

## CẢM ỨNG TẠO RỄ TƠ CÂY BÁ BỆNH (*Eurycoma longifolia* JACK) THÔNG QUẢ VI KHUẨN *Agrobacterium rhizogenes* VÀ CHỌN DÒNG RỄ TỔNG HỢP EURYCOMANONE CAO

Phan Tường Lộc<sup>1\*</sup>, Đặng Thị Ngọc<sup>2</sup>, Nguyễn Huỳnh Cẩm Tú<sup>1</sup>, Hoàng Văn Dương<sup>1</sup>, Trần Thị Ngọc Hà<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup> Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Bá bệnh là cây thuốc quý được tìm thấy phổ biến ở Việt Nam và khu vực Đông Nam Á. Các bộ phận của cây đều có tác dụng dược lý, nhất là rễ, được dùng để bồi bổ cơ thể, điều trị nhiều loại bệnh, kể cả ung thư. Đặc biệt nhóm quassinoid với thành phần tiêu biểu eurycomanone được biết có khả năng thúc đẩy gia tăng lượng testosterone ở nam giới, giúp người suy giảm nội tiết này do tuổi tác hay nguyên nhân khác cải thiện được tâm sinh lý nói chung và sức khỏe tình dục nói riêng. Nghiên cứu tạo rễ tơ có khả năng sinh trưởng mạnh và tổng hợp eurycomanone cao nhằm tạo ra nguồn vật liệu *in vitro* có chất lượng ổn định, bổ sung cho nguồn vật liệu tự nhiên đang suy giảm. Trong nghiên cứu này hạt được khử trùng với cồn 70% trong 1 phút và dung dịch 60% Javel (6% NaClO) trong 15 phút cho tỉ lệ hạt sạch nhiễm 100%, nảy mầm 80,3%, cây sinh trưởng đồng đều thích hợp dùng làm vật liệu thí nghiệm. Chuyển gen tạo rễ tơ vào mô lá *in vitro* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 43057 với mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị OD<sub>600nm</sub> = 0,8, nồng độ acetosiryngone bổ sung 100 µM, thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày cho tỉ lệ trung bình mẫu tạo rễ cao nhất là 36,51%, số rễ trung bình/mẫu là 1,63 trên môi trường ½ MS với 3% sucrose. Hai dòng rễ tơ R1, R2 chọn lọc được có khả năng tăng trưởng mạnh, với mức nhân sinh khối trong 2 tuần lần lượt là 16; 15,5 (g/g, khối lượng tươi) trên môi trường SH lỏng với 3% sucrose, hàm lượng eurycomanone phân tích được theo khối lượng khô là 0,017; 0,022 (mg/g). Các dòng rễ này có nhiều tiềm năng để được tiếp tục nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho việc sản xuất sinh khối sử dụng hoạt chất.

*Từ khóa:* *Agrobacterium rhizogenes*, bá bệnh, *Eurycoma longifolia* Jack, eurycomanone, rễ tơ, testosterone, Tongkat ali.

### MỞ ĐẦU

Bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) hay còn gọi là mật nhân, được tìm thấy phổ biến ở Việt Nam và các nước trong khu vực như Indonesia, Malaysia, Campuchia, Miến Điện, Thái Lan và Việt Nam. Đây là cây thuốc quý, các bộ phận đều có tác dụng dược lý, tuy nhiên rễ được xem là có giá trị cao nhất. Nhiều bài thuốc cổ truyền đã dùng cao chiết từ rễ để chữa các bệnh như sốt dai dẳng, sốt rét, đau nhức, kiết lỵ, phục hồi năng lượng và sức sống, tăng cường lưu lượng máu, chống ung thư (Bhat *et al.*, 2010). Đặc biệt, một công dụng phổ biến của bá bệnh được nhiều sự quan tâm là thúc đẩy cơ thể tăng tạo testosterone ở nam giới, do từ thành phần quassinoid, tiêu biểu là eurycomanone trong cây (Nhan *et al.*, 2017; Rehman *et al.*, 2016). Hiện nay, trên thị trường có hơn 200 sản phẩm thương mại với thành phần chính chiết xuất từ rễ bá bệnh giúp cải thiện khả năng sinh lý và sức khỏe tình dục cho nam giới trong quá trình mãn dục hoặc thiếu hụt nội tiết vì những nguyên nhân khác, như Alipas platinum, Boost ultimate, Tongkat Ali powder, cũng như các sản phẩm trà, cà phê, đồ uống có ga khác.

Để khai thác làm dược liệu, bá bệnh thường phải có độ tuổi từ 5 năm trở lên, cây càng lâu năm càng có giá trị do tích lũy hoạt chất nhiều hơn. Cây được thu hoạch thủ công bằng cách nhổ cả rễ và lấy tất cả các bộ phận (Hassan *et al.*, 2015). Do nhu cầu lớn và giá trị kinh tế cao, thời gian qua bá bệnh trong tự nhiên đã bị khai thác nhiều đến mức cạn kiệt, trong khi cây vốn sinh trưởng khá chậm, dẫn đến phát sinh những bất ổn về nguồn nguyên liệu, chất lượng, giá cả lại tăng mạnh trên thị trường.

Để bổ sung nguồn cung, bên cạnh biện pháp trồng mới theo cách truyền thống, tạo rễ tơ *in vitro* thông qua cảm ứng với *A. rhizogenes* và nhân sinh khối là hướng sản xuất công nghệ sinh học đang được quan tâm bởi tính khả thi, quy mô linh hoạt và có thể kiểm soát tốt các chỉ tiêu trong quá trình nuôi cấy (Zhou *et al.*, 2011).

Theo các nghiên cứu, rễ tơ thường có tiềm năng tổng hợp các hợp chất thứ cấp không chỉ ở rễ mà còn từ các bộ phận khác của cây với hàm lượng có thể cao hơn cây tự nhiên. Tuy nhiên, đặc điểm các dòng rễ tơ thu được tùy thuộc vào chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* và sự biến nạp gen trên từng sự kiện cụ thể. Do đó, để có được dòng rễ ưu việt theo mục tiêu đặt ra, việc xây dựng các điều kiện cảm ứng chuyển gen thích hợp để có thể tạo ra số lượng dòng rễ lớn và chọn lọc là bước đầu nghiên cứu quan trọng cần thực hiện (Danphitsanuparn *et al.*, 2012; Ngọc *et al.*, 2012; Bansal *et al.*, 2014).

## VẬT LIỆU PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Cây bá bệnh 6 năm tuổi có nguồn gốc từ Vườn quốc gia Bái Tử Long được trồng trong nhà màng tại Viện Sinh học nhiệt đới.

Chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 43057 (ATCC, Mỹ). Eurycomanone tinh khiết 95% dùng cho HPLC (ASB-00005393-005, Chromadex, Mỹ).

Môi trường nuôi thực vật: môi trường MS, môi trường ½ MS (có hàm lượng khoáng giảm ½ so với môi trường MS), môi trường SH. Các môi trường đều có 3% sucrose, pH 5,8. Môi trường rắn có bổ sung 9 g agar/l (Tú et al., 2017).

Môi trường nuôi vi khuẩn: môi trường Nutrient broth (NB) (Thermofisher, Mỹ).

### Phương pháp

#### **Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Javel đến khả năng khử trùng và nảy mầm của hạt nhằm tạo nguồn vật liệu *in vitro***

Quả bá bệnh chín màu đỏ thẫm được sử dụng làm nguồn vật liệu vô mẫu *in vitro*. Quả được rửa với nước xà phòng và tráng lại bằng nước máy nhiều lần, sau đó được khử trùng bằng cách ngâm lần lượt trong cồn 70% (1 phút), dung dịch Javel (6% NaClO) được pha loãng ở các nồng độ 40%, 60%, 80% trong thời gian 15 phút, trong tủ cấy vô trùng. Tiếp theo, quả được rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng, loại bỏ các phần mô mềm, hạt được tách lớp vỏ cứng, màng bọc và cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l GA<sub>3</sub>. Các nghiệm thức được bố trí đơn yếu tố, hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần, mỗi lần gồm 10 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ hạt không nhiễm và tỷ lệ hạt nảy mầm phát triển thành cây *in vitro*.

#### **Khảo sát một số điều kiện thích hợp cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá cây bá bệnh *in vitro* thông qua *A. rhizogenes***

Vi khuẩn *A. rhizogenes* được cấy từ một khuẩn lạc vào 50 mL môi trường NB lỏng, lắc 180 vòng/phút ở 25°C trong tối, trong 42 - 48 giờ. Ly tâm thu sinh khối, rồi hòa lại trong môi trường ½ MS để đạt mật độ cần thiết. Sau đó, bổ sung thêm acetosyringone và tiếp tục nuôi ở điều kiện như trên khoảng 30 phút trước khi thực hiện gây nhiễm mô lá.

Lá cây bá bệnh *in vitro*, từ thí nghiệm trên, được sử dụng làm vật liệu cảm ứng tạo rễ tơ và được tạo vết thương để tăng hiệu quả bằng cách cắt thẳng góc với gân chính bỏ phần chóp lá và phần tiếp giáp cuống lá khoảng 1 mm. Các mẫu này sẽ được ngâm trong dung dịch vi khuẩn đã chuẩn bị trong 20 phút, sau đó được thấm khô dịch và cấy lên môi trường ½ MS rắn bổ sung acetosyringone cùng nồng độ với dịch vi khuẩn để đồng nuôi cấy. Tiếp theo, mẫu được rửa để loại bỏ vi khuẩn bằng dung dịch gồm 2 loại kháng sinh augmentin 150 µM và cefotaxime 250 µM và cấy sang môi trường ½ MS rắn bổ sung kháng sinh như trên để hình thành rễ tơ. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ 25°C, chiếu sáng 12 giờ/ngày bằng đèn huỳnh quang ở cường độ 1500 lux.

Khảo sát ảnh hưởng của acetosyringon ở các nồng độ 0, 100, 200 (µM), mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị OD<sub>600nm</sub> = 0,6, thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày.

Khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn trong dịch gây nhiễm tương ứng với giá trị OD<sub>600nm</sub> = 0,4; 0,6; 0,8; acetosyringone tối ưu từ thí nghiệm trước, thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy 2, 3, 4 ngày, mật độ vi khuẩn trong dịch gây nhiễm và acetosyringone tối ưu từ 2 thí nghiệm trước.

Các nghiệm thức được bố trí đơn yếu tố, hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần, mỗi lần gồm 21 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi: số lượng mẫu hình thành rễ, số rễ/mẫu.

#### **Chọn lọc dòng rễ tăng trưởng nhanh trong môi trường rắn và môi trường lỏng**

Các dòng rễ hình thành sau khi mẫu được gây nhiễm có khả năng tăng trưởng mạnh sẽ được tách nuôi độc lập để theo dõi mức độ tăng trưởng.

Trên môi trường rắn: các sợi rễ được cắt thành các đoạn 3 cm và nuôi trên môi trường ½ MS. Trên môi trường lỏng: tách 0,2 g rễ từ môi trường rắn cho vào bình tam giác có chứa 50 mL môi trường SH, nuôi lắc 100 vòng/phút. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ 25°C, chiếu sáng 12 giờ/ngày bằng đèn huỳnh quang ở cường độ 1500 lux. Chỉ tiêu theo dõi: độ dài rễ, mức độ phân nhánh, mức tăng trưởng (Mức tăng trưởng = khối lượng mẫu sau khi nuôi/khối lượng mẫu cho vào).

### Kiểm tra rẽ tơ chuyển gen bằng PCR

Bộ gen rẽ tơ và plasmid chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* được ly trích để làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR bằng các bộ kit plant genomic DNA purification và plasmid DNA purification (Thermofisher, Mỹ). Phản ứng PCR được thực hiện để kiểm tra sự hiện diện của các gen như sau:

Gen *rolB*: Mồi xuôi *rolB*(F): 5'-GAAGCCTGCTGCAGTAAACC-3', mồi ngược *rolB*(R): 5'- TTCAGCAGCAGGATCAACAC-3'. Chu kỳ và chương trình nhiệt của phản ứng: 96°C trong 2 phút, 36 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút), 72°C trong 15 phút. Nhiệt độ bảo quản: 4°C. Kích thước đoạn DNA nhân bản là 205 bp (Varghese *et al.*, 2014).

Gen *virC*: Mồi xuôi *virC*(F): 5'-ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA-3' và mồi ngược *virC*(R): 5'-GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA-3'. Chu kỳ và chương trình nhiệt: 95°C trong 2 phút, 25 chu kỳ (95°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút), 72°C trong 10 phút. Nhiệt độ bảo quản: 4°C. Kích thước đoạn DNA nhân bản là 730 bp (Sawada *et al.*, 1995).

### Ly trích, phân tích hàm lượng eurycomanone trong rẽ tơ

Eurycomanone được ly trích và xác định hàm lượng theo phương pháp của Chan và đồng tác giả (2009). Phân tách mẫu bằng hệ thống HPLC Shimadzu (Nhật Bản) đầu dò UV/Vis, cột pha tĩnh C18 (25x4,6 mm, 5 µm), hệ dung môi pha động acetonitrile-nước (15:85), thể tích tiêm mẫu 20 µl, phân tích ở bước sóng 238 nm. Kết quả được phân tích bởi Trung tâm sẫm và dược liệu TPHCM.

### KẾT QUẢ THẢO LUẬN

#### Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Javel đến khả năng khử trùng và nảy mầm của hạt nhằm tạo nguồn vật liệu *in vitro*

Hạt sau khi khử trùng được cấy trên môi trường, ở hai nghiệm thức sử dụng nồng độ Javel 40%, 60%, hạt bắt đầu nảy mầm vào ngày thứ 6, cây con sinh trưởng tương đối đồng đều. Trong khi ở nồng độ cao hơn, thời gian bắt đầu nảy mầm chậm hơn 1 - 3 ngày, cây sinh trưởng chậm và không đồng đều. Ở tuần thứ 5, các cây ở nghiệm thức 1 và 2 đã phát triển được hai lá kép trưởng thành với khoảng 8 lá chét đối xứng nhau (Hình 1a), trong khi ở nghiệm thức 3, một số cây hai lá kép vẫn chưa tách khỏi thân. Nghiệm thức 1 có tỉ lệ nảy mầm cao nhất, nhưng tỉ lệ mẫu sạch vi sinh vật khá thấp (55,6%). Nghiệm thức 2 có tỉ lệ không nhiễm 100% và tỉ lệ nảy mầm 80,3% không có sự khác biệt về thống kê so với nghiệm thức 3 là 79% (Bảng 1), tuy nhiên lượng Javel sử dụng hiệu quả và mẫu ổn định hơn. Do đó, nghiệm thức 2 với nồng độ Javel 60% sẽ được chọn để khử trùng hạt. Các lá chét trưởng thành của cây ở tuần thứ 5 - 6 sẽ được dùng làm vật liệu chuyển gen.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ Javel đến khả năng khử trùng và nảy mầm của hạt**

Nghiệm thức	Tỉ lệ Javel (% v/v)	Tỷ lệ hạt không nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)
1	40	55,6 <sup>b</sup>	98,8 <sup>a</sup>
2	60	100 <sup>a</sup>	80,3 <sup>b</sup>
3	80	100 <sup>a</sup>	79,0 <sup>b</sup>

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ( $P \leq 0,05$ ).

#### Khảo sát một số điều kiện thích hợp cảm ứng tạo rẽ tơ từ mô lá cây bá bệnh *in vitro* thông qua *A. rhizogenes*

Acetosyringone được biết là hợp chất phenol phổ biến dùng cảm ứng biến nạp T-DNA. Nhiều công trình ghi nhận ảnh hưởng của acetosyringone làm gia tăng sự tạo rẽ tơ, tuy nhiên, ở nồng độ cao nó có thể trở nên độc và gây tác dụng ngược lại. Do đó, nồng độ acetosyringone phải được tối ưu theo từng điều kiện nhất định.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ acetosyringone đến sự hình thành rẽ (mật độ vi khuẩn tương ứng giá trị OD<sub>600nm</sub> = 0,6; đồng nuôi cấy 3 ngày)**

Nồng độ acetosyringone (µM)	0	100	200
Tỉ lệ mẫu tạo rẽ (%)	7,94 <sup>b</sup>	22,22 <sup>a</sup>	17,46 <sup>a</sup>
Số rẽ trung bình/mẫu	0,73 <sup>c</sup>	1,35 <sup>a</sup>	0,98 <sup>b</sup>

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ( $P \leq 0,05$ ).

Theo bảng 2, nồng độ acetosyringone 100 µM trong thí nghiệm cho tỉ lệ mẫu tạo rẽ cũng như số rẽ trung bình/mẫu cao nhất. Kết quả này cũng tương tự với một nghiên cứu của Danphitsanuparn và đồng tác giả (2012), khi cảm ứng tạo rẽ tơ ở *Pueraria candollei* Grah. ex Benth. var. *candollei*. Theo đó, acetosyringone ở nồng độ

100  $\mu\text{M}$  cho tỉ lệ mẫu tạo rễ tơ cao nhất 58,33% trên mô lá với chủng ATCC 43057 và 50% trên lá mầm với chủng ATCC 15834, trong khi ở nồng độ 200  $\mu\text{M}$ , không có mẫu nào tạo rễ tơ với cả hai loại vi khuẩn.

Bên cạnh đó, mật độ vi khuẩn gây nhiễm và thời gian đồng nuôi cấy là những yếu tố điều chỉnh mức độ tương tác giữa vi khuẩn và mẫu mô. Khi mô tiếp xúc với vi khuẩn ở mật độ thấp, tỉ lệ biến nạp gen giảm, nhưng nếu mật độ vi khuẩn quá cao, các hợp chất có tính độc từ vi khuẩn sẽ gây tổn thương mô, ảnh hưởng xấu đến sự cảm ứng tạo rễ tơ, đồng thời cũng gây ra tình trạng khó diệt khuẩn, dễ tái nhiễm ở giai đoạn nuôi rễ.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn gây nhiễm đến sự hình thành rễ (bổ sung acetosyringone 100  $\mu\text{M}$ , đồng nuôi cấy 3 ngày)**

Mật độ vi khuẩn (OD <sub>600nm</sub> )	0,4	0,6	0,8
Tỉ lệ mẫu tạo rễ (%)	12,70 <sup>c</sup>	23,81 <sup>b</sup>	34,92 <sup>a</sup>
Số rễ trung bình/mẫu	1,03 <sup>b</sup>	1,37 <sup>a</sup>	1,57 <sup>a</sup>

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ( $P \leq 0,05$ ).

**Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến sự hình thành rễ (mật độ vi khuẩn tương ứng giá trị OD<sub>600nm</sub> = 0,8; nồng độ acetosyringone 100  $\mu\text{M}$ )**

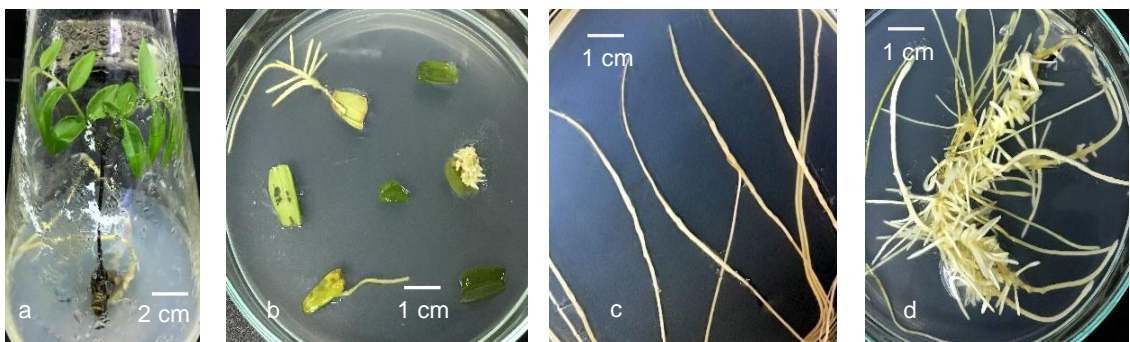
Thời gian đồng nuôi cấy (ngày)	2	3	4
Tỉ lệ mẫu tạo rễ (%)	14,29 <sup>c</sup>	36,51 <sup>a</sup>	26,98 <sup>b</sup>
Số rễ trung bình/mẫu	0,94 <sup>c</sup>	1,63 <sup>a</sup>	1,24 <sup>b</sup>

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ( $P \leq 0,05$ ).

Kết quả khảo sát cho thấy mật độ vi khuẩn gây nhiễm tương ứng giá trị OD<sub>600nm</sub> = 0,8 (Bảng 3) và thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày (Bảng 4) cho tỉ lệ tạo rễ cao nhất. Tối ưu cả ba yếu tố, tỉ lệ mẫu hình thành rễ ghi nhận được là 36,51%, số rễ trung bình/mẫu là 1,62 (Bảng 4). Trước đó, một thí nghiệm kiểm tra sự hình thành rễ từ mẫu lá bá bệnh ở điều kiện tương tự, không bổ sung acetosyringone và không qua xử lý gây nhiễm với vi khuẩn, trên môi trường 1/2 MS đã được thực hiện (Số liệu không được trình bày ở đây), cho kết quả hoàn toàn âm tính.

Kết quả này có sự khác biệt so với báo cáo của Bansal và đồng tác giả (2014), khi mật độ vi khuẩn gây nhiễm tương ứng giá trị OD<sub>600nm</sub> và thời gian đồng nuôi cấy tối ưu ghi nhận được lần lượt là 0,6 và 2. Điều này có thể do sự khác nhau bởi chủng vi khuẩn dùng để biến nạp cũng như đặc điểm riêng biệt của từng loại mô lá.

Như vậy, kết quả trên cho thấy sự cảm ứng tạo rễ ở bá bệnh khá nhạy cảm với nồng độ acetosyringone, thời gian, mức độ xâm nhiễm của vi khuẩn. Đặc điểm các sợi rễ hình thành biến thiên khá lớn ở các điều kiện cụ thể khác nhau.



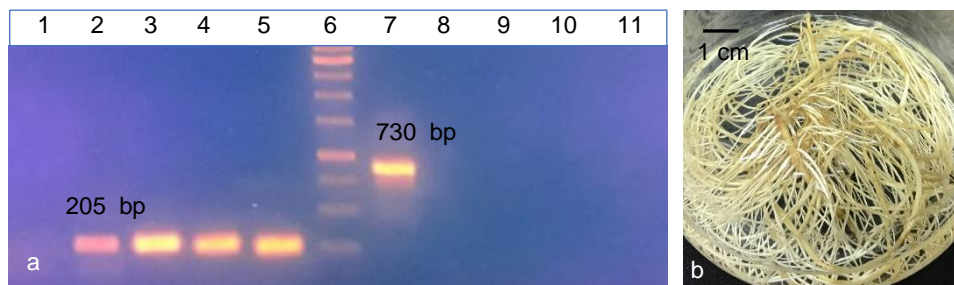
**Hình 1. Sự hình thành rễ sau khi gây nhiễm mô lá bá bệnh in vitro với chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 43057**

- a. Cây in vitro sau 5 tuần nảy mầm từ hạt được dùng làm vật liệu chuyển gen,
- b. Mô đã được gây nhiễm hình thành rễ, c, d. dòng rễ phân nhánh ít, phân nhánh nhiều.

Nhìn chung, ở tất cả các thí nghiệm, sau khi được cấy sang môi trường 1/2 MS có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn, mẫu bắt đầu hình thành rễ trong thời gian khoảng từ ngày 12 đến ngày 45. Các sợi rễ có màu vàng nhạt, bề mặt nhẵn. Số lượng rễ hình thành, sự kéo dài, phân nhánh giữa các dòng rễ ở các mẫu có sự khác biệt rõ rệt (Hình 1b). Phần lớn rễ ít phân nhánh hoặc không phân nhánh, kéo dài chậm hoặc dừng lại sau khi đạt kích thước 2 - 4 cm, chỉ một số dòng rễ có khả năng tăng trưởng mạnh, kéo dài và phân nhánh liên tục.

### Kiểm tra rễ tơ chuyển gen bằng PCR

Các sợi rễ khởi phát từ những vị trí khác nhau trên mô lá được xem là các dòng độc lập và được tách nuôi riêng trên môi trường ½ MS rắn (Hình 1c, 1d). Ba dòng rễ kéo dài và phân nhánh tốt nhất được chọn để kiểm tra sự hiện diện của gen *rolB* và gel *virC* bằng PCR. Kết quả cho thấy cả 3 dòng rễ đều có sự hiện diện của gen *rolB* thông qua băng khuếch đại DNA tương ứng ở vị trí 205 bp và không có sự hiện diện của gen *virC*, do không có các băng khuếch đại tương ứng ở vị trí 730 bp. Gen *virC* ở *A.rhizogenes* không nằm trên T-DNA chuyển vào thực vật, do đó, khi mẫu âm tính chứng tỏ đã sạch vi khuẩn (Hình 2a). Như vậy, có thể kết luận 3 dòng rễ R1, R2, R3 là các dòng rễ tơ.



**Hình 2. Rễ chuyển gen được xác định bằng PCR (a) và nuôi trong môi trường lòng lác (b)**

1, 2, 3, 4, 5: vị trí các giếng đối chứng âm, đối chứng dương (*gen rolB*) và mẫu các dòng rễ R1, R2, R3; 7,8,9,10: vị trí các giếng đối chứng dương (*gen virC*), đối chứng âm, và mẫu các dòng rễ R1, R2, R3.

### Chọn lọc dòng rễ tơ tăng trưởng nhanh và phân tích hàm lượng eurycomanone trong rễ

Khi nuôi trong môi trường SH lòng, cả 3 dòng rễ tơ R1, R2, R3 tăng trưởng tốt, sợi rễ kéo dài đồng thời phân nhánh liên tục, có màu vàng nhạt, sáng, trơn nhẵn (Hình 2b). Mức tăng trưởng của 3 dòng rễ được ghi nhận ở bảng 5.

**Bảng 5. Mức tăng trưởng của các dòng rễ tơ trong môi trường lòng**

Mẫu rễ tơ	R1	R2	R3
Khối lượng mẫu cấy ban đầu (g)	0,2	0,2	0,2
Khối lượng mẫu sau 2 tuần (g)	3,2	3,1	2,7
Mức tăng trưởng	16	15,5	13,5

Bước đầu phân tích eurycomanone trong rễ bằng HPLC cho thấy hàm lượng ở các dòng R1, R2, R3 lần lượt là 0,017; 0,022 và phát hiện vết (mg/g), trong khi ở rễ cọc cây bá bệnh 6 năm tuổi trồng tại nhà màng là 1,08 mg/g.

Cũng theo các nghiên cứu (Bansal *et al.*, 2014; Danphitsanuparn *et al.*, 2012), những dòng rễ tơ tạo ra từ các sự kiện chuyển gen khác nhau có thể có các đặc điểm tăng trưởng và tích lũy hoạt chất khác nhau do ảnh hưởng của vị trí tích hợp T-DNA vi khuẩn vào bộ gen thực vật. Do đó, việc chọn lọc dòng rễ theo các mục tiêu đặt ra rất quan trọng. Ba dòng rễ R1, R2, R3 đều có khả năng sinh trưởng cao, tuy nhiên dòng rễ R3 có sự tích lũy eurycomanone rất thấp. Hai dòng rễ R1, R2 tăng trưởng mạnh và tích lũy hoạt chất cao có tiềm năng làm nguyên liệu để nhân sinh khối sử dụng hoạt chất eurycomanone.

### KẾT LUẬN

Khử trùng hạt với cồn 70% trong 1 phút và dung dịch 60% Javel (NaClO 6%) trong 15 phút cho tỉ lệ hạt sạch nhiễm 100%, nảy mầm 80,3%, cây *in vitro* sinh trưởng đồng đều.

Cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* với nồng độ acetosyringone bổ sung 100 µM, mật độ vi khuẩn tương ứng giá trị ở OD<sub>600nm</sub> = 0,8, thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày cho tỉ lệ trung bình mẫu tạo rễ cao nhất là 36,51%, số rễ trung bình 1,63/mẫu.

Chọn lọc được 2 dòng rễ tơ R1, R2 có khả năng tăng trưởng mạnh, với hệ số nhân sinh khối trong 2 tuần lần lượt là 16; 15,5; tổng hợp hàm lượng eurycomanone cao tương ứng là 0,017; 0,022 mg/g.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện nhờ kinh phí đề tài Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh “Nghiên cứu nhân sinh khối rễ tơ cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) bằng bioreactor hướng đến sản xuất quy mô lớn”.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bhat R, Karim AA (2010). Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): A review on its ethnobotany and pharmacological importance. *Fitoterapia* 81(7): 669-679.
- Chan KL, Low BS, Teh CH, Das PK (2009). The effect of *Eurycoma longifolia* on sperm quality of male rats. *Nat Prod Commun* 4(10): 1934578X0900401004.
- Danphitsanuparn P, Boonsongcheep P, Boriboonkaset T, Chintapakorn Y, Prathanturug S (2012). Effects of *Agrobacterium rhizogenes* strains and other parameters on production of isoflavonoids in hairy roots of *Pueraria candollei* Grah. ex Benth. var. *candollei*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 111(3): 315-322.
- Hassan NH, Abdullah R, Kiong LS, Ahmad AR, Abdullah N, Zainudin F, Rahman SA (2012). Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets. *Afr J Biotechnol* 11(26): 6818-6825.
- Nguyễn Huỳnh Cẩm Tú, Nguyễn Đức Trung, Lê Tấn Đức, Hoàng Văn Dương, Phan Tường Lộc (2017). Nghiên cứu công nghệ nhân sinh khối rễ tơ đỉnh lã lá nhỏ *Polyscias fruticosa* L. HARMS và khảo sát cảm ứng tạo saponin. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15(3A): 245-254.
- Nhan NH, & Loc NH (2017). Production of eurycomanone from cell suspension culture of *Eurycoma longifolia*. *Pharm Biol* 55(1): 2234-2239.
- 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* 50: 166-173.
- Rehman SU, Choe K, Yoo HH (2016). Review on a traditional herbal medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its traditional uses, chemistry, evidence-based pharmacology and toxicology. *Molecules* 21(3): 331.
- Sawada H, Ieki H, Matsuda I (1995). PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environ Microbiol* 61(2): 828-831.
- Varghese S, Keshavachandran R, Baby B, Nazeem PA (2014). Genetic transformation in ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal) for hairy root induction and enhancement of secondary metabolites. *J Trop Agric* 52(1): 47-53.
- Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM (2011). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(4): 1229-1239.

## HAIRY ROOT INDUCTION BY *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated TRANSFORMATION IN *Eurycoma longifolia* JACK AND SELECTION FOR HIGH EURYCOMANONE SYNTHESIZING ROOT LINES

Phan Tuong Loc<sup>1</sup>, Dang Thi Ngoc<sup>2</sup>, Nguyen Huynh Cam Tu<sup>1</sup>, Hoang Van Duong<sup>1</sup>, Tran Thi Ngoc Ha<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Tropical Biology - Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup> Nong Lam University - Ho Chi Minh City

### SUMMARY

*Eurycoma longifolia* Jack is a precious medicinal plant commonly found in Vietnam and other Southeast Asian countries. All parts of the plant have pharmacological effects, remarkably roots, which are used to improve the body's condition and treat many diseases, including cancer. Especially, the quassinoid group with the typical substance eurycomanone is known capable of enhancing testosterone level in men, helping people with this hormone decline due to age or other causes to improve both physical and psychological well-being as well as sexual health in particular. Research on creating hairy roots with accelerated growth and high synthesis of eurycomanone in order to produce a stable source of *in vitro* materials supplementing the declining natural resources which have been exploited exhausted. In this study, seeds were sterilized sequentially with 70% alcohol for 1 minute and 40% Javel solution (6% NaOCl) for 15 minutes to reach 100% of disinfection and 80.3% of germination, evenly grown plants are suitable for use as experimental materials. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation in leaf explants showed a highest average of 36,51% of the rooting explants and an average of 1.63 roots/explant, when carried with the bacterial density at OD<sub>600nm</sub> = 0.8, the additional acetosyringone concentration of 100 μM and 3 days co-cultivation on ½ MS medium with 3% sucrose. Two elite hairy root lines R1, R2, were selected that the biomass growth rate of 2 weeks are 16, 15.5 (g/g, fresh weight) SH medium with 3% sucrose, eurycomanone content are 0.017, 0.022 (mg/g, dry weight) respectively. These roots have great potential for further study of cultures in order to produce biomass for active substances.

**Keywords:** *Agrobacterium rhizogenes*, ba bệnh tree, *Eurycoma longifolia* Jack, eurycomanone, hairy root, testosterone, Tongkat ali.

\* Author for correspondence: Tel: +84-28-38978796; Email: locphan@itb.ac.vn/lptvn@yahoo.com