

- nuclear DNA sequence targets", *Genetics and Molecular Research*, 11, pp. 2548 - 2558.
- [114] Nayak P., Behera P. R., Thirunavoukkarasu M. (2007), "High frequency plantlet regeneration from cotyledonary node cultures of *Aegle marmelos* (L.)", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, pp. 231-236.
- [115] Pedro F. P., Justino G. (2012), *Structural analysis of flavonoid and related compounds - A review of spectroscopic applications*, *Phytochemicals*, pp. 33-56.
- [116] A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra (2016), "Flavonoids: an overview", *Journal of Nutritional Science*, 5: e47.
- [117] Elisa Petrusa, Enrico Braidot, Marco Zancani, Carlo Peresson, Alberto Bertolini, Sonia Patui, Angelo Vianello (2013), "Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses", *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), pp. 14950–14973.
- [118] Olhoft PM, Bernal LM, Grist LB, Ozias-Akins P (2007), "A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, pp. 536-549.
- [119] Konieczny R, Obert B, Bleho J, Novák O, Heym C, Tuleja M, Müller J, Strnad M, Menzel D, Šamaj J (2011), "Stable transformation of *Mesembryanthemum crystallinum* (L.) with *Agrobacterium rhizogenes* harboring the green fluorescent protein targeted to the endoplasmic reticulum", *Journal Plant Physiology*, 168, pp. 722–729.
- [120] 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", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(1), pp. 221 - 227.

- [121] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987), "GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants", *EMBO Journal*, 6, pp. 3901-3907.
- [122] Megha Rai, Amit Rai, Noriaki Kawano, Kayo Yoshimatsu, Hiroki Takahashi, Hideyuki Suzuki, Nobuo Kawahara, Kazuki Saito, Mami Yamazaki (2017), "De novo RNA sequencing and expression analysis of *Aconitum carmichaelii* to analyze key genes involved in the biosynthesis of diterpene alkaloids", *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22 (12): 2155.
- [123] Meng-Yue Ren, Qing-Tian Yu, Chun-Yu Shi, Jia-Bo Luo (2017), "Anticancer activities of C18-, C19-, C20-, and bis-diterpenoid alkaloids derived from *Genus Aconitum*", *Molecules*, 22 (2): 267.
- [124] Carmen Rodríguez-García, Cristina Sánchez-Quesada, José J. Gaforio (2019), "Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies", *Antioxidants (Basel)*, 8 (5): 137.
- [125] Arpita Roy (2021), "Hairy root culture an alternative for bioactive compound production from medicinal plants", *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22 (1), pp. 136-149.
- [126] Czemplin S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris N, Walker A, Robinson S, Bogs J (2009), "The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries", *Plant Physiology*, 151, pp. 1513–1530, doi:10.1104/pp.109.142059.
- [127] 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.
- [128] Kumari S., Singh N. (2012), "In vitro plantlet regeneration from cotyledonary node explants of *Salvadora persica* L., a medicinally important desert tree", *Journal of Agricultural Technology*, 8, pp. 1839-1854.

- [129] Madhuri S., Marie C. D. (2001), "In vitro clonal propagation of annatto (*Bixa oreliana* L.)", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(2), pp. 168-172.
- [130] Prakash S., Staden V. J. (2007), "Micropropagation of *Hoslundia opposita* Vahl-a valuable medicinal plant", 73, pp. 60-63.
- [131] 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, doi: 10.1371 / journal.pone.0042780.
- [132] 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.
- [133] Sreekumar S., Seeni S., Pushpangadan P. (2000), "Micropropagation of *Hemidesmus indicus* for cultivation and production of 2-hydroxy 4-methoxy benzaldehyde", *Plant Cell. Tissue Organ Cult*, 62, pp. 211-218.
- [134] R Saller, R Meier, R Brignoli (2001), "The use of silymarin in the treatment of liver diseases", *Drugs*, 61 (14), pp. 2035-2063.
- [135] Castellarin SD, Gaspero GD, Marconi R, Nonis A, Peterlunger E, Paillard S (2006), "Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin", *BMC Genomics*, 7:12.
- [136] Chandler SF, Senior M, Nakamura N, Tsuda S, Tanaka Y (2013), "Expression of flavonoid 3'5'-hydroxylase and acetolactate synthase genes in transgenic carnation: assessing the safety of a nonfood plant", *Agricultural and Food Chemistry*, 61(48), pp. 11711-11720.

- [137] Sara Sharifi, Taher Nejad Sattari, Alireza Zebarjadi, Ahmad Majd,Hamidreza Ghasempour (2014), "The influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and β -carboline alkaloids production in *Tribulus terrestris* L.", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20 (1), pp. 69–80.
- [138] Mahipal SS, Kannanb N, Manokari M,Ravindran CP (2015), "In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures", *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13, pp. 209-214.
- [139] Jagadeesh Sundaramoorthy, Gyu Tae Park, Jeong Ho Chang, Jeong-Dong Lee, Jeong Hoe Kim, Hak Soo Seo, Gyuhwa Chung,Jong Tae Song (2016), "Identification and molecular analysis of four new alleles at the W1 locus associated with flower color in Soybean", *PLoS One*, 11(7): e0159865.
- [140] T Sosa, N Chaves, J C Alias, J C Escudero, F Henao,C Gutiérrez-Merino (2004), "Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores", *Journal of Chemical Ecology*, 30(6), pp. 1087-101.
- [141] Yin T, Cai L, Xing Y, Yu J, Li X, Mei R,Ding Z (2016), "Alkaloids with antioxidant activities from *Aconitum handelianum*", *Journal of Asian Natural Products Research*, 18, pp. 603-610.
- [142] Murashige T.,Skoog F. (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Plant Physiology*, 15, pp. 473–497.
- [143] Takako Aboshi, Shiho Ishiguri, Yoshihito Shiono,Tetsuya Murayama (2018), "Flavonoid glycosides in malabar spinach basella alba inhibit the growth of *spodoptera litura* larvae", *Biosci Biotechnol Biochem*, 82(1), pp. 9-14.
- [144] Xiaosheng Tang, Ping Tang,Liangliang Liu (2017), "Molecular structure–affinity relationship of flavonoids in lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) on binding to human serum albumin and bovine serum albumin by spectroscopic method", *Molecules*, 22 (7): 1036.

- [145] Yanna CF Teles, Maria Sallett R. Souza, Maria de Fátima Vanderlei de Souza (2018), "Sulphated flavonoids: biosynthesis, structures, and biological activities", *Molecules*, 23 (2), 480.
- [146] Vu TNT, Le THT, Hoang PH, Sy DT, Vu TTT, Chu HM (2018), "Overexpression of the Glycine max chalcone isomerase (*GmCHI*) gene in transgenic *Talinum paniculatum* plants", *Turkish Journal of Botany*, 42, pp. 551-558.
- [147] Peijian Tong, Xu Xu, Gang Cao, Vương Đông Jin, Yanwei Guo, Yu Thành, Hongting Jin, Letian Shan, Luwei Xiao (2014), "Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (Fuzi) of *Aconitum carmichaeli* Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate", *Journal of Ethnopharmacology*, 151 (1), pp. 740-744.
- [148] Cushnie TP, Lamb AJ (2005), "Antimicrobial activity of flavonoids", *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(5), pp. 343-356.
- [149] D Treutter (2005), "Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis", *Plant Biology (Stuttg)*, 7(6), pp. 581-591.
- [150] Pham TTN, Nguyen TNL, Bui TH, Nguyen HQ, Nguyen TT, Le VS, Chu HM (2019), "*Agrobacterium*-mediated transformation of the CrDAT gene and selection of transgenic periwinkle lines have a high vincristine accumulation", *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94, pp. 591-598.
- [151] Samuel Tuhaise, Jesca L. Nakavuma, Andrew Kiggundu (2019), "In vitro regeneration of ugandan passion fruit cultivars from leaf discs", *BMC Research Notes*, 12: 425.
- [152] Laemmli UK (1970), "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227, pp. 680-685.
- [153] Veena V, Taylor CG (2007), "*Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, pp. 383-403.

- [154] Ayyadurai V.,Ramar K. (2016), "*In vitro* direct multiple shoot induction from leaf explants of *Solanum pubescens* Willd.", *International Journal Research*, 4, pp. 23 - 28.
- [155] 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", *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, pp. 349-357.
- [156] 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 (5), pp. 890-893.
- [157] Mukundan V., Sivaram L.,Kumar A. (2002), "Micropropagation of *Tylophora asthmatica* and *Uraria picta*", *Plant Cell Biotechnol Molecular Biology*, 3, pp. 73-76.
- [158] Raghu A. V., Geetha S. P., Gerald M.,Mohan K.V. (2010), "Micropropagation of *Tribulus terrestris* Linn.", *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1 (2), pp. 232-235.
- [159] Alexander V. Vikhorev, Ksenia V. Strygina,Elena K. Khlestkina (2019), "Duplicated flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes in barley genome", *Peer Journal*, 7: e6266, doi: 10.7717/peerj.6266.
- [160] Sara Vitalinia, Alessandra Bracab, Daniele Passarellac,Gelsomina Ficod (2010), "New flavonol glycosides from *Aconitum burnatii* Gáyer and *Aconitum variegatum* L.", *Fitoterapia*, 81 (7), pp. 940-947.
- [161] Huang W, Sun W,Wang Y (2012), "Isolation and molecular characterisation of flavonoid 3'5'-hydroxylase genes from a traditional Chinese medicinal plant", *Epimedium sagittatum*, *Gene*, 497(1), pp. 125-130.
- [162] Xu W, Zhang M, Liu H, Wei K, He M, Li X, Hu D, Yang S,Zheng Y (2019), "Antiviral activity of aconite alkaloids from *Aconitum carmichaelii* Debx", *Natural Product Research*, 33, pp. 1486-1490.

- [163] 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", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, pp. 12794 - 12797.
- [164] Kress J. W., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Wei L. A., Janzen D. H. (2005), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, pp. 8369 - 8374.
- [165] Sun W., Yan B., Wang R., Liu F., Hu Z., Zhou L., Yan L., Zhou K., Huang J., Tong P., Shan L., Efferth T. (2018), "In vivo acute toxicity of detoxified Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaeli*) after a traditional detoxification process", *EXCLI journal*, 17, pp. 889–899.
- [166] Ting Wu, Xixi Zang, Mengying He, Siyi Pan, Xiaoyun Xu (2013), "Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (34), pp. 8185-8190.
- [167] An X, Wang B, Liu L, Jiang H, Chen J, Ye S, Chen L, Guo P, Huang X, Peng D (2014), "Agrobacterium-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf midribs as explants in ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud]", *Molecular Biology Reports*, 41(5), pp. 3257–3269.
- [168] Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Okinaka Y, Kiyokawa S, Kikuchi Y (1999), "Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3', 5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants.", *FEBS Lett*, 461, pp. 241-245.
- [169] Sun Y, Huang H, Meng L, Hu K, Dai SL (2013), "Isolation and functional analysis of a homolog of flavonoid 3'5'-hydroxylase gene from *Pericallis × hybrida*", *Physiology Plant*, 149 (2), pp. 151-159.

- [170] Wu Y, Wang T, Xin Y, Wang G,Xu L (2020), "Overexpression of *GbF3'5'HI* provides a potential to improve the content of epicatechin and gallic acid", *Molecules*, 25 (20): 4836 doi:10.3390/molecules25204836; PMC7594021.
- [171] Luo Y., Zhang F., Ge S.,Yang Q. (2005), *Aconitum carmichaeli* internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence, GenBank: AY571352.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY571352>, 31-DEC-2005.
- [172] Ren M. Y., Yu Q. T., Shi C. Y.,Luo J. B. (2017), "Anticancer activities of C18-, C19-, C20-, and Bis-Diterpenoid alkaloids derived from genus *Aconitum*", *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22 (2): 267.
- [173] Tsumura Y., Kawahara T., Wickneswari R.,Yoshimura K. (1996), "Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes", *Theoretical and Applied Genetics*, 93, pp. 22 - 29.
- [174] Mengbi Yang, Xiaoyu Ji,Zhong Zuo (2018), "Relationships between the Toxicities of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* (Fuzi) and the Toxicokinetics of Its Main Diester-Diterpenoid Alkaloids", *Toxins (Basel)*, 10 (10): 391.
- [175] He YN, Ou SP, Xiong X, Pan Y, Pei J, Xu RC, Geng FN, Han L, Zhang DK,Yang M (2018), "Stems and leaves of *Aconitum carmichaelii* Debx. as potential herbal resources for treating rheumatoid arthritis: Chemical analysis, toxicity and activity evaluation", *Chinese Journal of Natural Medicines*, 16, pp. 644-652.
- [176] Keiko Yonekura-Sakakibara, Yasuhiro Higashi,Ryo Nakabayashi (2019), "The origin and evolution of plant flavonoid metabolism", *Frontiers in Plant Science*, 10: 943.
- [177] Shirin Yousefian, Tahmineh Lohrasebi, Mohsen Farhadpour,Kamahldin Haghbeen (2020), "Production of phenolic acids in hairy root cultures of medicinal plant *Mentha spicata* L. in response to elicitors", *Molecular Biology Research Commun*, 9 (1), pp. 23–34.

- [178] Wang YS, Xu YJ, Gao LP, Yu O, Wang XZ, He XJ, Jiang XL, Liu Y, Xia T (2014), "Functional analysis of flavonoid 3'5'-hydroxylase from tea plant (*Camellia sinensis*): critical role in the accumulation of catechins", *BMC Plant Biology*, 10, pp. 12870-13014.
- [179] Jie Yu, Xiaojuan Bi, Bing Yu, Daiwen Chen (2016), "Isoflavones: Anti-inflammatory benefit and possible caveats", *Nutrients*, 8 (6): 361,
- [180] Hovakim Zakaryan, Erik Arabyan, Adrian Oo, Keivan Zandi (2017), "Flavonoids: promising natural compounds against viral infections", *Archives of Virology*, 162, pp. 2539–2551.
- [181] Qunfeng Zhang, Meiya Liu, Jianyun Ruan (2017), "Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves", *BMC Plant Biology*, 17: 64.
- [182] Zhi-Juan Zhang, Zhao-Yang Xia, Jin-Mei Wang, Xue-Ting Song, Jin-Feng Wei, Wen-Yi Kang (2016), "Effects of flavonoids in *Lysimachia clethroides* Duby on the activities of cytochrome P450 CYP2E1 and CYP3A4 in rat liver microsomes", *Molecules*, 21 (6): 738.
- [183] <https://www.tropicos.org/Name/27101189>. *Aconitum carmichaelii* Debex.

PHỤ LỤC LUẬN ÁN

	10	20	30	40	50	60
A. carmichaeli; AY571352.1	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAG	CGACCCGCGA	ACAAGTGAAA	ACAAACCCGG	ACGTACCGAA
A. carmichaeli; EU591980	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041716	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041717	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041718	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041719	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. japonicum; KJ078605.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. kusnezoffii; KX369351.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ITS_HSP_MH410519.1	-----	-----	GG	-----	-----	-----
ITS_QB_MH410520.1	TT	-----	T	-----	-----	-----
	70	80	90	100	110	120
A. carmichaeli; AY571352.1	GAGGGGCGCA	TGCCCCCGAT	CGCTCGCCCG	TCGGACCAAG	ACCCCTTCTG	CGGCCGCACT
A. carmichaeli; EU591980	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041716	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041717	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041718	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041719	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. japonicum; KJ078605.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. kusnezoffii; KX369351.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ITS_HSP_MH410519.1	-----	-----	T	-----	-----	-----
ITS_QB_MH410520.1	-----	G	-----	-----	-----	-----
	130	140	150	160	170	180
A. carmichaeli; AY571352.1	GATCTGCGGG	CGGAGGGG T	GGGTCTTGT	GTCCGCACAA	AAACAAAAAC	CGGCGCGACA
A. carmichaeli; EU591980	-----	G	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041716	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041717	-----	G	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041718	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041719	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. japonicum; KJ078605.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. kusnezoffii; KX369351.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ITS_HSP_MH410519.1	-----	T	-----	-----	-----	-----
ITS_QB_MH410520.1	-----	T	-----	-----	-----	-----
	190	200	210	220	230	240
A. carmichaeli; AY571352.1	GGCGCCAAGG	AAATCTTAGC	GGAAAAAGAG	GGTTGCCCGG	TCCGCGGTGG	CAGCCTTCAG
A. carmichaeli; EU591980	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041716	-----	-----	-----	-----	S	-----
A. carmichaeli; KU041717	-----	-----	-----	-----	S	-----
A. carmichaeli; KU041718	-----	-----	-----	-----	S	-----
A. carmichaeli; KU041719	-----	-----	-----	-----	S	-----
A. japonicum; KJ078605.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. kusnezoffii; KX369351.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ITS_HSP_MH410519.1	-----	C	-----	-----	-----	-----
ITS_QB_MH410520.1	-----	TT	-----	-----	-----	-----
	250	260	270	280	290	300
A. carmichaeli; AY571352.1	AATCCGATAC	TCAAACGACT	CTCGGCAACG	GATATCTCGG	CTCTTGATC	GATGAAGAAC
A. carmichaeli; EU591980	T	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041716	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041717	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041718	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041719	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. japonicum; KJ078605.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. kusnezoffii; KX369351.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ITS_HSP_MH410519.1	-----	-----	-----	-----	AA	-----
ITS_QB_MH410520.1	-----	-----	C	-----	-----	-----
	310	320	330	340	350	360
A. carmichaeli; AY571352.1	GTAGCGAAAT	GCGATACTTG	GTGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA
A. carmichaeli; EU591980	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041716	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041717	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041718	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. carmichaeli; KU041719	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. japonicum; KJ078605.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A. kusnezoffii; KX369351.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ITS_HSP_MH410519.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ITS_QB_MH410520.1	-----	-----	-----	-----	AA	-----

	370	380	390	400	410	420
A. carmichaeli: AY571352.1	CGCAAGTTGC	GCCCCAGGCC	ATTAGGTCGA	GGGCACGTCT	GCCTGGGCGT	CACACACAGC
A. carmichaeli: EU591980						
A. carmichaeli: KU041716						
A. carmichaeli: KU041717						
A. carmichaeli: KU041718						
A. carmichaeli: KU041719						
A. japonicum: KJ078605.1						
A. kusnezoffii: KX369351.1						
ITS_HSP_MH410519.1	AA.....					
ITS_QB_MH410520.1						
	430	440	450	460	470	480
A. carmichaeli: AY571352.1	GTCGCACCCC	GTCAACCACG	TTGTCGGGGA	GCGGAGATTG	GCCCCCCGGG	CCCCTGCGGG
A. carmichaeli: EU591980		A.....				
A. carmichaeli: KU041716						
A. carmichaeli: KU041717						
A. carmichaeli: KU041718						
A. carmichaeli: KU041719						
A. japonicum: KJ078605.1		M.....	KY.....			
A. kusnezoffii: KX369351.1						
ITS_HSP_MH410519.1						
ITS_QB_MH410520.1		T.....				
	490	500	510	520	530	540
A. carmichaeli: AY571352.1	CACGGTCCGC	ACAAATGTTT	GTCCCGGCG	GCGA GCGTC	GCGGTCAGTG	GTGGTTGTAT
A. carmichaeli: EU591980				A.....		
A. carmichaeli: KU041716						
A. carmichaeli: KU041717						
A. carmichaeli: KU041718						
A. carmichaeli: KU041719						
A. japonicum: KJ078605.1						
A. kusnezoffii: KX369351.1						
ITS_HSP_MH410519.1						
ITS_QB_MH410520.1						
	550	560	570	580	590	600
A. carmichaeli: AY571352.1	TTCTCATCCT	CCAAAGACAT	CAAGACGCGT	CGTCCTCGTT	GCACGTTGGG	ACACATCGAC
A. carmichaeli: EU591980						
A. carmichaeli: KU041716						
A. carmichaeli: KU041717						
A. carmichaeli: KU041718						
A. carmichaeli: KU041719						
A. japonicum: KJ078605.1						
A. kusnezoffii: KX369351.1						
ITS_HSP_MH410519.1		T.....				
ITS_QB_MH410520.1						
	610	620	630			
A. carmichaeli: AY571352.1	CCCAAGGAGC	CGCTTCGCGC	GGCATTACCC	CT		
A. carmichaeli: EU591980	T.....					
A. carmichaeli: KU041716						
A. carmichaeli: KU041717						
A. carmichaeli: KU041718						
A. carmichaeli: KU041719						
A. japonicum: KJ078605.1						
A. kusnezoffii: KX369351.1						
ITS_HSP_MH410519.1						
ITS_QB_MH410520.1	TT.....					

Phụ lục 1. Trình tự vùng *ITS* phân lập từ hai mẫu Ô đầu HSP, QB và một số trình tự vùng *ITS* của loài Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.), loài *Aconitum japonicum* và loài *Aconitum kusnezoffii*

Phụ lục 2. Kết quả phân tích bằng BLAST trong NCBI của vùng *ITS* phân lập từ mẫu Ô đầu thu tại huyện Quản Bạ (A) và huyện Hoàng Su Phì (B), tỉnh Hà Giang.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Aconitum carmichaeli internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	1109	1109	100%	0.0	98.41%	AY571352.1
✓	Aconitum nipponicum Yim1 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	1105	1105	100%	0.0	98.25%	LC378820.1
✓	Aconitum carmichaelii internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	1103	1103	100%	0.0	98.25%	MH922985.1
✓	Aconitum kusnezoffii internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	1103	1103	100%	0.0	98.25%	MH447360.1

A

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Aconitum carmichaeli internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	1092	1092	100%	0.0	97.94%	AY571352.1
✓	Aconitum nipponicum Yim1 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	1088	1088	100%	0.0	97.78%	LC378820.1
✓	Aconitum kusnezoffii var. gibbiferum voucher WT20141009_29 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, com	1088	1088	99%	0.0	98.08%	KX369365.1
✓	Aconitum carmichaelii internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	1086	1086	100%	0.0	97.78%	MH922985.1
✓	Aconitum kusnezoffii internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	1086	1086	100%	0.0	97.78%	MH447360.1

B

Phụ lục 3. Trình tự đoạn gen *matK* phân lập từ hai mẫu Ô đầu HSP, QB và một số trình tự gen *matK* của loài Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.), loài *Aconitum japonicum* và loài *Aconitum kusnezoffii*

matK_KX347251.1_A.carmichaelii	10	20	30	40	50	60
matK_KY407560.1_A.carmichaelii	GAGGATCCGC	TGTAATAATG	AGAAACATTT	CTGCATATTC	GACCAAATCT	ATTGATAATA
matK_HSP_LS398144.1						
matK_QB_LS398143					T.....	
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii						
matK_KT820670.1_A.japonicum						
matK_KX347251.1_A.carmichaelii	70	80	90	100	110	120
matK_KY407560.1_A.carmichaelii	TCAGAAATCGG	ATGAATCGGC	CCAAGTCGGC	TTACTGATGG	GATGCCCTGA	TAAAGTTACAA
matK_HSP_LS398144.1						
matK_QB_LS398143						
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii						
matK_KT820670.1_A.japonicum						
matK_KX347251.1_A.carmichaelii	130	140	150	160	170	180
matK_KY407560.1_A.carmichaelii	AATTTTCGATT	TAGCCAGTGA	TTCAATCAAA	GGAATAATTG	GGACTATAGT	ATCAAACTTA
matK_HSP_LS398144.1						
matK_QB_LS398143						
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii						
matK_KT820670.1_A.japonicum						
matK_KX347251.1_A.carmichaelii	190	200	210	220	230	240
matK_KY407560.1_A.carmichaelii	TTAATAGCAA	TATCTATAAT	AAATGAATTT	TCTAACATTT	GACTCCTTAC	CACGTGAAGGA
matK_HSP_LS398144.1						
matK_QB_LS398143						
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii						
matK_KT820670.1_A.japonicum						
matK_KX347251.1_A.carmichaelii	250	260	270	280	290	300
matK_KY407560.1_A.carmichaelii	TTTGGTCGTA	CAGTTGAAAA	ATAGCCCAGA	AAATCTATAA	AATGATTGGA	TAAATGGTTT
matK_HSP_LS398144.1						
matK_QB_LS398143						
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii						
matK_KT820670.1_A.japonicum						
matK_KX347251.1_A.carmichaelii	310	320	330	340	350	360
matK_KY407560.1_A.carmichaelii	ATATGAATCC	TATTCGGTTG	AGACCAAAAA	AAAAAATGAC	ATTCCCATAA	ATTTACAAGG
matK_HSP_LS398144.1				G.....	T.....	
matK_QB_LS398143						
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii						
matK_KT820670.1_A.japonicum						
matK_KX347251.1_A.carmichaelii	370	380	390	400	410	420
matK_KY407560.1_A.carmichaelii	TAAATATTTCC	ATTTCTTCAT	CAGAAAGAGGA	GTTCCCTTTG	AAGACAGAAAT	TGATTTTCTC
matK_HSP_LS398144.1	A.....		..A..A....		..A.....	
matK_QB_LS398143	A.....		..A..A....		..A.....	
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii						
matK_KT820670.1_A.japonicum						
matK_KX347251.1_A.carmichaelii	430	440	450	460	470	480
matK_KY407560.1_A.carmichaelii	TGATATCTGA	AATAATGGAT	GAAAAATATCC	TTGAACAACC	AAAGGATGGT	ATGAAAAATCA
matK_HSP_LS398144.1		G.....				
matK_QB_LS398143		A.....				
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii						
matK_KT820670.1_A.japonicum						

```

                                490       500       510       520       530       540
matK_FX347251.1_A.carmichaelii  TTACGAAAAA CCACATAAAA ATGTTCTATT TTTCCAAAAA AATGTGTTCTG ATCAAGAAAA
matK_KY407560.1_A.carmichaelii .....
matK_HSP_LS398144.1             .....A..... .....G.....
matK_QB_LS398143                .....A..... ...ACT.....
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii    .....
matK_KT820670.1_A.japonicum     .....

                                550       560       570       580       590       600
matK_FX347251.1_A.carmichaelii  GTTCTAGAGG ATGTTGATCG TAAATGAGAA GATTGTTTAC GCAGAAAAAC GAATATGGAT
matK_KY407560.1_A.carmichaelii .....
matK_HSP_LS398144.1             .....
matK_QB_LS398143                .....
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii    .....
matK_KT820670.1_A.japonicum     .....

                                610       620       630       640       650       660
matK_FX347251.1_A.carmichaelii  TCCGACTCAT ATACATGAAA ATTATATAGG AACAGAAAAA ATCTTTGATT CTCTTTTGAA
matK_KY407560.1_A.carmichaelii .....
matK_HSP_LS398144.1             .....
matK_QB_LS398143                .....
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii    .....
matK_KT820670.1_A.japonicum     .....

                                670       680       690       700       710       720
matK_FX347251.1_A.carmichaelii  AAAAAAGAAAT TCATTTGATT TTTTGTAGTA ATAAGAAATAT TCCAATGATG ATACTCGTAG
matK_KY407560.1_A.carmichaelii .....
matK_HSP_LS398144.1             .....
matK_QB_LS398143                .....G. AA.....
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii    .....
matK_KT820670.1_A.japonicum     .....

                                730       740       750       760       770       780
matK_FX347251.1_A.carmichaelii  AGAAAGAGTC TCAATAAGTG CAAAAAGGGG ACATCTTGTA TCCAACAACG AAGGATTGTA
matK_KY407560.1_A.carmichaelii .....
matK_HSP_LS398144.1             .....
matK_QB_LS398143                .....
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii    .....
matK_KT820670.1_A.japonicum     .....

                                790       800       810       820
matK_FX347251.1_A.carmichaelii  ACCAATAGTT CCAGATGGAT AGGATGGGGT ATTAGGATAT --
matK_KY407560.1_A.carmichaelii .....
matK_HSP_LS398144.1             ...AA..AT... .....GT
matK_QB_LS398143                .....
matK_KT820671.1_A.kusnezoffii    .....
matK_KT820670.1_A.japonicum     .....

```

Phụ lục 4. Kết quả phân tích bằng BLAST trong NCBI của đoạn gen *matK* phân lập từ mẫu Ô đầu thu tại huyện Hoàng Su Phì (A) và Quản Bạ (B), tỉnh Hà Giang

☒ select all 100 sequences selected

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Aconitum carmichaelii plastid:chloroplast genomic DNA containing MatK gene region, isolate HSP, Hagiang	1519	1519	100%	0.0	100.00%	LS398144.1
☒	Aconitum japonicum subsp. maritimum Cy2 chloroplast matK gene for maturase K, partial cds	1443	1443	99%	0.0	98.41%	LC378835.1
☒	Aconitum carmichaelii chloroplast, complete genome	1443	1443	99%	0.0	98.41%	KY407560.1
☒	Aconitum kusnezoffii voucher NIBR:VP0000529885 chloroplast, complete genome	1443	1443	99%	0.0	98.41%	KT820671.1
☒	Aconitum japonicum subsp. napiforme voucher NIBR:VP0000494223 chloroplast, complete genome	1443	1443	99%	0.0	98.41%	KT820670.1
☒	Aconitum jaluense subsp. jaluense voucher NIBR:VP0000494214 chloroplast, complete genome	1443	1443	99%	0.0	98.41%	KT820668.1
☒	Aconitum ciliare voucher NIBR:VP0000486323 chloroplast, complete genome	1443	1443	99%	0.0	98.41%	KT820666.1
☒	Aconitum carmichaelii voucher ACAR20151205 chloroplast, complete genome	1443	1443	99%	0.0	98.41%	KX347251.1
☒	Aconitum jaluense subsp. jaluense KqK1 chloroplast matK gene for maturase K, partial cds	1437	1437	99%	0.0	98.29%	LC456242.1

A

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Aconitum carmichaelii plastid:chloroplast genomic DNA containing MatK gene region, isolate QB, Hagiang	1519	1519	100%	0.0	100.00%	LS398143.1
☒	Aconitum japonicum subsp. maritimum Cy2 chloroplast matK gene for maturase K, partial cds	1441	1441	100%	0.0	98.30%	LC378835.1
☒	Aconitum carmichaelii chloroplast, complete genome	1441	1441	100%	0.0	98.30%	KY407560.1
☒	Aconitum kusnezoffii voucher NIBR:VP0000529885 chloroplast, complete genome	1441	1441	100%	0.0	98.30%	KT820671.1
☒	Aconitum japonicum subsp. napiforme voucher NIBR:VP0000494223 chloroplast, complete genome	1441	1441	100%	0.0	98.30%	KT820670.1
☒	Aconitum jaluense subsp. jaluense voucher NIBR:VP0000494214 chloroplast, complete genome	1441	1441	100%	0.0	98.30%	KT820668.1
☒	Aconitum ciliare voucher NIBR:VP0000486323 chloroplast, complete genome	1441	1441	100%	0.0	98.30%	KT820666.1
☒	Aconitum carmichaelii voucher ACAR20151205 chloroplast, complete genome	1441	1441	100%	0.0	98.30%	KX347251.1
☒	Aconitum jaluense subsp. jaluense KqK1 chloroplast matK gene for maturase K, partial cds	1435	1435	100%	0.0	98.18%	LC456242.1

B

Phụ lục 5. Trình tự nucleotide đoạn gen *rpoC1* phân lập từ cây Ô đầu Quán Bạ, Hà Giang và trình tự mang mã số KX347251 trên GenBank.

```

      10      20      30      40      50      60
rpoC1-KX347251  OTGGATACACTTCTTGAATAATGGAACCAATGAAGGACCGTCATAATAAAATTTACAAATC
rpoC1-HG.seq    .....

      70      80      90     100     110     120
rpoC1-KX347251  GTTTTCAGATGTAAATTGAAGGAAAAGAGGGAAGATTTCCGAAACTCTGCTTGGTAAACG
rpoC1-HG.seq    .....

     130     140     150     160     170     180
rpoC1-KX347251  GGTTCGATTATTGGGGCGGTCCGTCAATTGTCGTGGGCCCTTCGCTTTCATTACATCGATG
rpoC1-HG.seq    .....

     190     200     210     220     230     240
rpoC1-KX347251  TGGATTGCCTCGCGAAATAGCAATAGAGCTTTTCCATACATTGTAAATTCGTGGTCTAAT
rpoC1-HG.seq    .....

     250     260     270     280     290     300
rpoC1-KX347251  CAGACAACACGTTGCTCCAAACATAGGAATTCTAAAAATAAAAATTCGGAAGAAAACACC
rpoC1-HG.seq    .....

     310     320     330     340     350     360
rpoC1-KX347251  AATTGTGTGGAATACTTCAAGAAATTATGCAAGGACATCCTGTATTGCTGAATAGAAC
rpoC1-HG.seq    .....

     370     380     390     400     410     420
rpoC1-KX347251  ACCTACTTTGCATAGATTAGGCATACAGGCCTTCCAACCCATTTTAGTGAAGGGCGGTGC
rpoC1-HG.seq    .....

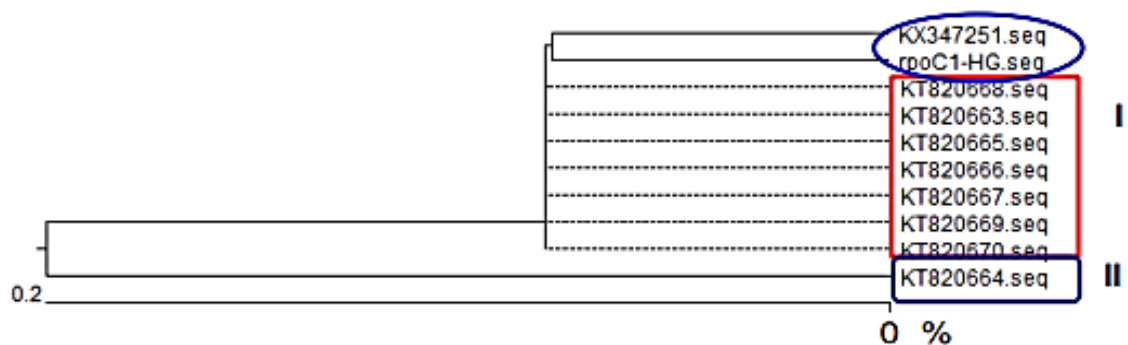
     430     440     450     460     470     480
rpoC1-KX347251  TATTTGTTTACATCCATTAGTTTGTAAAGGATTCAATGCAGACTTTGATGGGGATCAAAAT
rpoC1-HG.seq    .....

     490     500     510     520     530     540
rpoC1-KX347251  GGCTGTTTCATATACCTTTATCTTTGGAGGCTCAAGCGGAGGCGCGTTTACTTATGTTTTC
rpoC1-HG.seq    .....C.....

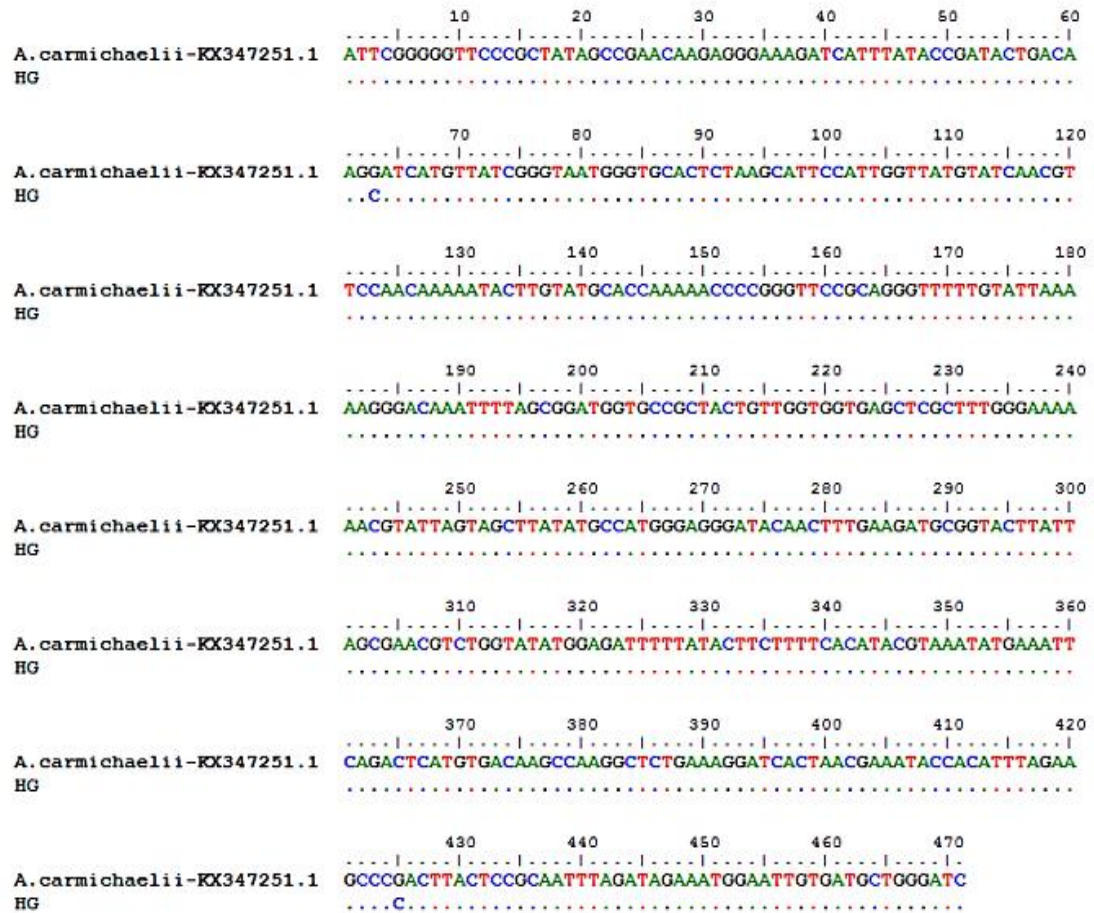
rpoC1-KX347251  TCA
rpoC1-HG.seq    ...

```

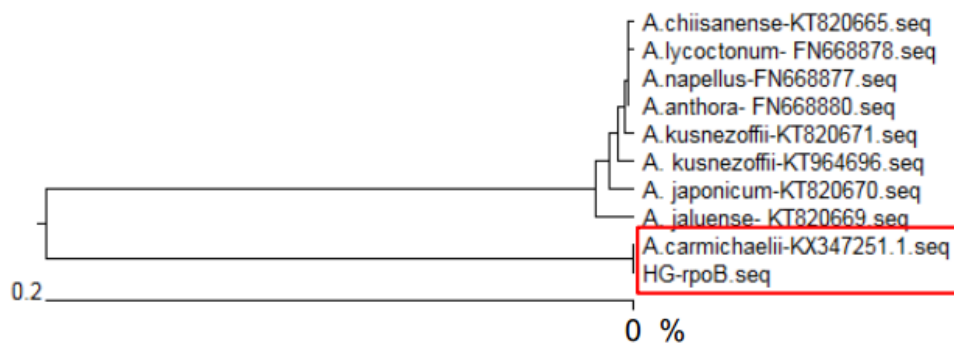
Phụ lục 6. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ di truyền giữa các loài Ô đầu trong chi *Aconitum* dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1*



Phụ lục 7. Trình tự nucleotide đoạn gen *rpoB2* phân lập từ mẫu Ô đầu Quán Bạ, Hà Giang và trình tự mang mã số *KX347251* trên GenBank



Phụ lục 8. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ di truyền giữa các loài Ô đầu trong chi *Aconitum* dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoB2*.



Phụ lục 9. Trình tự nucleotide của gen *AcF3* 5' *H* phân lập từ cây Ô đầu và trình tự nucleotide của gen *F3* 5' *H* của Ô đầu mang mã số JN635708.1 trên GenBank

```

      10      20      30      40      50      60
JN635708.1  ATGTTGTCTA CCAGAGAACT TGTGCTGCA GCGATCATT TTTTCATTGC CCGTCTCTTC
AcF3'5'H-QB .....

      70      80      90     100     110     120
JN635708.1  CTGCGTTTCT TGTGCTCATC GAAACAAGCA CGCAAGCTTC CTCGCCGTCG GAAACGATCG
AcF3'5'H-QB .....A.....

     130     140     150     160     170     180
JN635708.1  CCAGTGGTGG GCGCATTACC CCTGCTGGGA TCCATGCCCTC ATGTTGCCCT GGCCAAGATG
AcF3'5'H-QB .....

     190     200     210     220     230     240
JN635708.1  TCCACGCAAT ACCGCCCCAT TGTCTACCTC AAATTAGCTT CGTCTGCTAT GCTTGTCGCT
AcF3'5'H-QB .....

     250     260     270     280     290     300
JN635708.1  TCAACCCCGG ATTCGGCTCG TACGTTTTTG AAAACCCCTAG ACCTAAACTT CTCCAATCGC
AcF3'5'H-QB .....

     310     320     330     340     350     360
JN635708.1  CCGACCGATG CAGGTGCAAC TCATATCGCG TATAACTCAC ACGAGATGCT GTTTCGGGAC
AcF3'5'H-QB .....

     370     380     390     400     410     420
JN635708.1  TATGGGCCGA GGTGGAAGTT GTTGCGTAAA CTGACTAGCT TGCATATGTT AGGCAGTAAG
AcF3'5'H-QB .....

     430     440     450     460     470     480
JN635708.1  CCCATTGAAG ACTCGCCTAG AGTCAGCCCG GATGAGGTCG GGTACATGCT TAAAGCCATC
AcF3'5'H-QB .....

     490     500     510     520     530     540
JN635708.1  TACGAGTCTA GCTGCGTGGG GGAGGTGGTT GTTGTCGCCG ATATGCTGGT GTTTGCTATG
AcF3'5'H-QB .....

     550     560     570     580     590     600
JN635708.1  CGGAATATGC TTGGGCAGCT AATACTGACC CGCCGTGTGT TTGTTACGAA AGCTCTCGAC
AcF3'5'H-QB .....

     610     620     630     640     650     660
JN635708.1  TCGAATGAGT TTAAGGAGAT GGTGATCGAC CTAATGACAT CAGCGGGGTT GTTTAATGTT
AcF3'5'H-QB .....

     670     680     690     700     710     720
JN635708.1  GGTGATTATA TTCCTTCGAT TGCATGGATG GATCTGCAGG GTATTGTGCG GGGAAATGAAA
AcF3'5'H-QB .....

     730     740     750     760     770     780
JN635708.1  CGTTTGCACA GCAAGTTCGA TCGGCTTTTG GACAAAAACT TGAAGGAACA TATGCCGACG
AcF3'5'H-QB .....A.....

     790     800     810     820     830     840
JN635708.1  AGGGATGAGA GGAAGGAGAA GCCGGACTTA CTCCATGTTT TGATGGATAA CAGCGACAAAT
AcF3'5'H-QB .....T.

```

```

      850      860      870      880      890      900
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB AAGTCTGAGC AGGAGAGCCT TACTGACACC AACATCAACG CTCTTCTCTT GAAGTTATTG
              .....

      910      920      930      940      950      960
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB TCAGCTGGAA CAGACACATC CTCGAGCACA ATCGAATGCG CACTGACAGA GATGATAAAG
              .....T.....

      970      980      990     1000     1010     1020
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB AACCGAAGCA TACTCAAGCG CGCACACGCC GAAATGGATC AGGTCATTGG CAGGAACCGC
              .....G.....

      1030     1040     1050     1060     1070     1080
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB AGCGTTGAAG AGTCTGACAT ACCGAAACTC CCCTACTTAG AAGCAATATG CAAAGAAACA
              .....

      1090     1100     1110     1120     1130     1140
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB TTCACGAAAC ACCCCTCAAC CCGCGTTAAC CTTCCAGAGC TGGCCATCGA ACCCTCCGAA
              .....

      1150     1160     1170     1180     1190     1200
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB ATAGACCGAT ACTACATCCC CAAAGGCCCA AGACTCAGTC TGAACATATG GCGCATCGGG
              .....

      1210     1220     1230     1240     1250     1260
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB CGAGACCCAG ACGTGTGGGA GAATCCGCTC GAGTTCAACC CCGACAGATT CTTAATAAGG
              .....

      1270     1280     1290     1300     1310     1320
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB AAAATGCCAA AATTCGATCC ACCGGGAAAT AACTTCGAGC TGATACCATT TGGGCGAGGG
              .....

      1330     1340     1350     1360     1370     1380
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB AGGACGATAT CTGCACCGAC TAGGATCCGA ATTCTTCTTG TTGACTACAT ATTCCCGACC
              .....C.....

      1390     1400     1410     1420     1430     1440
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB CTTGTCCATC CATTTCGAATC GAAGATCCCT GATCGACAGA CCCTAAACAT CGACGAAGCC
              .....

      1450     1460     1470     1480     1490     1500
JN635708.1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB TTTGGTTTAG CTCTACACAA GCGTGTGCCC CTTGCTGCTG TTGTTACCCC TCGCCTCCCA
              .....A.....

      1510     1520
JN635708.1  ....|....| ....|....|
AcF3'5'H-QB CCCTCTCCTT ATCTAGTCTG A
              .....C.....

```

Phụ lục 10. Trình tự amino acid suy diễn từ đoạn mã hóa của gen *F3'5'H* mang mã số JN635708.1 trên GenBank và từ gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu Quân Bạ, Hà Giang

	10	20	30	40	50	60
JN635708.1	MLSTRELVA	AIIFFIARLF	VRFLCSSKQA	RKLPPGPKGW	PVVGALPLLG	SMPHVALAKM
AcF3'5'H-QB						
	70	80	90	100	110	120
JN635708.1	SRQYGPVIVL	KLGSCEMVVA	STPDSARTFL	KTLDLNFSNR	PTDAGATHIA	YNSQDMVFAD
AcF3'5'H-QB						
	130	140	150	160	170	180
JN635708.1	YGPRWKLLRK	LTSIHMLGSK	AIEDWARVRR	DEVGVMVKAM	YESSCVGEVV	VVPDMLVFAM
AcF3'5'H-QB						
	190	200	210	220	230	240
JN635708.1	ANMLGQVILS	RRVFVTKGVE	SNEFKEMVID	LMTSAGLFNV	GDYIPSIAMW	DLQGIVRGMK
AcF3'5'H-QB						
	250	260	270	280	290	300
JN635708.1	RLHRKFDALL	DKKLKEHMA	RDERKEKPD	LDVLMNDRN	KSEQRILTDT	NIKALLNL
AcF3'5'H-QB	I			I		
	310	320	330	340	350	360
JN635708.1	SAGTDTSST	IEWALTEMIK	NRSILKRAHA	EMDQVIGRNR	RLEESDIPKL	PYLQAICKET
AcF3'5'H-QB		V	V			
	370	380	390	400	410	420
JN635708.1	FRKHPSTPLN	LPRVAIEPCE	IDGYIIPKGT	RLSVNIWAIG	RDPDVWENPL	EFNPDRFLIG
AcF3'5'H-QB						
	430	440	450	460	470	480
JN635708.1	KMAKIDPRGN	NFELIPFGAG	RRICAGTRMG	IVLVEYILGT	LVHAFEWKMP	DGETLNMDEA
AcF3'5'H-QB				A		
	490	500				
JN635708.1	FGLALQKGV	LAADVTPRLP	PSAYVV			
AcF3'5'H-QB	Y		L			

Phụ lục 11. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường	Thành phần
LB lỏng	Bacto pepton 10 g/l + NaCl 5 g/l + Yeast Extract 5 g/l, pH = 7
LB đặc	LB lỏng + agar 8 g/l

Phụ lục 12. Thành phần môi trường tái sinh cây thuốc lá chuyển gen

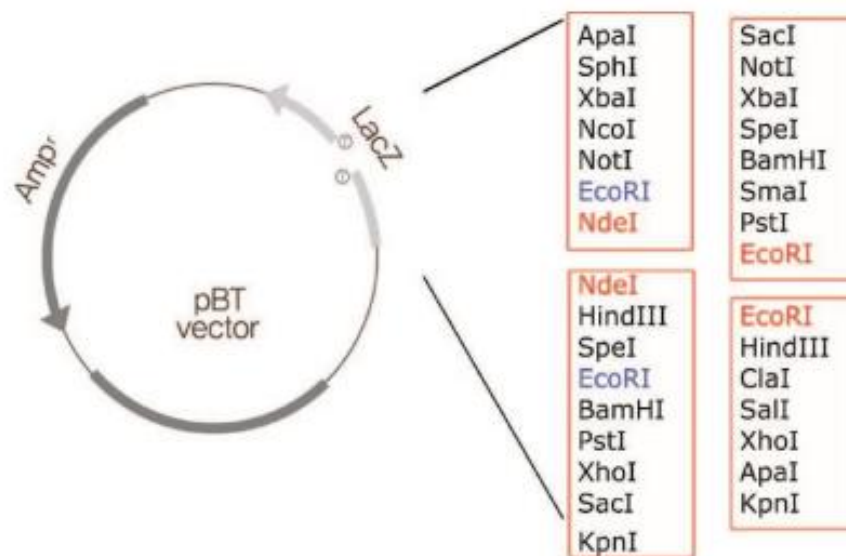
Môi trường	Thành phần cho 1 lít dung dịch
MS ₁	CaCl ₂ 0,44 g
MS ₂	KNO ₃ 1,9 g + KH ₂ PO ₄ 0,17 g + NH ₄ NO ₃ 1,65 g + MgSO ₄ .7H ₂ O 0,37 g
MS ₃	H ₃ BO ₃ 6,2 mg + MnSO ₄ .4H ₂ O 22,3 mg + CoCl ₂ .6H ₂ O 0,025 mg + CuSO ₄ .5H ₂ O 0,025 mg + ZnSO ₄ .7H ₂ O 8,6 mg + Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,25 mg + KI 0,83 mg
MS ₄	FeSO ₄ .7H ₂ O 27,8 mg + Na ₂ EDTA 37,3 mg
MS ₅	Myo-Inositol 100 mg + Thiamine HCl 0,1 mg + Pyridoxine HCl 0,5 mg + Nicotic acid 0,5 mg + Glycine 2 mg
MS	20 ml stock MS ₁ + 20 ml stock MS ₂ + 5 ml stock MS ₃ + 5 ml stock MS ₄ + 5 ml stock MS ₅
½MS	10 ml stock MS ₁ + 10 ml stock MS ₂ + 2,5 ml stock MS ₃ + 2,5 ml stock MS ₄ + 2,5 ml stock MS ₅
GM	MS + BAP 1 mg/l + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l Bổ sung kanamycin 50 mg/l + cefotaxime 500 mg/l
RM	MS + IBA 0,1 mg/l + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l Bổ sung kanamycin 50 mg/l

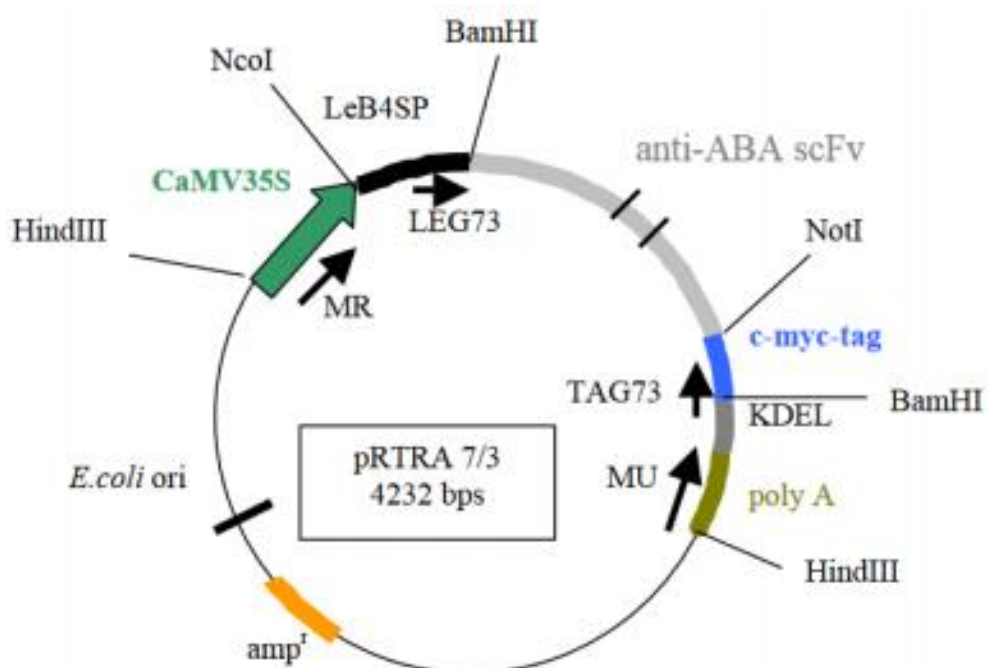
* Ghi chú: Các môi trường đều được chuẩn pH = 5,6 và khử trùng. Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25 ± 2°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/ngày

Phụ lục 13. Thành phần môi trường tái sinh cây Ô đầu chuyển gen

Kí hiệu	Thành phần
CCM	MS + muối B5 0,42 g/l + MES 3,5 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l Bổ sung: vitamin B5 1 mg/l + AS 100 μ m/l + L-cysteine 400 mg/l + BAP 1,5 mg/l
SIM1	MS + muối B5 3,20 g/l + MES 1,0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l Bổ sung: vitamin B5 1 mg/l + BAP 1,5 mg/l + Kanamycin 50 mg/l
SIM2	MS + muối B5 3,20 g/l + MES 1,0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l Bổ sung: vitamin B5 1 mg/l + BAP 1,5 mg/l + Kanamycin 75 mg/l
SEM	MS + MES 1,0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l Bổ sung: vitamin B5 1 mg/l + L-asparagine 75 mg/l + L-pyroglutamic acid 100 mg/l + GA ₃ 1,0 mg/l + IAA 0,1 mg/l + Kanamycin 50 mg/l
RM	MS + MES 1,0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 12 g/l + nước dừa 100 ml/l Bổ sung: IBA 0,5 mg/l + Kanamycin 50 mg/l

* Ghi chú: Các môi trường đều được chuẩn pH = 5,6 và khử trùng. Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/ngày.

Phụ lục 14. Sơ đồ cấu trúc vector pBT, pRTRA7/3, pCB301**Phụ lục 14.1.** Sơ đồ cấu trúc vector tách dòng pBT

Phụ lục 14.2. Sơ đồ cấu trúc vector pRTRA7/3**Phụ lục 14.3.** Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pCB301