

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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

THÁI NGUYÊN - 2022

Công trình được hoàn thành tại:
Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

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

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường
hợp tại: Trường Đại học Sư phạm.-Đại học Thái Nguyên
Vào hồi giờ phút, ngày tháng năm 2022

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia Việt Nam
2. Trung tâm Số - Đại học Thái Nguyên
3. Thư viện Trường Đại học Sư phạm.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

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 Ngọc 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 Thi 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 Thi 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 Thi 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.

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

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. 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 được tìm thấy mọc hoang ở vùng núi cao phía Bắc Việt Nam và sau đó cây Ô đầu đã được đưa vào trồng ở Hà Giang, Lào Cai, Lai Châu. Hiện nay, cây Ô đầu được trồng nhiều ở huyện Quan Ba, Đồng Văn, tỉnh Hà Giang.

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. 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, tham gia phản ứng chuyển naringenin thành flavonoid. 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. 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.

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 nên 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.
- 2) Nghiên cứu thiết lập hệ thống nuôi cấy *in vitro* và tạo rễ tơ ở 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.
- 4) Nghiên cứu biến nạp và biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở cây Thuốc lá.
- 5) Nghiên cứu biến nạp và biểu hiện gen *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu.

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 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 và 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

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 được 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.

6. Cấu trúc của luận án

Luận án có 152 trang (kể cả phụ lục), được chia thành các chương, phần: Mở đầu (5 trang); Chương 1: Tổng quan tài liệu (37 trang); Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (18 trang); Chương 3: Kết quả và thảo luận (51 trang); Kết luận và đề nghị (2 trang); Các công trình công bố liên quan đến luận án (2 trang); Tài liệu tham khảo (23 trang); Phụ lục (14 trang). Luận án có 11 bảng, 40 hình, 14 phụ lục và tham khảo 183 tài liệu.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo và tổng kết 183 tài liệu, trong đó có 20 tài liệu tiếng Việt, 162 tài liệu tiếng Anh về ba vấn đề cơ bản, đó là: (1) Cây Ô đầu; (2) Nuôi cấy *in vitro* và cảm ứng tạo rễ tơ ở cây dược liệu bằng nuôi cấy *in vitro*; (3) Flavonoid và nghiên cứu biểu hiện gen flavonoid 3'5' hydroxylase;

Ô đầu có tên khoa học là *Aconitum carmichaelii* Debx., thuộc chi *Aconitum* L., chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học là flavonoid có tác dụng giảm đau, tăng cường miễn dịch, chống oxy hóa, chống tăng sinh tế bào, chống ung thư, tác dụng trên tim mạch, chống viêm, chống tiêu chảy... Hiện nay, chưa có công trình nghiên cứu về ứng dụng mã vạch DNA (*matK*, *rpoC1*, *rpoB2*) để định danh các mẫu Ô đầu trong tự nhiên. Chính vì vậy, chúng tôi kết hợp cả phương pháp hình thái so sánh và phương pháp phân loại học phân tử để nhận diện mẫu Ô đầu thu tại một số huyện của Hà Giang.

Flavonoid được tổng hợp theo con đường phenylpropanoid nói chung nhờ hoạt động của phức hợp đa enzyme, bao gồm CHS, CHI, F3H, F3'H, F3'5'H, FLS, FST. Hydroxyl hóa vị trí 5' bởi F3'5'H là một bước đặc biệt quan trọng, xác định sản phẩm cuối cùng tri-hydroxyl vòng B hình thành flavonoid trong thực vật.

Ở cây Ô đầu, gen *F3'5'H* phân lập từ mRNA 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. Đã có những nghiên cứu về chức năng sinh học của gen *F3'5'H* cho 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. Các kết quả nghiên cứu biểu hiện gen *F3'5'H* đều khẳng định sự biểu hiện mạnh gen *F3'5'H* đều làm tăng hàm lượng flavonoid. Như vậy việc tác động đến enzyme F3'5'H có thể làm tăng tích lũy flavonoid. 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.

Trên thế giới, đã có những nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ thu nhận camptothecin ở cây hạnh phúc (Lorence và cs 2004); alkaloid trong rễ tơ của cây thuốc phiện (Le và cs, 2004), β -carboline ở cây bạch tật lê (Sara và cs, 2014)... Ở Việt Nam, Hà Thị Loan và cs (2014) và Ninh Thị Thảo và cs (2015) tạo rễ tơ Sâm Ngọc Linh và Đan sâm để thu nhận saponin, Vũ Thị Như Trang và cs (2017) tạo rễ tơ cây thổ nhân sâm để tăng cường hàm lượng flavonoid... 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 và cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.).

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

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 để định danh loài, tách chiết DNA và làm nguyên liệu nuôi cấy *in vitro*. Giống Thuốc lá K326 (*Nicotiana tabacum*), các vector sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: vector pBT, pRTRA7/3, pCB301 và chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α , *Agrobacterium tumefaciens* CV58, *Agrobacterium rhizogens* ATTC 15834. Các cặp mồi PCR 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'	Sản phẩm (bp)
<i>ITS-F/ITS-R</i>	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	630
	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	
<i>rpoC1-F/ rpoC1-R</i>	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	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	
<i>F3'5'H-NcoI-F /F3'5'H-SacI-R</i>	ATGCGGCCGCGACTACATAAGCAGAGGGTG	1611
	AGCCATGGATGTTGTCTACCAGAGAACTTG	
	TCGCTGCAGCGATCATTTTTTTCATT	
	TAGAGCTCCGCTGATGTATTCGTCTCCCAC	

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nhóm phương pháp định danh loài Ô đầu

Phương pháp định danh mẫu cây Ô đầu bằng phương pháp hình thái so sánh theo Phạm Hoàng Hộ (1999), Đỗ Tất Lợi (2004), tra cứu trên trang web Tropicos và

phương pháp phân loại học phân tử dựa vào một số mã vạch DNA như vùng *ITS*, đoạn gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB2*.

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

Nghiên cứu hệ thống tái sinh *in vitro* phục vụ chuyển gen và phương pháp cảm ứng rễ to, nhân nuôi rễ to và xác định khối lượng rễ khô.

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

Phân lập gen và tách dòng phân tử:

Từ thông tin về trình tự gen *F3'5'H* của Ô đầu mang mã số JN635708.1 trên GenBank, 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*.

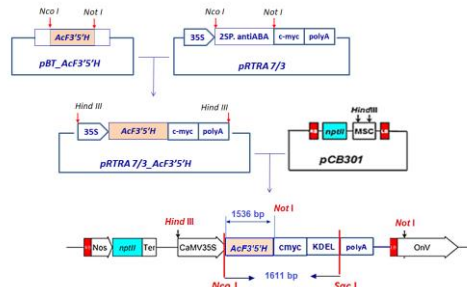
RNA tổng số được tách bằng kit GeneEluteTM Total RNA Miniprep của hãng Sigma. cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng kit SuperScriptTM VILOTM cDNA Synthesis.

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

Kỹ thuật tách dòng gen được thực hiện theo Sambrook và cs. 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 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.

Thiết kế vector biểu hiện gen:

Các thí nghiệm thiết kế vector được thực hiện theo sơ đồ hình 2.2.



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

Tạo *Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp:

Biến nạp vector *pCB301_AcF3'5'H* vào tế bào khả biến *A. tumefaciens* CV58 và tiến hành chọn dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp *pCB301_AcF3'5'H* bằng colony-PCR.

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

Biến nạp di truyền vào Thuốc lá: Chuẩn bị khuẩn lây nhiễm, chuyển gen *AcF3'5'H* vào thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*.

Biến nạp di truyền vào Ô đầu: Tạo nguyên liệu biến nạp gen, thiết lập thí nghiệm chuyển gen thông qua chuyển gen chỉ thị *uidA* ở cây Ô đầu, Chuyển cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmcy_polyA* vào cây Ô đầu.

Phân tích cây chuyển gen: Cây Thuốc lá chuyển gen và 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.

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

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 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.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

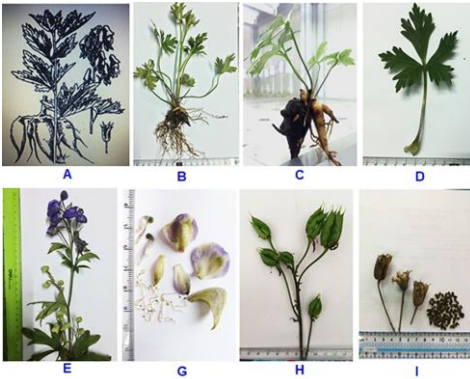
3.1. KẾT QUẢ ĐỊNH DANH LOÀI Ô ĐẦU (*Aconitum carmichaelii*)

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 thu từ các loài 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).

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), Đỗ Tất Lợi (2004) và đồng thời tra cứu trên trang web Tropicos 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).

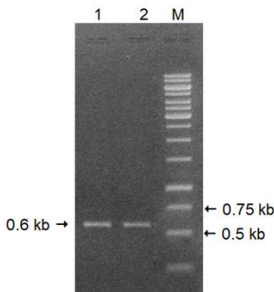


Hình 3.1. Cây Ô đầu. A: Hình vẽ Ô đầu theo Đỗ Tất Lợi (2004); B: Ô đầu gồm rễ và hình thành củ; C: Cây Ô đầu gồm củ mẹ, củ con; D: Lá Ô đầu và cuống lá; E: Cảnh mang hoa và hoa Ô đầu; F: Các bộ phận của hoa Ô đầu; G: Quả Ô đầu; H: Quả khô và hạt Ô đầu (B, C, D, E, G, H, I: Ảnh do tác giả chụp).

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

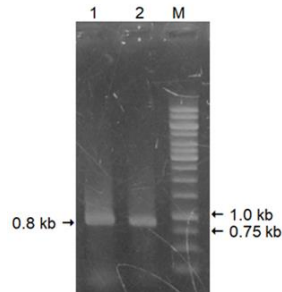
3.1.2.1. Đặc điểm trình tự vùng *ITS*

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)



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 Quản Bạ (QB)

Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được vùng *ITS* có kích thước 630 bp. Bảng 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



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

trên GenBank là AY571352 và MH922985). 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.

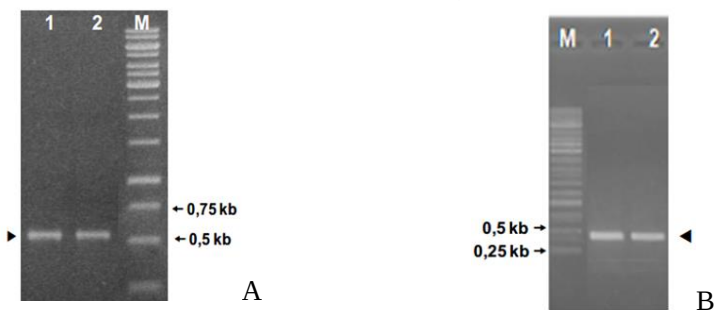
3.1.2.2. Đặc điểm trình tự đoạn gen *matK*

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 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. Kết quả phân tích BLAST dựa trên trình tự nucleotide có 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, LS398144.1.

Như vậy, trình tự vùng *ITS* và đoạn gen *matK* cho phép nhận diện được mẫu Ô đầu thu tại Hoàng Su Phì và Quản Bạ thuộc loài *Aconitum carmichaelii* Debx.

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).



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. 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 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. 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.

3.1.3. Thảo luận kết quả định danh mẫu Ô đầu

Ô đầu (*A. carmichaelii* Debx.) là loài cây thảo được 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), Đỗ Tất Lợi (2004). 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. Vì vậy, việc kết hợp phương pháp hình thái so sánh với mã vạch DNA (vùng *ITS*, đoạn gen *matK*, *rpoC1* và *rpoB2*) 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. 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 Y và cs (2005) giải trình tự có mã số trên GenBank là AY571352. Kết quả này làm cơ sở để khẳng định các mẫu Ô đầu thu tại tỉnh Hà Giang, Việt Nam thuộc loài *A. carmichaelii*, chi *Aconitum* L, 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*. Ở Việt Nam, Vũ Đức Lợi và cs (2014) 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*, vì thế chúng tôi cho rằng trình tự *matK* là một ứng cử viên 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 ĐÀU

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

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 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.

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

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

Nồng độ BAP 1,5 mg/l và kinetin 1,0 mg/l thích hợp cho tái sinh đa chồi *in vitro* từ mẫu cây là đoạn thân mang đốt ($p < 0,05$) (Bảng 3.2).

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 8 tuần						
1,0	$3,13^c \pm 0,10$	$2,58^c \pm 0,13$	++	$3,80^d \pm 0,14$	$3,38^d \pm 0,18$	+++
1,5	$4,57^d \pm 0,14$	$3,50^d \pm 0,16$	+++	$3,20^c \pm 0,09$	$2,35^c \pm 0,15$	++

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; $n = 30$.

Môi trường MS cơ bản được bổ sung sucrose 30 g/l và agar 9 g/l và BAP 1,5 mg/l cho số lượng chồi/mẫu cây 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 ($P < 0,05$).

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

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 8 tuần						
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	$3,07^d \pm 0,07$	$2,98^d \pm 0,15$	+++	$2,27^b \pm 0,15$	$2,32^c \pm 0,14$	++

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 cây 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).

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

Tỷ lệ cây sống ở các giá thể sau 4 tuần trên giá thể đất phù sa + trấu hun + xơ dừa (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.

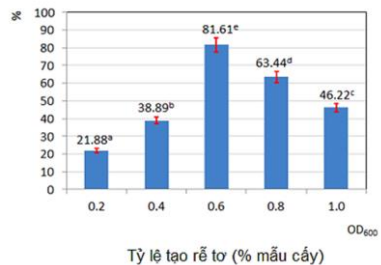
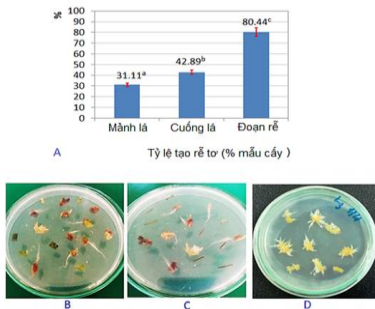
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và chất lượng cây Ô đầu giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần

Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chất lượng cây
Đất phù sa + trấu hun + xơ dừa, tỷ lệ 2: 1: 2.	93,56 ^c	+++

3.2.2. Nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây Ô đầu

Cảm ứng tạo rễ tơ in vitro ở cây Ô đầu

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 OD₆₀₀ = 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 μ mol/l.



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 (OD₆₀₀ = 0,6 và AS 100 μ mol/l) trong 15 phút và đồng nuôi cấy trong 3 ngày. 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.

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 OD₆₀₀ = 0,6 và AS 100 μ mol/l trong 15 phút, đồng nuôi cấy trong 3 ngày.

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 cho thấy 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 hoặc là vật liệu tái sinh từ mô sẹo.. 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%. 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. 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. rhizogens* 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. 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. rhizogens*. 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%. Đối với cây Thổ nhân sâm, rễ tơ được tạo từ mảnh lá lây nhiễm chủng *R. rhizogens* 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

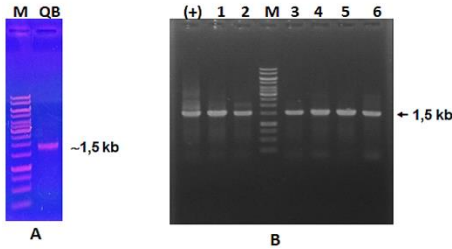
được của môi trường MS được bổ sung sucrose 6%, cao hơn khoảng 3 lần so với đối chứng. Một quy trình tối ưu hóa cho sự biến nạp qua trung gian *R. rhizogens* của đậu tương và khởi phát sự phát triển rễ tơ trong ống nghiệm từ lá mầm đã được mô tả bởi Chen và cs (2018). Sau 10-12 ngày bị nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy, rễ tơ được tạo ra trong môi trường nuôi cấy và 90-99 % mẫu cây 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. rhizogens* để tạo ra rễ tơ và sự phát triển tốt nhất của rễ tơ trên môi trường $\frac{1}{4}$ MS với sucrose 30 g/l. Gần đây, đã có nhiều nghiên cứu được công bố về kết quả của việc tạo ra rễ tơ từ các cây được 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. rhizogens*. Các đoạn rễ *in vitro* bị nhiễm *R. rhizogens* với $OD_{600} = 0,6$ 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 μ 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 được 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

Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR nhân 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). 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*.

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 1536 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. Kết quả phân tích BLAST đã khẳng định đoạn gen phân lập từ cây Ô đầu thu tại huyện Quỳnh Bạ, Hà Giang là gen *AcF3'5'H* mRNA của cây Ô đầu.



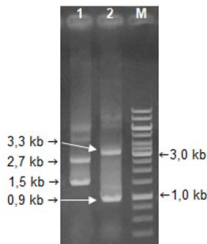
Hình 3.15. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose. A: Kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *AcF3'5'H* từ cDNA (M: Marker 1 kb; QB: Sản phẩm PCR nhân gen *AcF3'5'H* của cây Ô đầu thu tại Quận Ba, Hà Giang); B: sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *AcF3'5'H* từ 6 dòng khuẩn lạc màu trắng (M: Marker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

So với trình tự amino acid suy diễn từ gen *F3'5'H* mang mã số JN635708.1 trên GenBank, protein suy diễn từ đoạn mã hóa của gen *AcF3'5'H* phân lập từ cây Ô đầu Quận Ba, Hà Giang có sự sai khác ở 7 amino acid ở các vị trí 246, 280, 317, 325, 459, 481, 505

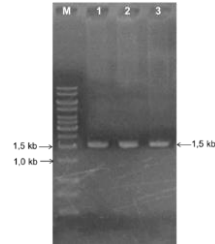
3.3.2. Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen *AcF3'5'H*

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

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). Trên hình 3.18, ở làn điện di số 1 có hai băng điện di 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 3.18 (làn điện di số 2) cho thấy có 2 băng DNA trong đó, phân đoạn 3,3 kb chính là đoạn *pRTRA7/3* mở vòng. 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*.



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*.



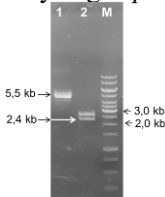
Hình 3.19. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *AcF3'5'H* từ các dòng khuẩn lạc *E. coli* DH5 α . M: Marker 1 kb; 1-3: Colony-PCR từ các dòng khuẩn lạc được biến nạp *pRTRA7/3_AcF3'5'H*

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

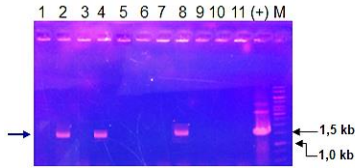
khuẩn lạc dương tính với colony-PCR được sử dụng để thu nhận cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* phức vụ tạo vector chuyển gen ở thực vật.

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

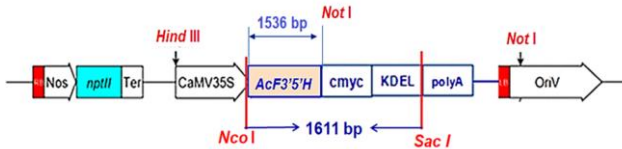
Sử dụng *Hind*III cắt vector *pRTRA7/3_AcF3'5'H* để thu nhận cấu trúc mang gen chuyển *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_KDEL_polyA* (2,4 kb) và vector chuyển gen mở vòng *pCB301* (5,5 kb) (Hình 3.20). Sử dụng T4 ligase để gắn cấu trúc *CaMV35S_AcF3'5'H_cmyc_KDEL_polyA* vào vector *pCB301* tạo vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*.



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



Hình 3.22. Điện di đồ sản phẩm colony-PCR nhận 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*.



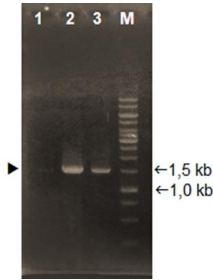
Hình 3.21. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen *pCB301_AcF3'5'H*. RB: Bờ phải; Nos: Tổng hợp nopalín; *nptII*: gen kháng kanamycin; *Ter*: terminator; *CaMV35S*: promoter *CaMV35S*; *AcF3'5'H*: gen Flavonoid 3'5'-hydroxylase (*AcF3'5'H*) phân lập từ cây Ô đầu; *cmyc*: trình tự nucleotide mã hoá peptid c-myc; *KDEL*: trình tự nucleotide mã hóa 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 *Hind*III, *Not*I, *Nco*I, *Sac*I được hiện thị trên sơ đồ.

Cặp môi *F3'5'H-NcoI-F3'5'H-SacI-R* được thiết kế cho PCR để nhận 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 *Sac*I (30 bp), cho nên đoạn DNA *AcF3'5'H_cmyc_KDEL* trong vector *pCB301_AcF3'5'H* có 1611 bp (Hình 3.21).

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.

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

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*.

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

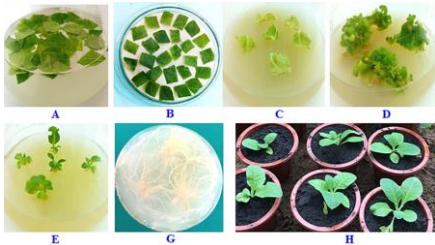
Sinh tổng hợp flavonoid là một con đường chuyển hóa thứ cấp quan trọng liên quan đến sự tham gia của nhiều enzyme, chẳng hạn như CHS, IFS, F3'H, F3'5'H, FLS và FST. Một số nghiên cứu về sự biểu hiện của các gen mã hóa các enzyme này làm tăng tích lũy flavonoid đã được thực hiện. Báo cáo của Hu và cs (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. 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. 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. Sự tăng hoạt động của F3'5'H cho phép tổng hợp anthocyanin và các loại flavonoid khác. 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 dược 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). 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 r*AcF3'5'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).



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 và lây nhiễm; B: Đồng nuôi cây 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.

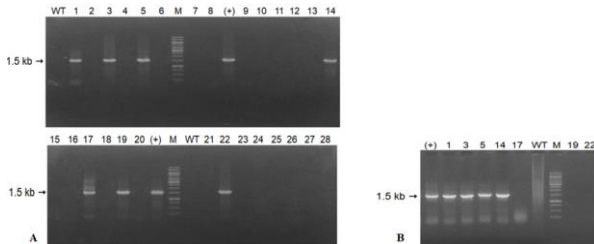
Bảng 3.8. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *AcF3'5'H* vào Thuốc lá

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
Tổng 3 lần thí nghiệm	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

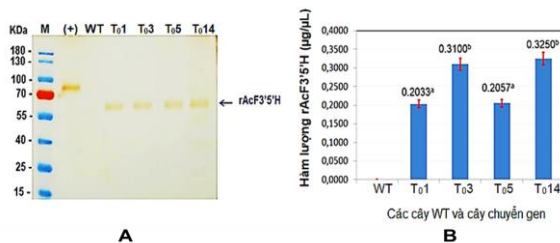
Kết quả thí nghiệm biến nạp trình bày ở bảng 3.8 cho thấy, sau 3 lần biến nạp ở lô thí nghiệm thu được 28 cây sống sót trong điều kiện nhà lưới.

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.

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 trọng lượng phân tử của protein rAcF3'5'H.



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.

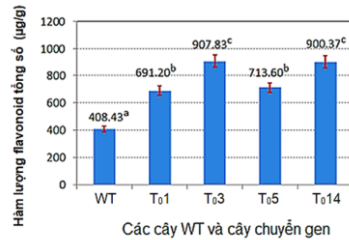
Kết quả phân tích hàm lượng protein rAcF3'5'H trong Hình 3.26 B cho thấy hàm lượng protein rAcF3'5'H của cây chuyển gen dao động từ 0,2033 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ đến 0,3250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($P < 0,001$). Do đó, khi bổ sung protein F3'5'H nội sinh, hàm lượng protein F3'5'H trong cây chuyển 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.

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



Hình 3.28. Hàm lượng favonoid tổng số ($\mu\text{g/g}$) 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.

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

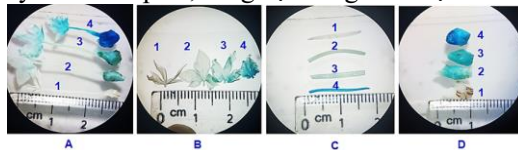
Các nghiên cứu về sự biểu hiện của gen *F3'5'H* có nguồn gốc từ các loài thực vật khác nhau hoặc phân tích biểu hiện quá mức gen chức năng đã được thực hiện. Theo hướng phân tích về sự biểu hiện quá mức của gen *F3'5'H*, Wu và cs (2020) cho thấy gen *GbF3'5'H1* có chức năng trong quá trình sinh tổng 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 galocatechin trong cây Bạch quả. Trong nghiên cứu của chúng tôi về cây Ô đầu, thân và lá của cây được xác định như một nguồn dược liệu mới. Lá và hoa của Ô đầu chứa carotenoid, sterol và flavonoid. 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. 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. 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. 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 $900,37 \pm 0,81$. 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). 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

Thí nghiệm được tiến hành với 90 mẫu được lấy nhiễm và lặp lại ba lần. 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. 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: $\text{OD}_{600} = 0,4$; 3: $\text{OD}_{600} = 0,6$; 4: $\text{OD}_{600} = 0,8$. (A) Cây Ô đầu biến nạp GUS; (B) Lá Ô đầu biến nạp GUS; (C) Các cuống lá Ô đầu biến nạp GUS; (D) thân cây Ô đầu biến nạp 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*_cmv vào cây Ô đầu

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 cây trên CCM. (C) Cầm 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.

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
Tổng 3 lần thí nghiệm	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 cây trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh. ĐC0: Mẫu không biến nạp cây trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh

Trên bảng 3.10, sau ba lần biến nạp, với 180 mẫu thu được 24 cây sống sót trong điều kiện nhà kính. Ở lô đối chứng ĐC0, 30 mẫu cây chồi Ô đầu không biến nạp thu được 10 cây sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà kính. Ở lô ĐC1, các chồi không tạo cụm chồi.

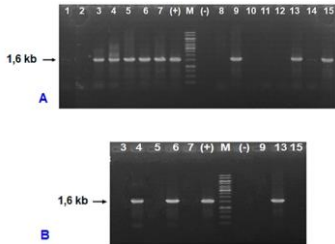
3.5.2.2. Phân tích biểu hiện của gen chuyển *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu chuyển gen T_0

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/F3'5'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 3.32 A).

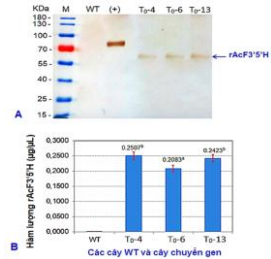
Tám cây T_0 được xác định là dương tính với PCR được tiếp tục phân tích bằng RT-PCR để xác nhận sự phiên mã của gen chuyển. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.32 B. Kết quả RT-PCR cho thấy chỉ 3 trong số 8 cây (T_0-4 , T_0-6 và T_0-13) có băng DNA với kích thước xấp xỉ 1,6 kb tương ứng với kích thước của *AcF3'5'H*.

Những cây T_0-4 , T_0-6 và T_0-13 , được sử dụng để phân tích sự biểu hiện của protein r*AcF3'5'H* bằng điện di SDS-PAGE và phương pháp Western blot. Trong hình 3.31A, cây T_0-4 , T_0-6 và T_0-13 đều có băng màu với kích thước > 55 kDa tương ứng với trọng lượng phân tử của protein r*AcF3'5'H*.

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 r*AcF3'5'H* từ ba cây chuyển gen bằng ELISA được thể hiện trong Hình 3.31B. Hàm lượng protein r*AcF3'5'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 3.32. Điện di để 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; (B): RT-PCR xác nhận sự phiên mã gen chuyển *AcF3'5'H* ở cây Ô đầu



Hình 3.33. Biểu hiện quá mức của protein r*AcF3'5'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 r*AcF3'5'H* ở cây Ô đầu chuyển gen. (B): So sánh hàm lượng protein r*AcF3'5'H* ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) trong cây Ô đầu chuyển gen T_0 .

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 thể hệ T_0 và cây WT không có sự khác biệt về hình thái. 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 $761,61 \pm 9,10$ ($\mu\text{g}/\text{g}$). Kết quả này cao hơn 139,13 đến 162,63% so với cây WT ($475,62 \pm 10,16$ $\mu\text{g}/\text{g}$). 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 thể hệ T_0 .

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. 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. Flavonoid được tìm thấy ở tất cả các bộ phận của thân, hoa, rễ và thân rễ, nhưng hàm lượng thấp. 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 *Agrobacterium 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. 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. 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. 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. rhizogens* 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 cấy 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 Thuộc lá và tạo được cây Thuộc 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 Thuộc 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 T_0 . 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 ở lá của các dòng chuyển gen T_0-4 , T_0-6 và T_0-13 từ 39,13% lên 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.