

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**TRẦN THỊ LOAN**

**NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP HỆ THỐNG CẢM ỨNG  
VÀ CHUYỂN GEN VÀO RỄ TƠ CÂY ĐẬU XANH  
(*VIGNA RADIATA* (L.) WILCZEK)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**Mã số: 8420114**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. ĐỖ TIỀN PHÁT
2. TS. NGUYỄN XUÂN CƯỜNG

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to one of the supervisors, is written over the list of names.

*Hà Nội - Năm 2024*

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các số liệu, kết luận nghiên cứu được trình bày trong luận văn là hoàn toàn khách quan, trung thực và chưa từng được công bố trong bất kì công trình nào khác, ngoài một số kết quả mà nhóm nghiên cứu chúng tôi đã công bố. Những thông tin được trích dẫn trong tài liệu tham khảo đã được nêu rõ nguồn gốc, nếu có sự không trung thực trong các số liệu và kết quả nghiên cứu của luận văn này thì tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm.

*Hà Nội, ngày 27 tháng 5 năm 2024*

**Học viên thực hiện**



**TRẦN THỊ LOAN**

## LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận văn, em đã nhận được sự quan tâm, giúp đỡ của các thầy giáo hướng dẫn, các cơ quan đoàn thể, bạn bè đồng nghiệp và gia đình. Với lòng biết ơn sâu sắc, em xin được gửi lời cảm ơn đến:

- Hai thầy giáo hướng dẫn khoa học là *TS. Đỗ Tiến Phát* và *TS. Nguyễn Xuân Cường* đã luôn tận tâm giúp đỡ chỉ bảo và truyền dạy kiến thức, kỹ năng nghiên cứu khoa học cũng như tạo mọi điều kiện tốt nhất cho em trong quá trình thực hiện đề tài.

- Ban Lãnh đạo Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài.

- Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ cùng các thầy cô giáo khoa Công Nghệ Sinh Học - Học viện Khoa học Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã quan tâm, giúp đỡ trong suốt quá trình em học tập và làm đề tài.

- Sự hướng dẫn tận tình của *ThS. Bùi Phương Thảo* cùng tất cả các cán bộ nghiên cứu của phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã quan tâm giúp đỡ, và tạo điều kiện thuận lợi cho em trong quá trình học tập và thực hiện đề tài.

- Hội đồng bảo vệ các cấp đã nhiệt tình đóng góp ý kiến để em hoàn thiện luận văn.

- Ban Lãnh đạo trường THPT Chuyên Lào Cai nơi em đang công tác và các đồng nghiệp trong nhà trường, trong tổ chuyên môn đã luôn động viên, tạo điều kiện thuận lợi để em có thể hoàn thành tốt khoá học.

- Đặc biệt, em xin được tri ân sâu sắc đến gia đình và bạn bè đã luôn bên cạnh, khích lệ, động viên để em có thể an tâm hoàn thành luận văn.

**Học viên thực hiện**



**TRẦN THỊ LOAN**

## MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT .....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ .....	viii
MỞ ĐẦU .....	1
1. Lí do chọn đề tài .....	1
2. Mục đích nghiên cứu .....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài .....	3
5. Những đóng góp của luận văn .....	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN .....	4
1.1. Cây đậu xanh .....	4
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại đậu xanh .....	4
1.1.2. Đặc điểm thực vật học cây đậu xanh .....	4
1.1.3. Tầm quan trọng của cây đậu xanh .....	6
1.1.4. Tình hình sản xuất cây đậu xanh trên thế giới và ở Việt Nam .....	6
1.2. Vi khuẩn <i>Rhizobium rhizogones</i> .....	7
1.2.1. Phân loại .....	7
1.2.2. Giới thiệu về <i>Agrobacterium rhizogones</i> .....	8
1.2.3. Giới thiệu về cơ chế tạo rễ tơ và hệ thống nuôi cấy rễ tơ thực vật ...	10
1.2.4. Phương pháp chuyển gen tạo rễ tơ .....	13
1.2.5. Ứng dụng và các thành tựu của hệ thống nuôi cấy rễ tơ thực vật .....	13
1.2.6. Nghiên cứu tạo rễ tơ trên cây họ đậu .....	15
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	17
2.1. Vật liệu nghiên cứu .....	17
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	17

2.2.1. Chuẩn bị vật liệu cho biến nạp .....	17
2.2.2. Phương pháp chuyển gen .....	18
2.2.3. Đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ tơ .....	19
2.2.4. Kiểm tra sự có mặt và hoạt động của gen chỉ thị ở các dòng rễ tơ chuyển gen .....	19
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu .....	20
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen thông qua rễ tơ in vitro trên cây đậu xanh .....</b>	<b>21</b>
3.1.1. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và giống đậu xanh đến khả năng cảm ứng tạo mô sẹo sau lây nhiễm khuẩn .....	21
3.1.2. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và giống đậu xanh đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ cây đậu xanh .....	22
3.1.3. Hiệu quả chuyển gen và hoạt động của cấu trúc chuyển gen trên rễ tơ in vitro cây đậu xanh .....	24
<b>3.2. Thiết lập hệ thống cảm ứng tạo tạo rễ tơ và chuyển gen thông qua rễ tơ in vivo trên cây đậu xanh .....</b>	<b>27</b>
3.2.1. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ in vivo của cây đậu xanh .....	27
3.2.2. Đánh giá khả năng cảm ứng rễ tơ in vivo của các giống đậu xanh ..	29
3.2.3. Kiểm tra sự có mặt và hoạt động của gen chuyển trên rễ tơ in vivo cây đậu xanh .....	30
3.2.4. Đánh giá khả năng tương tác cộng sinh với vi khuẩn nốt sần của rễ tơ in vivo ở cây đậu xanh .....	32
3.2.5. Mô tả quy trình chuyển gen thông qua rễ tơ in vivo trên giống đậu xanh Việt Nam .....	34
<b>CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>38</b>
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>38</b>
<b>KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>38</b>

<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ .....</b>	<b>39</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>40</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>49</b>

## DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
<i>A. rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
<i>R. rhizogenes</i>	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	
CCM	Co-cultivation medium	Môi trường đồng nuôi cấy
chv	Chromosomal virulent	Độc tố nhiễm sắc thể
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat	Nhóm trình tự ngắn, phân cách đều, lặp lại và đối ngẫu
Cas9	Crispr associated protein 9	Protein Cas 9
GM	Germination medium	Môi trường nảy mầm
GUS	$\beta$ -Glucuronidase	
In vitro		Trong ống nghiệm
In vivo		Trong cơ thể sống
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào thực vật
vir	Virulence	Độc tính
Ri-plasmid	Root-inducing plasmid	Plasmid kích thích ra rễ
LB	Luria Bertami	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
OD	Optical Density	Mật độ quang
PCR	Polymerase Chain	Phản ứng chuỗi polymerase

	Reaction	
RM	Rooting medium	Môi trường tạo rễ
X-Gluc		Nhuộm X-Gluc
YEP	Yeast extract peptone	Môi trường nuôi cấy khuẩn YEP



## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

	<i>Trang</i>
<b>Hình 1.1.</b> Cây đậu xanh ( <i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek) .....	4
<b>Hình 1.2.</b> Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> .....	7
<b>Hình 1.3.</b> Cấu trúc vòng Ri-plasmids của vi khuẩn <i>A. rhizogenes</i> .....	9
<b>Hình 3.1.</b> Tỷ lệ hình thành mô sẹo ở mảnh lá mầm đậu xanh .....	22
<b>Hình 3.2.</b> Tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ từ mô sẹo sau 24 ngày lây nhiễm .....	23
<b>Hình 3.3.</b> Số lượng rễ tơ trung bình trên mẫu thí nghiệm .....	24
<b>Hình 3.4.</b> Kết quả xác nhận sự có mặt của gen chuyển ở các dòng rễ tơ .....	25
<b>Hình 3.5.</b> Sơ đồ minh họa quy trình chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ trên giống đậu xanh DX2 thông qua vi khuẩn <i>R. rhizogenes</i> .....	26
<b>Hình 3.6.</b> Tỷ lệ tạo rễ tơ <i>in vivo</i> và tỷ lệ rễ tơ có biểu hiện GUS của 2 chủng vi khuẩn trên cây đậu xanh .....	28
<b>Hình 3.7.</b> <i>Rhizobium rhizogenes</i> K599 kích thích khả năng tạo rễ <i>in vivo</i> trên 3 giống đậu xanh Việt Nam .....	30
<b>Hình 3.8.</b> Biểu hiện gen chỉ thị GUS trên rễ tơ đậu xanh .....	31
<b>Hình 3.9.</b> Sản phẩm PCR cho gen GUS từ các rễ tơ thu được từ các cây chuyển gen .....	32
<b>Hình 3.10.</b> Rễ mang nốt sần biểu hiện gen chỉ thị GUS trên rễ tơ đậu xanh .....	33
<b>Hình 3.11.</b> Quy trình tạo rễ tơ <i>in vivo</i> trên đậu xanh sử dụng vi khuẩn <i>R. rhizogenes</i> K599 trên giống đậu xanh Việt Nam .....	34

## MỞ ĐẦU

### 1. Lí do chọn đề tài

Được biết đến là loài cây trồng có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao, đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) so với nhiều loại cây họ đậu khác, là loài sinh trưởng nhanh và dễ dàng chăm sóc. Hạt đậu xanh được sử dụng trong thực phẩm, đồng thời còn là một nguồn dược liệu quý chữa bệnh cho con người với nhiều tác dụng như: thanh nhiệt, giải độc, giảm sưng phù, .... Các sản phẩm phụ như thân, lá của cây đậu xanh được sử dụng làm nguồn thức ăn cho các loài gia súc. Trồng cây đậu xanh không chỉ mang lại hiệu quả về kinh tế và dinh dưỡng mà còn có tác dụng cải tạo đất vì bộ rễ của cây đậu xanh có vi khuẩn cố định đạm sống cộng sinh trong các nốt sần của rễ cây [1].

Hàng năm ở nước ta phải nhập khẩu một lượng đậu xanh khá lớn đậu xanh chủ yếu từ Campuchia và Trung Quốc do nhu cầu rất lớn nguyên liệu này trong chế biến lương thực, thực phẩm, nhưng sản lượng đậu xanh trong nước không đủ để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ hiện nay. Để phát triển cây đậu xanh, các hướng nghiên cứu chính hiện nay là chọn được giống có sản lượng cao, kháng được sâu bệnh, khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi tốt. Bên cạnh các phương pháp lai tạo truyền thống, sử dụng các phương pháp chuyển gen và chỉnh sửa gen có thể tạo ra các giống mới với các tính trạng mong muốn trong thời gian ngắn. Do đó, các phương pháp chuyển gen và chỉnh sửa gen trên đậu xanh đang là hướng đi mới và đang được các nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm.

Có nhiều phương pháp chuyển gen đang được áp dụng trên các giống cây trồng, trong đó phương pháp chuyển gen qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* là phương pháp hiệu quả và được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu cơ bản và tạo giống cây trồng hiện nay. Phương pháp này ít tốn kém và đơn giản, dễ thực hiện hơn so với biến nạp gen bằng súng bắn gen, xung điện hay vi tiêm đồng thời khả năng chuyển gen ổn định và cho hiệu quả cao.

Việc thiết kế và kiểm tra hoạt động của các cấu trúc dùng trong biến nạp gen là một trong các bước rất quan trọng đảm bảo cho nghiên cứu chuyển gen và chỉnh sửa gen thành công. Thông thường, chuyển gen qua vi khuẩn *A.tumefaciens* là một quá trình thường kéo dài, hiệu quả biến nạp gen không cao và còn chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau. Do vậy, nhằm giảm thiểu các rủi ro trong chuyển gen, trước khi tiến hành biến nạp ổn định các cấu trúc đó vào các giống và dòng cây quan tâm thì chúng ta cần phải kiểm tra hoạt động của cấu trúc chuyển gen hay chỉnh sửa gen.

Kiểm tra hoạt động của cấu trúc chuyển gen hay chỉnh sửa gen sử dụng hệ thống cảm ứng rễ tơ thông qua vi khuẩn *Rhizobium rhizogenes* (*R. rhizogenes*) có thời gian tiến hành ngắn hơn, đơn giản hơn, và hiệu quả hơn so với hệ thống chuyển gen bền vững thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Vì vậy, hiện nay hệ thống này đang được phát triển và ứng dụng phổ biến trong kiểm tra hoạt động của cấu trúc chuyển gen và chỉnh sửa gen ở nhiều giống cây trồng khác nhau. Tuy nhiên, các nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ trên cây đậu xanh ở Việt Nam còn chưa được tiếp cận và phát triển.

Với mục đích nghiên cứu thiết lập một hệ thống nhanh và hiệu quả trong đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen hay chỉnh sửa hệ gen trên cây đậu xanh, chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ tơ cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)**” làm cơ sở cho các ứng dụng tiếp theo của hệ thống này.

## **2. Mục đích nghiên cứu**

Khảo nghiệm và thiết lập hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ trên cây đậu xanh thông qua vi khuẩn *R. rhizogenes* phục vụ công tác kiểm tra nhanh hoạt động của cấu trúc chuyển gen, biểu hiện gen ở loài cây này.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

**Nội dung 1:** Thiết lập hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ và chuyển gen thông qua rễ tơ *in vitro* trên đậu xanh.

**Nội dung 2:** Thiết lập hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ *in vivo* và đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen trên rễ tơ *in vivo* cây đậu xanh.

#### **4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài**

##### **4.1. Ý nghĩa khoa học**

Thiết lập được phương pháp chuyển gen thông qua rễ tơ trên đậu xanh nhằm phục vụ yêu cầu đánh giá nhanh hoạt động của cấu trúc mang gen chuyển hay các cấu trúc chỉnh sửa gen, và nghiên cứu chức năng gen ở rễ ở đậu xanh trong các nghiên cứu tiếp theo trên loài cây này.

##### **4.2. Ý nghĩa thực tiễn**

Kết quả nghiên cứu từ khóa luận này là bước khởi đầu quan trọng trong ứng dụng kỹ thuật di truyền để nghiên cứu chức năng gen, cũng như tạo giống mới trên các giống đậu xanh Việt Nam. Hơn thế, các nhóm nghiên cứu khác có thể áp dụng hệ thống chuyển gen thông qua rễ tơ được phát triển từ nghiên cứu này nhằm nghiên cứu trên các gen trên đậu xanh hoặc có thể áp dụng phương pháp này trên các đối tượng khác nhau.

#### **5. Những đóng góp của luận văn**

- Hai chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 và ATCC:15834 đều có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên ba giống đậu xanh Việt Nam.
- Vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 phù hợp cho chuyển gen và cảm ứng tạo rễ tơ *in-vitro* trên một số giống đậu xanh Việt Nam.
- Trong các giống đậu xanh được thử nghiệm, giống đậu xanh DX2 được xác định phù hợp nhất cho cảm ứng tạo rễ tơ thông qua vi khuẩn *R. rhizogenes* ở cả trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*.
- Đã xây dựng và hoàn thiện quy trình cảm ứng tạo rễ tơ *in vivo* trên đậu xanh thông qua vi khuẩn *R. rhizogenes*.

## CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

### 1.1. Cây đậu xanh

#### 1.1.1. Nguồn gốc và phân loại đậu xanh

Đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) còn được gọi là đỗ xanh là loài cây quan trọng trong nền ẩm thực của Việt Nam và các nước châu Á. Đậu xanh có số lượng nhiễm sắc thể  $2n = 22$ , là loại cây thân thảo hàng năm thuộc họ đậu [2]. Đậu xanh được trồng cách đây 5-6 nghìn năm, bắt nguồn từ Tây Nam Á. Ở Ấn Độ, đậu xanh đã được trồng từ thời xa xưa cho đến nay vẫn được trồng với số lượng lớn. Ngoài Ấn Độ thì Pakistan, Afghanistan, Iran, Miến Điện, Trung Quốc, Việt Nam, Nhật Bản, các nước châu Phi, các nước Nam Mỹ, Úc cũng là các nước đậu xanh được trồng với một diện tích lớn [3].



**Hình 1.1** Cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) [4]

Cây đậu xanh thuộc chi *Vigna*, gồm 7 chi phụ là: *Ceratotropic*, *Lasionspron*, *Sigmoidotrotopis*, *Vigna*, *Haydonia*, *Plectropic*, *Macrohynchus*; đây là một trong những chi lớn của họ đậu. Thuộc họ Fabaceae, bộ Fabales, lớp Magnoliopsida, ngành Magnoliopyta. Đậu xanh gieo lấy hạt của Việt Nam bao gồm các giống trong hai chi phụ là *Vigna* và *Ceratotropic*. Nhóm đậu châu Á thuộc chi phụ *Ceratotropic* mang những đặc điểm đặc trưng điển hình cho *Vigna* [5].

#### 1.1.2. Đặc điểm thực vật học cây đậu xanh

Đậu xanh là cây sinh trưởng ngắn ngày, tốc độ sinh trưởng nhanh, chu kỳ sinh trưởng ngắn, khoảng 60 - 90 ngày, đồng thời, yêu cầu kỹ thuật chăm sóc rất đơn giản nên có thể được trồng xen canh, luân canh nhiều vụ trong một

năm và trồng trên nhiều loại đất khác nhau. Đậu xanh cao khoảng 60–76 cm, là loại cây thân thảo, thân mọc đứng và phân nhánh nhiều [6]. Lá kép mọc cách, có ba lá chét, có lông ở cả 2 mặt lá, ở phần ngọn của cây có các cụm gồm 12–15 lá và sau đó những lá này sẽ phát triển thành những quả hình trụ nhỏ. Hoa có màu vàng lục và nở ở nách lá, quả có dạng hình trụ, mảnh và có lông, các hạt nằm trong vỏ quả nhỏ và gần như có dạng hình cầu. Hạt đậu xanh có 3 thành phần chính là vỏ hạt, lá mầm và phôi lần lượt chiếm 12,1%, 85,6% và 2,3% toàn bộ hạt. Trong đó vỏ hạt là lớp vỏ bọc bên ngoài nhằm bảo vệ phôi bên trong [7]. Khi bắt đầu hình thành, hoa có màu xanh tím và dạng hình cánh bướm, sau khi nở có màu vàng. Trên các trục có hoa lưỡng tính mọc thành chùm và có thể phát triển thành hai hàng hoa xếp liên tục mọc đối nhau [5].

Khi chín, quả đậu xanh có màu đen hoặc vàng nâu, trên vỏ quả được bao phủ một lớp lông mịn. Có trung bình khoảng 20 - 30 quả trên mỗi cây, mỗi quả có khoảng 5 – 10 hạt [8]. Hạt có nhiều hình dạng khác nhau như hình ovan, tròn, trụ, thoi, tam giác. Vỏ hạt màu xanh mỡ, xanh lục, xanh tối hoặc vàng rơm. Ruột có màu trắng, vàng hay xanh nhạt [9]. Phôi là phần phát triển thành cây non khi hạt nảy mầm, chiếm khoảng 3% khối lượng toàn hạt; bên trong của phôi có 2 lá mầm gồm 2 phần chính là chồi mầm và rễ mầm, nó chiếm khoảng 90% khối lượng hạt.

Đậu xanh có rễ cọc gồm một rễ chính ăn sâu khoảng 20 - 30 cm, có thể sâu tới 70 - 100 cm và các rễ phụ gồm khoảng từ 30 - 40 rễ, dài khoảng 20 - 25 cm [10]. Các nốt sần chứa các vi khuẩn *Rhizobium* sống cộng sinh trong nốt sần ở rễ cây họ đậu có khả năng cố định nitơ khí quyển để cung cấp một phần đạm cho cây và tạo ra trong đất một lượng đạm đáng kể sau khi thu hoạch. Do vậy sau khi trồng đậu xanh thì đất canh tác sẽ trở nên tơi xốp và giàu dinh dưỡng hơn [11]. Các nốt sần thường có đường kính khoảng 4 - 5 mm, màu hồng hoặc đỏ, có khả năng cố định nitơ. Đất trở nên tơi xốp hơn vì hàng năm mỗi vụ, trung bình một hecta đậu xanh có thể bù lại cho đất khoảng 85 - 107 kg nitơ [2].

### ***1.1.3. Tầm quan trọng của cây đậu xanh***

Sau đậu tương và lạc, đậu xanh là loại cây trồng đứng thứ ba về giá trị kinh tế. Hạt đậu xanh là loại thực phẩm giàu dinh dưỡng chứa từ 24 - 28% đạm, khoảng 1,3% lipit, glucid 60,2% cùng nhiều loại chất khoáng như Ca, Fe, Na, K, P và các vitamin B1, B2, C tan trong nước [5]. Trên 100 g mẫu đậu xanh nguyên hạt với hàm lượng protein cao (22,9 g), chất béo (1,2 g), carbohydrate tổng số (61,8 g), chất xơ thô (4,4 g), và tro (3,5 g) [12]. Đậu xanh nguồn cung cấp dồi dào loại protein dễ tiêu hoá và phù hợp cho trẻ đang dưỡng bệnh hoặc người bị suy dinh dưỡng. Các chất dinh dưỡng được phân bố không đồng đều ở các thành phần chính như vỏ hạt, lá mầm, phôi của hạt đậu xanh, mặt khác chất xơ thô và tinh bột tập trung nhiều lần lượt ở vỏ hạt và lá mầm.

Nhiều loại axit amin không thay thế có nhiều trong protein của hạt đậu xanh như leucine, methionine, valine, isoleucine, lysine, ... Ngoài ra, các bộ phận khác của cây như lá non, ngọn và thân có thể được dùng để làm rau, muối dưa, làm thức ăn cho hoặc nghiền nhỏ thành bột thức ăn dự trữ cho gia súc [5]. Có rất nhiều sản phẩm giá trị từ đậu xanh trên thị trường cũng như ở các hộ gia đình, đặc biệt là các sản phẩm giàu protein, chứa chất chống oxy hóa, không chứa gluten, ít chất béo và giảm chỉ số đường huyết (GI) [13]. Hạt đậu xanh có vị ngọt, tính mát nên có giá trị trong y học với tác dụng thanh nhiệt, giải độc, ... Các nghiên cứu cho thấy có thể điều chỉnh được hệ vi khuẩn đường tiêu hóa nếu duy trì thường xuyên chế độ ăn giàu đậu xanh, ngoài ra còn làm giảm sự hấp thu các chất độc hại, từ đó giảm các triệu chứng rối loạn mạch vành và các nguyên nhân ung thư khác nhau [14].

### ***1.1.4. Tình hình sản xuất cây đậu xanh trên thế giới và ở Việt Nam***

Đậu xanh là một trong những nhóm cây trồng đóng vai trò quan trọng trong việc giải quyết vấn đề an ninh dinh dưỡng trên toàn thế giới.

Do nhu cầu của con người về dinh dưỡng protein thực vật tăng nhanh trong những năm gần đây đã làm thúc đẩy việc sản xuất đậu xanh phát triển mạnh. Trên thế giới, tình hình sản xuất đậu xanh ngày một gia tăng [15].

Theo FAOSTAT 2016, gần một nửa sản lượng đậu xanh trên thế giới được sản xuất ở châu Á, đậu xanh đang được trồng trên khắp thế giới và đặc biệt Ấn Độ là nước sản xuất đậu xanh lớn nhất với hơn 29 triệu ha. Hơn 3 triệu tấn đậu xanh được sản xuất trên thế giới mỗi năm, trong đó Ấn Độ đóng góp vào phần lớn đậu xanh trên thị trường thế giới với sản lượng 1,9 triệu tấn, với 42% diện tích và 39% sản lượng vượt trội so với tổng sản lượng đậu xanh toàn cầu [16]. Đứng thứ hai là Trung Quốc với 0,98 triệu tấn và Myanmar 0,4 triệu tấn, Indonesia là 0,3 triệu tấn, Thái Lan 0,21 triệu tấn, và Pakistan 0,199 triệu tấn. Trong đó, Trung Quốc được xem là quốc gia xuất khẩu đậu xanh lớn nhất thế giới [17].

Ở nước ta, đậu xanh được gieo trồng phổ biến ở nhiều địa phương trên cả nước chủ yếu nhằm đáp ứng nhu cầu tiêu dùng của người dân hàng ngày như làm giá đỗ, bánh đậu xanh, .... Do nhu cầu sử dụng nên đậu xanh hiện đang có xu hướng gia tăng về diện tích và sản lượng. Mặc dù vậy tập đoàn giống đậu xanh của Việt Nam vẫn còn nhiều hạn chế và năng suất chưa cao. Do vậy, cần phải có các phương pháp lai tạo, áp dụng kỹ thuật di truyền để đạt được kết quả tốt, nhằm tạo ra các giống mới nâng cao năng suất và chất lượng, đồng thời có thể chịu được các điều kiện môi trường khắc nghiệt [15].

## 1.2. Vi khuẩn *Rhizobium rhizogenes*

### 1.2.1. Phân loại

Riker và cộng sự năm 1930 lần đầu tiên định danh vi khuẩn *Rhizobium rhizogenes* với vị trí phân loại như sau [18]:

Giới: Bacteria

Ngành: Proteobacteria

Lớp: Alpha Proteobacteria

Bộ: Rhizobiales

Họ: Rhizobiaceae

Chi: *Agrobacterium*



**Hình 1.2.** Vi khuẩn *R. rhizogenes*

(<http://commtechlab.msu.edu>)



### 1.2.2. Giới thiệu về *Rhizobium rhizogenes*

*Rhizobium rhizogenes* (trước đây được gọi là *Agrobacterium rhizogenes*) là vi khuẩn gây bệnh trên thực vật với triệu chứng hình thành rễ tơ hoặc bệnh khảm rễ. *R. rhizogenes* là một loại vi khuẩn gram âm, sống trong đất, dạng hình que, có khả năng di động nhờ 1- 6 tiên mao, không sinh bào tử, thuộc chi *Agrobacterium* [19, 20, 21, 22, 23]. *R. rhizogenes* có quan hệ rất gần với *A. tumefaciens* là tác nhân gây khối u sần trên cây [24, 25].

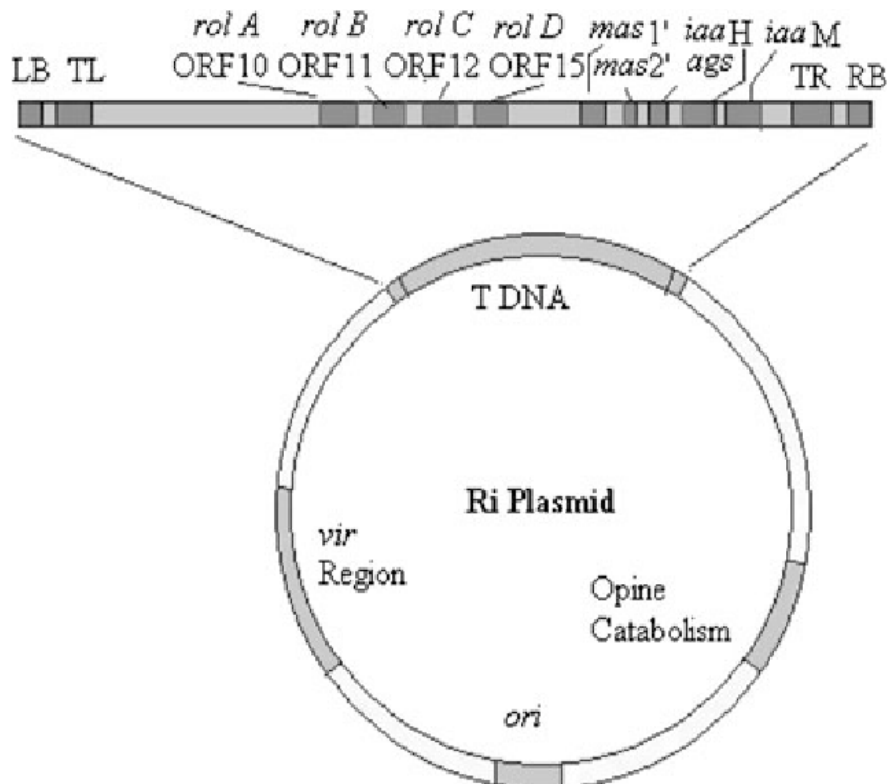
Tất cả các chủng *A. rhizogenes* được đặc trưng bởi sự xuất hiện của một plasmid cảm ứng rễ lớn (Ri) cần thiết cho sự hình thành rễ tơ, nó chứa vùng DNA “lõi” được bảo tồn cao [26]. Tương tự như bệnh u sần do *A. tumefaciens* gây ra [27, 28] thì vi khuẩn *R. rhizogenes* gây ra bệnh rễ tơ ở cây bị nhiễm bệnh thông qua biến đổi gen [29, 30].

*R. rhizogenes* sống gần rễ cây và gây ra bệnh trên cây ký chủ bị nó xâm nhập, gọi là “hội chứng rễ tơ”. Hội chứng này bao gồm các rễ phát triển không hướng đất và sinh trưởng mạnh mẽ xung quanh vị trí lây nhiễm [31].

Các hiểu biết cơ bản về cơ chế phân tử của quá trình biến nạp gen thực vật bởi những loài của chi *Agrobacterium* hiện nay đều chủ yếu dựa trên các nghiên cứu mở rộng sử dụng *A. tumefaciens*. Quá trình lây nhiễm được xem như là tương tự nhau trong cả 2 loài. *R. rhizogenes* lây nhiễm vào tế bào thực vật ở vị trí vết thương do *R. rhizogenes* bị thu hút bởi hợp chất phenol được tiết ra từ những tế bào bị tổn thương. Ri plasmid của *R. rhizogenes* sẽ xâm nhập vào tế bào thực vật và một đoạn nhỏ của Ri plasmid là T-DNA sẽ được chuyển và gắn vào bộ gen của tế bào thực vật. Theo cách này T-DNA được duy trì ổn định trong tế bào thực vật. Từ vùng bị nhiễm sẽ tạo ra những rễ nhánh bất thường gọi là rễ tơ. Những rễ này có đặc điểm là phát triển và phân nhánh nhiều, tăng trưởng nhanh [32].

Một đặc tính quan trọng của rễ tơ là mặc dù trong điều kiện không có các yếu tố kích thích tăng trưởng thì chúng vẫn có khả năng phát triển *in vitro*, những đặc tính này làm cho rễ tơ trở thành một công cụ được sử dụng phổ biến

trong việc sản xuất những hợp chất thứ cấp, khảo sát chức năng gen, và nghiên cứu sinh học rễ nói chung.



**Hình 1.3.** Cấu trúc của vòng Ri-plasmids ở vi khuẩn *A. rhizogenes* [32].

Ri plasmid trong tất cả các chủng *R. rhizogenes* có một vùng được gọi là T-DNA mang các gen (*rol*-genes) liên quan đến sự khởi đầu và phát triển của rễ cũng như các gen cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp opine [33,34]. T-DNA tạo thành một vùng nhỏ (khoảng 200 kb) của plasmid Ti/Ri có liên quan đến các chức năng không chỉ liên hợp plasmid Ti/Ri, tổng hợp và dị hóa opine mà còn khởi tạo, chuyển giao và tích hợp T-DNA. Mặc dù T-DNA chứa các gen có nguồn gốc vi khuẩn, những gen này có trình tự điều hòa nhân thực cho phép chúng biểu hiện trong tế bào thực vật bị nhiễm bệnh. Sau khi tích hợp T-DNA vào DNA bộ gen của tế bào thực vật, T-DNA biểu hiện các enzyme điều hoà quá trình tổng hợp các dẫn xuất đường axit amin bất thường được gọi là opine, được *Agrobacteria* sử dụng làm nguồn dinh dưỡng [22, 25].

Có ít nhất hai loại opine được tạo ra bởi chủng *R. rhizogenes*. Một loại được đại diện bởi nhóm agropine, và loại còn lại là nhóm agrocino-pin.

Hầu hết các chủng *R. rhizogenes* đều có khả năng sản xuất loại agrocinopine và một số chủng sản xuất loại agropine. Các opine dạng agropin bao gồm agropin, mannopin, axit agropinic và axit man-nopinic [35,36].

Các chủng *R. rhizogenes* phổ biến nhất được đại diện bởi các plasmid Ri là loại agropine: pRiA4, pRi1855, pRiHRI, pRi15834 và pRiLBA9402, loại manno-pine: pRi8196, loại cucumopine: pRi2659 và pRi1724 loại mikimopine. Mặc dù mikimopine và cucumopine là các đồng phân lập thể, nhưng không có sự tương đồng giữa các gen sinh tổng hợp opine ở cấp độ nucleotide [37, 38]. Các chủng K47, K599 và HRI là những chủng siêu độc lực trong số các chủng *R. rhizogenes* khác nhau đã biết, chúng có khả năng lây nhiễm trên nhiều loại vật chủ thực vật khác nhau. Những nghiên cứu về các yếu tố độc lực của các chủng này cần được thực hiện nhiều hơn để hiểu rõ liệu chúng nằm trên các nhiễm sắc thể hay plasmid hoặc cả hai [36, 39, 40].

### **1.2.3. Giới thiệu về cơ chế tạo rễ tơ và hệ thống nuôi cấy rễ tơ thực vật**

Rễ tơ là một bệnh ở thực vật được tạo ra do quá trình tương tác giữa tế bào vật chủ với vi khuẩn *R. rhizogenes* với triệu chứng điển hình là sự hình thành một khối u rễ xảy ra do một số lượng lớn rễ nhỏ nhô ra dưới dạng lông mịn trực tiếp từ vị trí nhiễm khuẩn [41].

Sản phẩm tạo ra có thể loại bỏ được dư lượng các chất điều hòa sinh trưởng vì trong môi trường không cần bổ sung các chất này thì rễ tơ vẫn có thể sinh trưởng và phát triển tốt. Không những vậy, hệ thống nuôi cấy rễ tơ thực vật còn có vai trò rất quan trọng trong dây chuyền sản xuất các chất thứ cấp hay các dược phẩm sinh học tái tổ hợp vì kỹ thuật nuôi cấy và chuyển gen dễ dàng, rễ tơ phân nhánh nhiều, khả năng sinh trưởng mạnh và có thể được nuôi cấy tạo sinh khối liên tục. Ngoài ra các cây bị bệnh rễ tơ còn có đặc điểm là giảm khả năng sinh sản, lông rễ mọc nhiều, ra hoa bất thường, ra hoa sớm, tăng số lượng hoa, các đốt ngắn, mức độ phân nhánh cao, lá nhăn nheo, giảm ưu thế ngọn, nâng cao tốc độ tăng trưởng và thay đổi tích lũy chất chuyển hóa thứ cấp [42, 43].

Ở những vị trí thực vật bị vết thương, các hợp chất phenolic được giải phóng đã hấp dẫn đối với *R. rhizogenes*, chúng di chuyển về phía các vị trí bị thương bằng hóa hướng động và lây nhiễm vào tế bào thực vật. Sau đó tại vị trí vết thương, một đoạn DNA cụ thể (T- DNA) từ plasmid (Ri) cảm ứng rễ (Ri) của vi khuẩn [44] được chuyển sang tế bào thực vật dẫn đến sự rối loạn các chất sinh trưởng nội sinh, tạo ra rễ tơ.

***Cơ chế hình thành rễ tơ:***

Như đã trình bày ở trên, giống như Ti-plasmid ở vi khuẩn *R. tumefaciens*, Ri-plasmid ở vi khuẩn *R. rhizogenes* là phân tử DNA mạch vòng, sợi kép có kích thước phân tử lớn từ 200-800 kbp, chứa vùng T-DNA đơn. T-DNA của Ri-plasmid được tích hợp một cách ngẫu nhiên vào trong bộ gen của cây chủ và biểu hiện dưới dạng phân tử mRNA. Mỗi chủng vi khuẩn *Rhizobium* đều chỉ mang một bản sao duy nhất Ri-plasmid có kích thước lớn. Phần T-DNA của Ri-plasmid có chứa các gen tương đồng với các gen trên T-DNA của Ti-plasmid gây khối u trên vi khuẩn *R. tumefaciens*.

Khi bị tổn thương, tế bào thực vật tiết ra các polyphenol hấp dẫn các vi khuẩn, tại đây chúng chuyển một đoạn T-DNA (transfer DNA) từ plasmid Ri vào hệ gen của tế bào vật chủ. Các gen mã hóa trên T-DNA có nguồn gốc từ vi khuẩn nhưng có các trình tự điều khiển của tế bào nhân chuẩn giúp cho việc biểu hiện ở các tế bào chủ bị lây nhiễm. Các gen này mã hóa cho các thành phần chức năng tham gia trong quá trình sinh tổng hợp auxin. Ngoài chúng cũng tham gia vào việc tổng hợp các hợp chất kích thích phân chia của tế bào để hình thành rễ tơ dưới ảnh hưởng của auxin nội sinh.

Sự biểu hiện đồng thời của các gen *rolA*, *rolB* và *rolC* gây nên sự xuất hiện rễ tơ ở mô tế bào thực vật bị lây nhiễm, trong đó *rolB* đóng vai trò quan trọng hơn cả, *rolA* và *rolC* hoạt động hỗ trợ thúc đẩy sự hình thành và phát triển của rễ tơ. Các rễ tơ này có khả năng sinh trưởng và phát triển nhanh hơn rất nhiều so với rễ bình thường.

Ở hầu hết các loài thực vật hai lá mầm và một số ít các loài thực vật một lá mầm, chủng *R. rhizogenes* có khả năng xâm nhiễm qua vết thương. Kết quả dẫn đến sự hình thành rễ tơ tại chỗ hoặc xung quanh vị trí mô bị tổn thương. Trong công tác chuyển gen, người ta thiết kế lại T-DNA của Ri-plasmid với các gen quan tâm và sử dụng trong chuyển gen. Ngoài ra, các rễ tơ tạo được có thể vừa mang T-DNA của Ri-plasmid và cả T-DNA của các vector nhị thể khác nếu chúng được đồng biến nạp vào tế bào chủ. Vì mỗi rễ tơ tạo ra được xem như một dòng chuyển gen độc lập nên có thể thu được số lượng lớn gen chuyển trong một khoảng thời gian ngắn.

Các nghiên cứu so sánh cho thấy mức độ tương đồng cao giữa các plasmid Ri và Ti, có những vùng được bảo tồn giữa hai loại plasmid. Điều này cho thấy các cơ chế chung như kích hoạt, xử lý và di chuyển T-DNA từ vi khuẩn đến tế bào thực vật được duy trì rất lâu. Một đoạn trong cả hai plasmid Ri và Ti được gọi là T-DNA bao gồm các đoạn lặp trực tiếp 24-bp tương đồng cao được gọi là các chuỗi biên [45]. Trong quá trình nhiễm *Agrobacteria*, T-DNA được chuyển từ vi khuẩn sang tế bào thực vật [24]. T-DNA kiểu hoang dại đã mã hóa các gen gây bệnh và gen dị hóa opine, gây ra sự phát triển mới của các mô và sản xuất opine [46, 47]. Ngoài ra, một đoạn khác được gọi là vùng độc lực (vir) trong Ti-plasmid có liên quan đến việc chuyển DNA vào bộ gen thực vật [48]. Rễ tơ có khả năng phát triển trong điều kiện không có hormone thực vật ngoại sinh trên tế bào thực vật do có sự hiện diện của T-DNA [49].

Các cơ chế phân tử liên quan đến quá trình hình thành rễ tơ còn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Mặc dù vậy, chuyển gen để hình thành nên các rễ tơ là một quá trình gồm năm giai đoạn cơ bản như sau [50]:

(a) Các hợp chất phenolic thu hút *Rhizobium*, chẳng hạn như acetosyringone được cây giải phóng sau khi bị tổn thương, từ đó kích hoạt sự gắn kết của vi khuẩn với tế bào rễ.

(b) Bên trong tế bào vi khuẩn, T-DNA được kích hoạt và hình thành phức hợp giữa sợi T với những protein liên quan (phức hợp T).

- (c) Phức hợp T được chuyển từ vi khuẩn sang bộ gen của tế bào thực vật.
- (d) Tích hợp T-DNA vào bộ gen thực vật và T-ADN được biểu hiện.
- (e) Tại nơi lây nhiễm rễ tơ bắt đầu xuất hiện.

#### **1.2.4. Phương pháp chuyển gen tạo rễ tơ**

Về nguyên tắc, để tạo rễ tơ ở thực vật thì cần có sự tiếp xúc giữa vi khuẩn *R. rhizogenes* và mô tế bào thực vật bị tổn thương. Các bộ phận của thực vật như lá, chồi đỉnh, cuống hoa, trụ dưới lá mầm, gân lá, đỉnh chồi, tế bào trần rễ dự trữ/củ, lá mầm đều có thể bị lây nhiễm khuẩn và cảm ứng để tạo rễ tơ [51]. Tuy nhiên, bản chất loài, đặc tính vật liệu biến nạp và tuổi vật liệu biến nạp là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới hiệu quả cảm ứng rễ tơ. Vật liệu mô non, chưa biệt hóa thường thích hợp nhất cảm ứng hình thành rễ tơ với hiệu suất cao.

Trong phương pháp tạo rễ *in-vitro*, mẫu thực vật được làm tổn thương và đồng nuôi cấy hay ủ với vi khuẩn *R. rhizogenes* để cảm ứng hình thành rễ tơ. Sau thời gian đồng nuôi cấy 2-3 ngày, mẫu thực vật được chuyển lên môi trường đặc có các loại kháng sinh phù hợp với nồng độ dao động từ 100-500 µg/ml để diệt và loại bỏ vi khuẩn còn sót lại như: tetracycline hoặc streptomycin, ampicillin, claforan, cefotaxime, carbecillin, vancomycin [52]. Trong một khoảng thời gian ngắn, thường dao động trong khoảng từ 1 tuần đến một tháng tùy vào các loài thực vật khác nhau, rễ tơ sẽ được cảm ứng. Hơn thế, mỗi rễ tơ tạo ra có thể thu được số lượng lớn dòng chuyển gen trong khoảng thời gian ngắn vì được xem như một dòng chuyển gen độc lập [53].

#### **1.2.5. Ứng dụng và các thành tựu của hệ thống nuôi cấy rễ tơ thực vật**

Vì rễ tơ do *R. rhizogenes* gây ra có thể phát triển *in vitro* mà không cần chất điều hòa sinh trưởng thực vật ngoại sinh nên bằng việc sử dụng các chủng *R. rhizogenes* trong nuôi cấy *in vitro* các cơ quan thực vật, các cơ quan phát triển nhanh với khả năng tạo ra sự phân nhánh nhiều và tạo ra lượng lớn các chất chuyển hóa cao hơn cây mẹ hoặc các chất chuyển hóa mới mà không phát hiện được ở cây mẹ hay trong các loại nuôi cấy *in vitro* khác [54]. Do vậy, rễ tơ đã được áp dụng trong nhiều nghiên cứu cơ bản về sinh hóa thực vật, sinh học

phân tử và sinh lý học và nông nghiệp. Nuôi cấy rễ tơ đã được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu nốt sần ở rễ, sản xuất hạt giống nhân tạo, chất chuyển hóa thứ cấp và protein thực vật, nhân giống cây trồng và cải tiến cây trồng, hệ thống thí nghiệm để nghiên cứu phản ứng với hóa chất, hình thái học thực vật và phát triển, giải độc các chất ô nhiễm môi trường, xác nhận và phân tích chức năng của các gen tạo ra khả năng kháng các mầm bệnh cụ thể ở rễ và nghiên cứu sự tương tác với các sinh vật khác như tuyến trùng, nấm rễ cộng sinh và mầm bệnh ở rễ. Ngoài ra, việc tăng cường khả năng ra rễ ở cây giúp cây tăng khả năng sống sót sau những stress cây ghép hoặc phi sinh học như hạn hán, nhiễm mặn và nhiễm kim loại nặng [55].

Do khả năng sản xuất ổn định được một lượng lớn sinh khối sạch trong thời gian ngắn, đồng thời khắc phục được những hạn chế của phương pháp nuôi trồng truyền thống nên nuôi cấy rễ *in vitro* là một giải pháp thay thế để thu nhận hoạt chất thứ cấp từ thực vật đầy tiềm năng [56]. Bên cạnh đó, việc bổ sung các chất kích hoạt (elicitor) trong nuôi cấy rễ *in vitro* đã giúp tăng đáng kể khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp trong quá trình nhân nhanh sinh khối rễ; đồng thời còn giúp tối ưu hóa quá trình chiết xuất hoạt chất mục tiêu, ...

Việc bổ sung các chất kích hoạt trong nuôi cấy rễ *in vitro* đã giúp gia tăng các hợp chất thứ cấp được tích lũy trong quá trình nhân nhanh sinh khối rễ. Đồng thời, quá trình chiết xuất hoạt chất mục tiêu còn được tối ưu hóa nhờ nuôi cấy rễ *in vitro* [57].

Các sản phẩm tái tổ hợp có khả năng được sản xuất một cách nhanh chóng và sản lượng cao nhờ các rễ tơ *in vitro*. Đặc biệt, việc biểu hiện được phẩm sinh học tái tổ hợp ra ngoài môi trường nuôi cấy trong hệ thống nuôi cấy lỏng các mô tế bào thực vật đã giúp quá trình tinh sạch các dược phẩm sinh học này đơn giản hơn rất nhiều. Trong những năm gần đây, rễ tơ *in vivo* cũng được được ứng dụng trong nghiên cứu chức năng gen ở rễ, kiểm tra nhanh chức năng gen và ứng dụng trong đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen ở nhiều đối

tượng thực vật khác nhau [58]. Do đó, nghiên cứu tạo rễ tơ đã được ứng dụng phổ biến trong các nghiên cứu ứng dụng và nghiên cứu cơ bản hiện nay.

Do nhu cầu của con người về các loại dược liệu chăm sóc sức khỏe và làm đẹp có nguồn gốc từ tự nhiên ngày càng nhiều đã dẫn đến việc khai thác quá mức các nguồn dược liệu ngoài tự nhiên. Điều này dẫn đến nhiều loài dược liệu quý đứng trước nguy cơ bị đe dọa tuyệt chủng. Nuôi cấy rễ tơ có tính ổn định di truyền, sinh hóa, tốc độ sinh trưởng nhanh và khả năng tổng hợp các hợp chất tự nhiên ở mức tương đương so với cây còn nguyên vẹn. Do đó, nuôi cấy rễ tơ của cây thuốc dường như là một hệ thống hữu ích cho việc sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học cao.

Tại Việt Nam, phương pháp nuôi cấy rễ tơ nhằm chiết xuất các hợp chất quý hiếm đã được áp dụng trên các loại dược liệu như đinh lăng, cát cánh, sâm ngọc linh... Kỹ thuật nuôi cấy rễ tơ hiện đang là một trong những kỹ thuật tiên tiến nhất, có khả năng cung cấp nguồn nguyên liệu sạch một cách chủ động và nhanh chóng, được sử dụng phổ biến trong sản xuất dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm tại các nước phát triển như Mỹ, Pháp, Hàn Quốc, ...

#### **1.2.6. Nghiên cứu tạo rễ tơ trên cây họ đậu**

Việc nghiên cứu cải tạo giống cây trồng bằng ứng dụng công nghệ sinh học trong đã đem lại nhiều thành công trên các loại đối tượng cây trồng khác nhau như cây đậu tương, đậu phộng [59]. Những giống đậu tương mới có khả năng kháng sâu bệnh hại và các loại thuốc diệt cỏ, chống chịu được những điều kiện bất lợi của môi trường như hạn hán, ngập úng và có năng suất cao, chất lượng hạt tốt ... đã được tạo ra bằng phương pháp sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* trong chuyển gen [60 - 64].

Cảm ứng tạo rễ tơ bằng sử dụng vi khuẩn *R. rhizogenes* đã được thực hiện thành công trên nhóm cây họ đậu, ở các đối tượng khác nhau như đậu tương, medicago, đậu phộng... và được ứng dụng trong đánh giá cấu trúc gen CRISPR/Cas9 và nghiên cứu chức năng gen ở các loài cây này [58]. Hiện nay, đã phát triển công nghệ chỉnh sửa hệ gen thông qua hệ thống CRISPR/Cas9



mang lại nhiều ưu điểm và chứng minh được những tiềm năng lớn của công nghệ này trong chọn tạo các giống cây trồng [65, 66]. Công nghệ này đã cho thấy những triển vọng và thành công bước đầu với một số giống đậu tương nhất định [67 - 70].

Đậu xanh, *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek là loài cây quan trọng trong nền ẩm thực của Việt Nam và các nước châu Á. Tại các quốc gia này, đậu xanh được sử dụng để sản xuất giá đỗ, miến và các loại bánh khác nhau. Mặc dù là loài cây thực phẩm quan trọng cho vùng châu Á và vùng nhiệt đới, các nghiên cứu và ứng dụng các phương pháp kỹ thuật gen nhằm cải thiện giống trên loài cây này còn rất hạn chế. Hơn thế, hiện chưa có nghiên cứu hoàn chỉnh về thiết lập phương pháp chuyển gen thông qua rễ tơ nhằm đánh giá nhanh hiệu quả của vector chuyển gen hay nghiên cứu chức năng gen ở rễ cây đậu xanh. Do đó, đề tài “**Nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ tơ cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)**” được thực hiện nhằm làm cơ sở cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng công nghệ sinh học trên loài cây trồng này.

## CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các giống đậu xanh, bao gồm DX1, DX2 và DX3 được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Đậu đỗ, Viện cây lương thực, thực phẩm.

Hai chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* ATCC15834 và K599 hoang dại và mang vector pZY102 (Addgene Cat:73933) có mang gen chỉ thị GUS được cung cấp từ phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Vi khuẩn tạo nốt sần *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 được nhận từ phòng thí nghiệm của Gary Stacey, Đại học Missouri - Columbia, Hoa Kỳ.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Chuẩn bị vật liệu cho biến nạp

##### - Chuẩn bị nguyên liệu thực vật:

*Đối với thí nghiệm cảm ứng rễ tơ in vitro:* Hạt đậu xanh kích thước đồng đều, bề mặt sạch, không tổn thương được khử trùng trong 14 - 16 giờ bằng khí chlorine (sử dụng 100 ml Javen và 4 ml HCl) trong tủ hút vô trùng. Sau đó, hạt được gieo trên môi trường GM (Bảng phụ lục 1) sao cho phần rốn hạt quay xuống môi trường và đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối ở 24°C. Hạt nảy mầm sau 18 -20 giờ được sử dụng làm nguyên liệu chuyển gen [71].

*Đối với thí nghiệm cảm ứng rễ tơ in vivo:* Các hạt giống đậu xanh được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút, tiếp theo khử trùng bằng Javen 20% trong 10 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần. Hạt sau khi khử trùng sẽ được nảy mầm trên giá thể đã khử trùng chứa perlite : vermiculite với tỉ lệ 1:1 được tưới với dung dịch dinh dưỡng BD [28] (Bảng phụ lục 1) có bổ sung 1mM KNO<sub>3</sub> và nuôi trong buồng sinh trưởng với nhiệt độ 26-28°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ. Cây con sau nảy mầm 2,5-3 ngày tuổi sẽ được sử dụng làm vật liệu chuyển gen [51, 53, 72].

### **- Chuẩn bị vi khuẩn:**

Vi khuẩn *R. Rhizogenes K599 hoang dại* và mang vector *pZY102* được nuôi trên đĩa môi trường LB và LB có bổ sung Kanamycin 50 mg/ml, ở 28°C để tạo khuẩn lạc đơn. Sau đó, khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng chứa Kanamycin 50 mg/L ở 28°C để tạo nguyên liệu cho chuyển gen *in vitro* và nuôi trên đĩa môi trường LB đặc chứa Kanamycin 50mg/ml mới ở 28°C để tạo nguyên liệu cho chuyển gen *in vivo*. Vi khuẩn *R. Rhizogenes* chủng ATCC 15834 được nuôi trên môi trường MGL và các bước được tiến hành tương tự như chủng *R. Rhizogenes K599*. Thành phần môi trường LB và MGL được miêu tả trong bảng phụ lục 2.

Vi khuẩn cộng sinh gây nốt sần *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 được nuôi trên môi trường HM bổ sung Chloramphenicol 20mg/L và được nuôi ở 30 °C để tạo khuẩn lạc đơn. Sau đó, khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trong môi trường HM lỏng chứa Chloramphenicol 20mg/L ở 30°C, 200rpm. Vi khuẩn được thu bằng phương pháp ly tâm ở 3600rpm trong 10 phút. Sau ly tâm, vi khuẩn được hòa tan trong nước cất khử trùng và đạt được nồng độ OD<sub>600</sub>=0,02 thì lây nhiễm với rễ của cây con.

### **2.2.2. Phương pháp chuyển gen**

*Đối với thí nghiệm cảm ứng rễ tơ in vitro*: Quy trình chuyển gen tạo rễ tơ trên các giống đậu xanh thông qua vi khuẩn *R. rhizogenes* được phát triển dựa trên phương pháp chuyển gen tạo rễ tơ đậu tương thông qua vi khuẩn *R. rhizogenes* của Cheng và đồng tác giả [73].

Sau khi gieo trên môi trường MS từ 18-20 giờ, phần thân mầm và cuống lá mầm chứa chồi chính được loại bỏ bằng 1 đường cắt vát 30° bằng lưỡi dao 11, hai mảnh lá mầm tách đôi và được tiếp tục gây tổn thương. Các mảnh lá mầm sau khi tổn thương được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn trong thời gian 30 phút và có lắc nhẹ ống khuẩn chứa mẫu. Sau khi lây nhiễm, mẫu được đồng nuôi cấy 3 ngày trên đĩa môi trường CCM (một miếng giấy lọc được đặt trên bề mặt môi trường thạch trước khi chuyển mẫu vào môi trường đồng nuôi

cây) trên giàn đèn phòng nuôi, điều kiện phòng nuôi: nhiệt độ  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , chu kỳ chiếu sáng 16/8 sáng/tối, cường độ chiếu sáng 2000 lux.

Sau 3 ngày đồng nuôi cây, các mảnh lá mầm được rửa khuẩn bằng nước cất khử trùng 2-3 lần, tiếp theo được lắc rửa với môi trường  $\text{RM}_L$  có bổ sung kháng sinh cefotaxime nồng độ 250mg/L. Các mảnh lá mầm sau khi rửa khuẩn được thấm khô với giấy lọc khử trùng và chuyển lên môi trường  $\text{RM}$  có bổ sung 250mg/L cefotaxime để theo dõi khả năng cảm ứng mô sẹo và rễ tơ trong khoảng thời gian 5 ngày và 15. Kết quả cảm ứng tạo rễ tơ được thu thập theo từng ngưỡng thời gian cụ thể: số lượng mẫu cảm ứng tạo mô sẹo, tạo rễ, số lượng rễ ở mỗi công thức thí nghiệm.

*Đối với thí nghiệm in vivo:* Vi khuẩn phát triển trên đĩa petri được gạn lấy và tiêm trực tiếp vào vùng thân mầm sát ngay phí dưới lá mầm của cây non 2,5 ngày tuổi theo Nguyễn Hồng Nhung và đồng tác giả [72]. Các chỉ tiêu theo dõi như số mẫu tạo rễ tơ, số lượng rễ, chiều dài rễ... sẽ được thu thập và phân tích định kỳ theo từng thời điểm thí nghiệm.

### **2.2.3. Đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ tơ**

Sau 7 ngày lây nhiễm đối với điều kiện *in vitro* và 10 ngày với *in vivo*, khả năng hình thành mô sẹo và phát sinh rễ tơ tại vị trí lây nhiễm tiến hành kiểm tra. Tiếp theo, mẫu cây được kiểm tra hàng ngày để đánh giá tỷ lệ hình thành rễ tơ theo thời gian cho tới ngày thứ 15 [51, 71].

Trong nghiên cứu này, các chỉ số dùng để đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ tơ bao gồm tỉ lệ hình thành mô sẹo, tỉ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ, và số lượng rễ tơ trung bình trên mẫu lây nhiễm được thu thập ở mỗi công thức thí nghiệm sau 24 ngày biến nạp.

### **2.2.4. Kiểm tra sự có mặt và hoạt động của gen chỉ thị ở các dòng rễ tơ chuyển gen**

Các mảnh lá mầm và các cây con mang rễ tơ được phát sinh từ các thí nghiệm trên sẽ được thu thập và được nhuộm X-Gluc nhằm đánh giá biểu hiện của gen chỉ thị *gus* trong vector chuyển gen pZY102. Cụ thể, các rễ tơ có chiều

dài từ 2-5 cm được lựa chọn để đánh giá sự có mặt và biểu hiện của gen chuyển. Số lượng rễ tơ mang gene chỉ thị *gus* sẽ được sử dụng để đánh giá hiệu quả chuyển gene thông qua rễ tơ trên cây đậu xanh theo phương pháp của Nguyễn Hồng Nhung và đồng tác giả 2018 [72].

Cụ thể, các mảnh lá mầm chứa cụm rễ tơ được ngâm trong dung dịch X-Gluc và hút chân không 10 phút sau đó đặt trong tủ ổn nhiệt 37°C qua đêm. Khi mẫu rễ quan sát xuất hiện màu xanh lam, mẫu được rửa lại 2 lần với cồn 70% và ủ 3 giờ trong tủ ổn nhiệt 50°C, khi màu xanh lam rõ ràng mẫu được bảo quản lưu giữ mẫu trong cồn 50%. Ngoài ra, các rễ tơ phát sinh từ lá mầm đậu xanh được thu riêng rẽ từng dòng để tách chiết DNA theo phương pháp CTAB. Sự có mặt của gen chuyển sẽ được đánh giá thông qua phương pháp PCR-điện di trên gel agarose sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen chỉ thị *gus*. Các cặp mồi cụ thể được thiết kế dựa trên trình tự gen GUS sử dụng để xác định kiểu gen là:

GUS-F: TGGTGGGAAAGCGCGTTACAAG

GUS-R: ACCTGCCAGTCAACAGACGCGTG.

### **2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được lặp lại hai lần với 50 mẫu trên một nghiệm thức. Số liệu được phân tích thống kê sử dụng Student t-test và one-way ANOVA và kiểm định Tukey's multiple range sử dụng phần mềm GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA).

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen thông qua rễ tơ *in vitro* trên cây đậu xanh

##### 3.1.1. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và giống đậu xanh đến khả năng cảm ứng tạo mô sẹo sau lây nhiễm khuẩn

Hiệu quả chuyển gen ở thực vật phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như kiểu gen, chủng vi khuẩn, các bước trong quá trình chuyển gen, ... Ở thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên ba giống đậu xanh DX1, DX2 và DX3 ở các mật độ huyền phù chủng vi khuẩn K599 khác nhau. Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, mật độ khuẩn thấp làm giảm cơ hội tiếp xúc với tế bào thực vật và vi khuẩn, dẫn đến làm giảm hiệu quả biến nạp; trong khi mật độ khuẩn quá cao có thể làm ảnh hưởng tới sự phát triển của mẫu và gây nhiễm lại khuẩn ở giai đoạn sau.

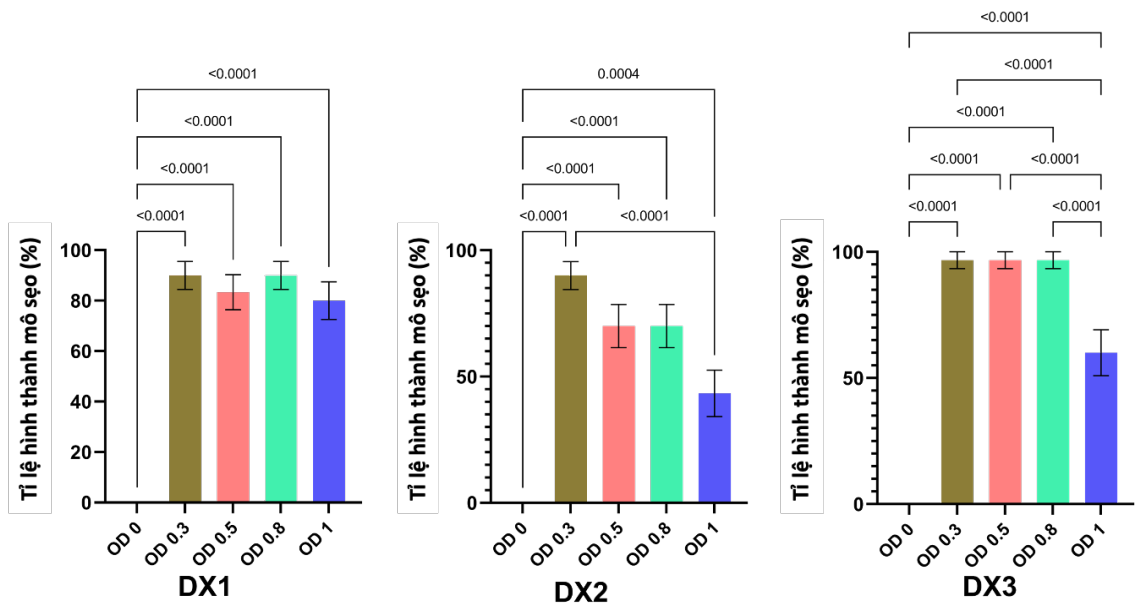
Để xác định được mật độ khuẩn tối ưu cho biến nạp, chúng tôi tiến hành lây nhiễm mảnh lá mầm của ba giống đậu xanh trong dịch huyền phù vi khuẩn ở các mật độ  $OD_{600}$  là 0; 0,3; 0,5; 0,8 và 1. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, sau lây nhiễm tại các vị trí tổn thương thường xuất hiện các mô sẹo trước khi phát sinh các rễ tơ [71]. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành theo dõi và đánh giá khả năng hình thành mô sẹo của mẫu cấy sau một tuần đồng nuôi cấy của các công thức thí nghiệm.

Kết quả cho thấy, mô sẹo được quan sát thấy tại vị trí gây tổn thương của các mảnh lá mầm ở cả ba giống đậu xanh, trong khi ở các mẫu đối chứng không có sự xuất hiện của mô sẹo (Hình 3.1).

Ở giống DX1, tỉ lệ hình thành mô sẹo ở 4 mật độ OD khuẩn đạt từ 80–90%, tuy nhiên sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm không có ý nghĩa thống kê. Mật độ OD khuẩn cho tỉ lệ hình thành mô sẹo cao nhất đối với giống DX2 là 0,3 (80%), và thấp nhất ở công thức  $OD_{600} = 1$  (khoảng 40%). Tỉ lệ xuất hiện mô sẹo cảm ứng tạo rễ tơ ở các mảnh lá mầm giống đậu tương DX3 đạt

90% ở cả ba mật độ OD khuẩn 0,3, 0,5 và 0,8, trong khi tỉ lệ này ở công thức  $OD_{600} = 1$  chỉ đạt 70%.

Như vậy, có thể thấy mật độ vi khuẩn  $OD_{600} = 0,3$  cho hiệu quả cảm ứng tạo mô sẹo tốt nhất nhất trên cả ba giống đậu xanh nghiên cứu.



**Hình 3.1.** Tỷ lệ hình thành mô sẹo ở mảnh lá mầm của các giống đậu xanh sau một tuần đồng nuôi cấy.

Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của ba lần lặp lại với  $n > 30$ . Phân tích thống kê sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều ANOVA và kiểm định hậu định Tukey.

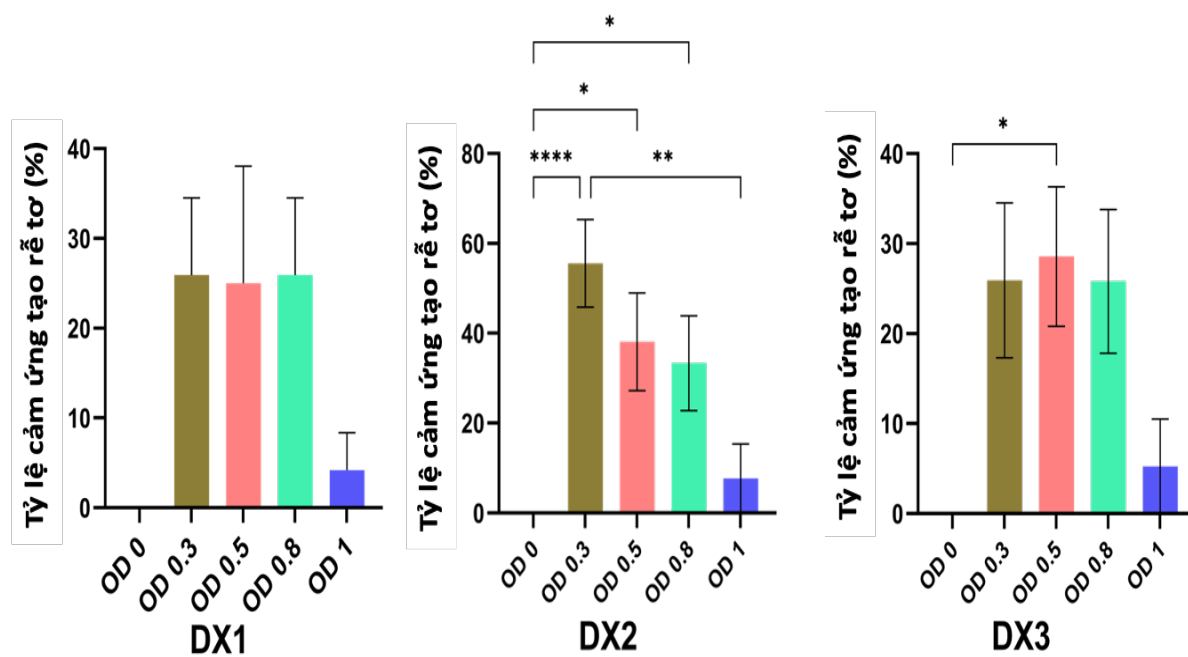
### 3.1.2. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và giống đậu xanh đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ cây đậu xanh

Chúng tôi tiếp tục duy trì và theo dõi các mẫu mô sẹo trên môi trường nuôi cấy và thống kê kết quả phát sinh rễ tơ ở các công thức thí nghiệm. Kết quả thu được về tỉ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ cho thấy, giống DX1 có tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ dao động từ 4,17% đến 26,92%, ở giống DX2 tỷ lệ này dao động từ 7,69% đến 55,56%. Trong khi đó ở giống đậu xanh DX3, tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ dao động từ 4,95% đến 27,9%.

Như vậy, trên cả ba giống đậu xanh nghiên cứu, khi sử dụng mật độ vi khuẩn  $OD_{600} = 1$  thì khả năng cảm ứng tạo rễ tơ là thấp nhất. Tương tự như ở

tỷ lệ tạo mô sẹo, hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ với cả 3 giống đậu tương nghiên cứu đều đạt cao ở mật độ vi khuẩn  $OD_{600}=0,3$  (từ 26,1% tới 55,56%).

Trong đó, giống DX2 cho khả năng cảm ứng tạo rễ tơ từ mô sẹo là cao nhất, đạt khoảng 55% ở công thức  $OD_{600} = 0,3$  (Hình 3.4).



**Hình 3.2.** Tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ từ mô sẹo sau 24 ngày lây nhiễm.

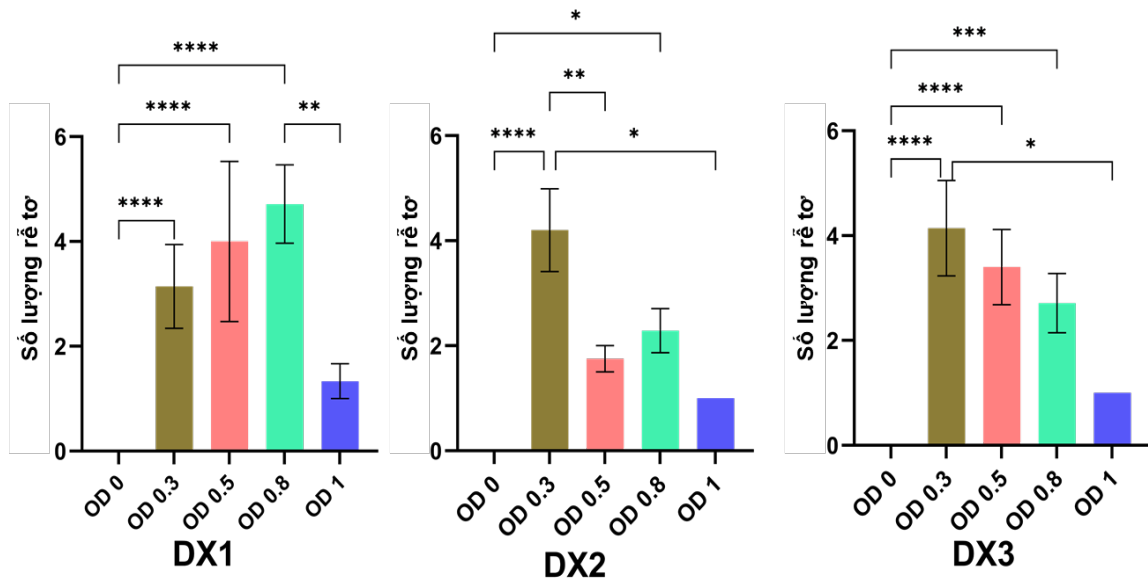
Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của ba lần lặp lại  $n > 30$ . Phân tích thống kê sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều ANOVA và phân tích hậu định đa phạm vi Tukey. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Cùng với đánh giá tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ, chúng tôi còn thu thập số liệu về số lượng rễ tơ trung bình trên một mẫu thí nghiệm. Kết quả được thể hiện ở hình 3.3 cho thấy, số lượng rễ tơ trung bình cao nhất trên một mẫu thí nghiệm ở ba giống đậu xanh không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, giữa các công thức với mật độ vi khuẩn khác nhau (0,3; 0,5 và 0,8) chúng tôi ghi nhận sự khác biệt đáng kể. Cụ thể ở giống đậu xanh DX1 số rễ tơ trung bình dao động từ 1,33 đến 4,71; ở giống DX2 từ 1,0 đến 4,2; giống DX3 từ 1,1 đến 4,14.



Kết quả nghiên cứu một lần nữa chỉ ra rằng, việc lây nhiễm với mật độ  $OD_{600} = 1$  cho số lượng rễ tơ trung bình thấp hơn đáng kể so với các công thức còn lại, chỉ đạt 1,0–1,33 rễ/mẫu.

Ngoài ra, dựa vào các kết quả thí nghiệm trên có thể thấy giống đậu xanh DX2 mang lại hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất, mật độ vi khuẩn khuẩn *R. rhizogenes* K599 phù hợp là  $OD_{600} = 0,3$ .



**Hình 3.3.** Số lượng rễ tơ trung bình trên mẫu thí nghiệm.

Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Phân tích thống kê sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều ANOVA và phân tích hậu định đa phạm vi Tukey. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.1.3. Hiệu quả chuyển gen và hoạt động của cấu trúc chuyển gen trên rễ tơ *in vitro* cây đậu xanh

Sau 24 ngày nuôi cấy cảm ứng, các mẫu rễ tơ tạo ra được nhuộm với X-Gluc để xác nhận sự có mặt của gen chuyển. Kết quả cho thấy, màu xanh đặc trưng xuất hiện ở các dòng rễ tơ tạo ra từ mảnh lá mầm của cả ba giống đậu xanh thử nghiệm (Hình 3.4 A-C).

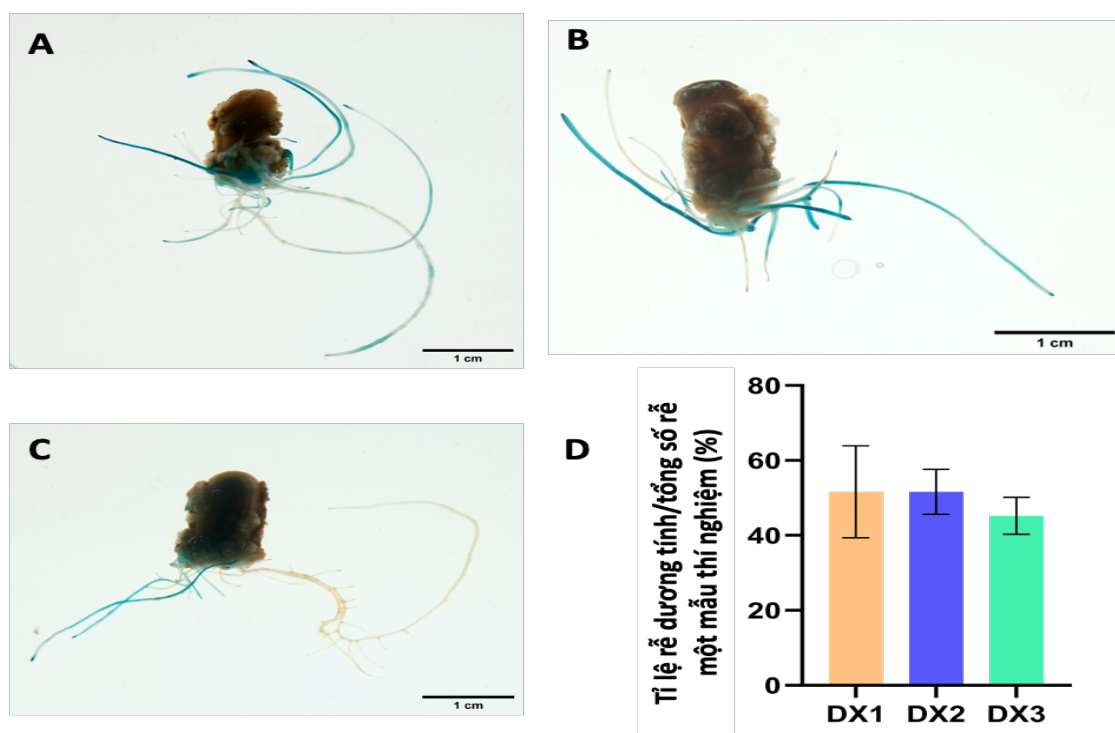
Tuy nhiên, không phải tất cả các rễ được tạo từ cùng một mảnh lá mầm đều là rễ chuyển gen. Kết quả thống kê cho thấy, tỷ lệ rễ tơ biểu hiện GUS dao

động từ 42,5–50% (Hình 3.4 D). Trong đó, tỷ lệ này ở giống DX1 là 47,05%, giống DX2 là 50% và giống DX3 là 42,5%.

Kết quả phân tích cũng cho thấy, tỷ lệ rễ tơ mang gen chuyển của các giống đậu xanh nghiên cứu không có sự sai khác thống kê.

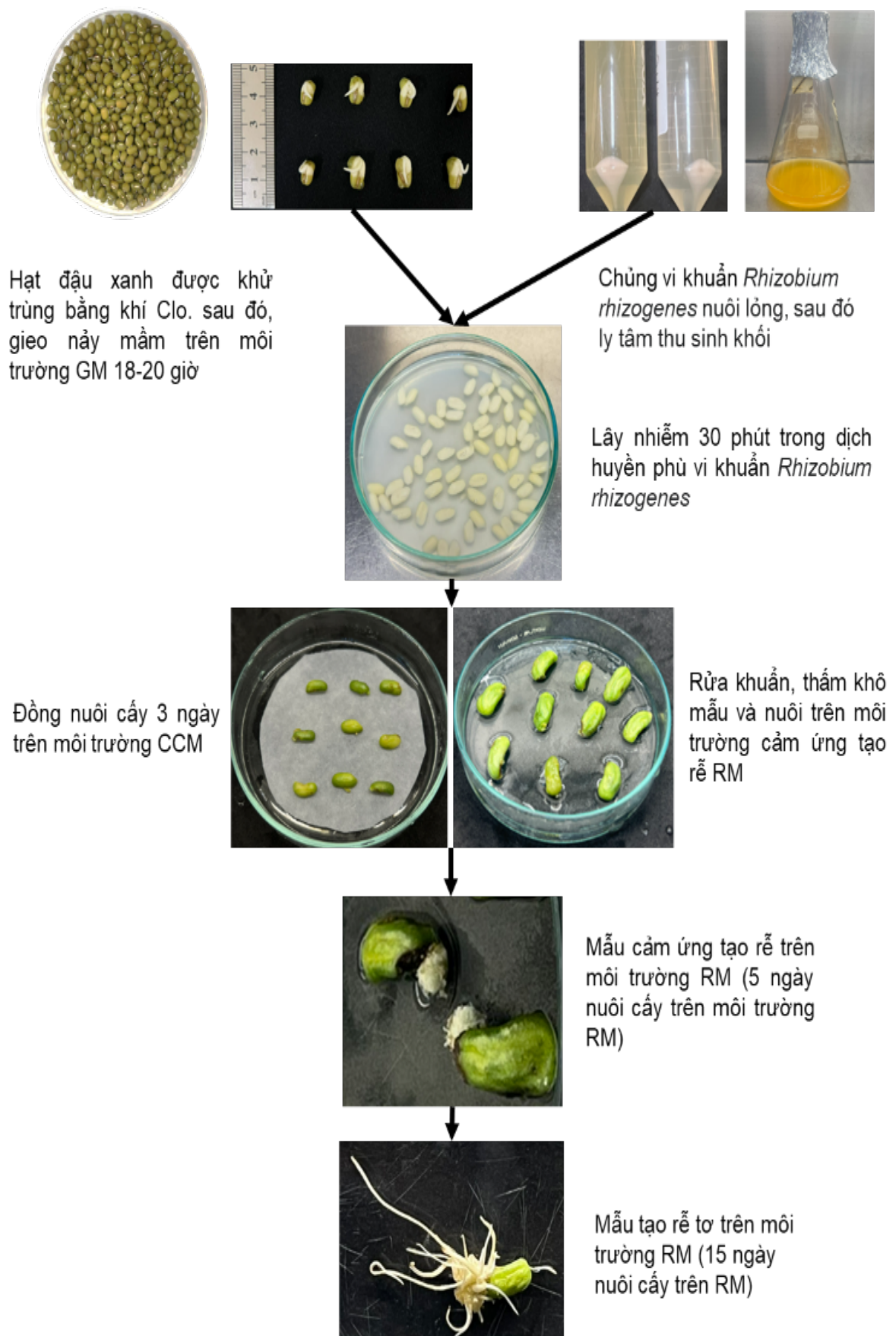
Như vậy, sự khác biệt về hiệu quả chuyển gen thông qua rễ tơ của 3 giống đậu xanh nghiên cứu chủ yếu đến từ sự chênh lệch về tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh rễ tơ.

Kết quả của chúng tôi cho thấy, trong 3 giống đậu xanh thử nghiệm, giống DX2 có hiệu quả chuyển gen thông qua rễ tơ cao nhất và sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo phục vụ đánh giá hiệu quả hoạt động của cấu trúc chuyển gen trên cây đậu xanh tại Việt Nam.



**Hình 3.4.** Kết quả xác nhận sự có mặt của gen chuyển ở các dòng rễ tơ.

(A-C) Sự biểu hiện của gen gus ở rễ tơ sau 24 ngày lây nhiễm lần lượt trên ba giống đậu xanh DX1, DX2 và DX3. (D) Tỷ lệ rễ tơ mang gen chỉ thị gus. Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Phân tích thống kê sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều ANOVA và phân tích hậu định đa phạm vi Tukey. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



**Hình 3.5.** Sơ đồ minh họa quy trình chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ in-vitro trên giống đậu xanh DX2 thông qua vi khuẩn *R. rhizogenes*.

Từ các kết quả nghiên cứu trên đây, chúng tôi thiết lập được các bước chính cụ thể dùng trong cảm ứng tạo rễ tơ và chuyển gen thông qua rễ tơ *in vitro* của giống đậu xanh Việt Nam thông qua vi khuẩn *R. rhizogenes* với các bước cơ bản được trình bày trong hình 3.5.

Mặc dù vậy, cần có thêm các nghiên cứu tiếp theo nhằm tối ưu và nâng cao hơn nữa hiệu quả chuyển gen của hệ thống này nhằm mở rộng khả năng ứng dụng cho các nghiên cứu cơ bản về chức năng gen trên cây đậu xanh.

### **3.2. Thiết lập hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ và chuyển gen thông qua rễ tơ *in vivo* trên cây đậu xanh.**

#### **3.2.1. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ *in vivo* của cây đậu xanh**

Mặc dù tiềm năng ứng dụng trong nuôi cấy sinh khối lớn và nghiên cứu chức năng gen của các dòng rễ tơ *in vitro* là rất rộng và phổ biến nhưng vẫn có hạn chế nhất định trong ứng dụng nghiên cứu tương tác giữa thực vật và vi sinh vật.

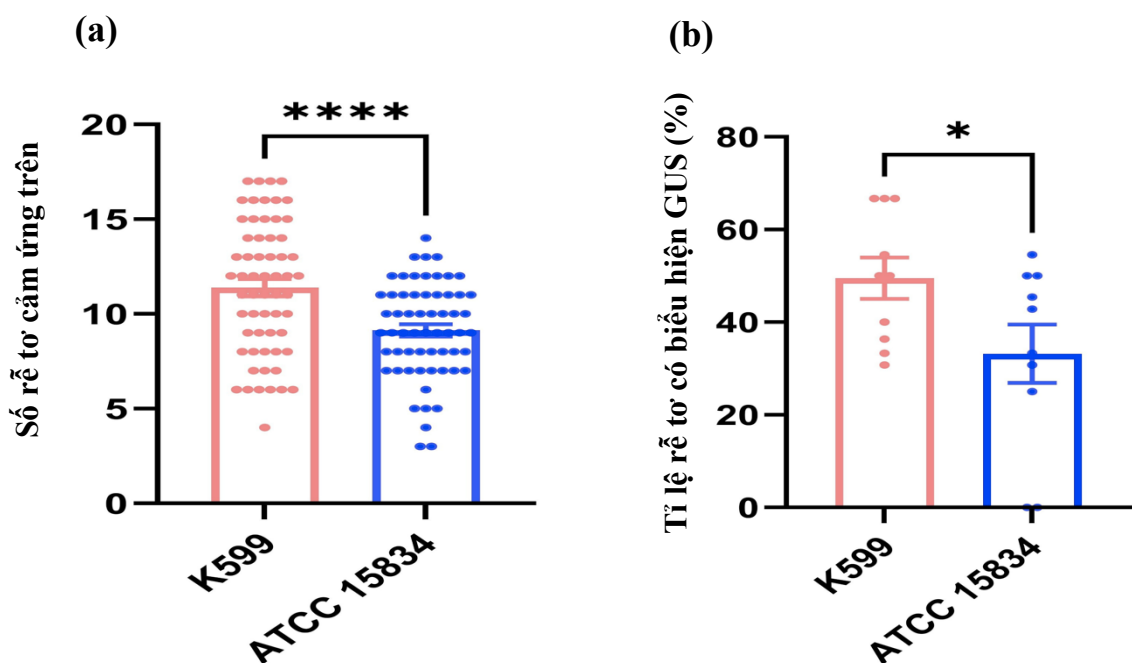
Như đã đề cập bên trên, cùng với hệ thống chuyển gen và cảm ứng tạo rễ tơ trong điều kiện *in vitro*, vi khuẩn *R. rhizogenes* cũng được ứng dụng thành công trong cảm ứng tạo rễ tơ trong điều kiện *in vivo* đối với nhiều đối tượng cây trồng. Tương tự như phương pháp *in vitro*, ảnh hưởng của chủng vi khuẩn, kiểu gen thực vật và tuổi của mẫu đến hiệu quả cảm ứng và biến nạp rễ tơ *in vivo* cũng được ghi nhận.

K599 là chủng *R. rhizogenes* duy nhất được sử dụng trong các thí nghiệm trước đây nhằm tối ưu hóa quá trình biến nạp rễ tơ *in vivo* của cây đậu tương [53, 75]. Trong khi đó, chủng ATCC 15834 cũng được chúng tôi sử dụng thành công trên các cây trồng khác như đu đủ, dưa chuột [51].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ tơ *in vivo* và tỷ lệ rễ tơ có biểu hiện GUS của 2 chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 và ATCC 15834 trên giống đậu xanh DX2, đây là giống có phản ứng tốt nhất trong điều kiện *in vitro*.

Kết quả thu được ở biểu đồ dưới đây (Hình 3.6) cho thấy, số lượng rễ tơ trung bình được tạo ra khi lây nhiễm với chủng *R. rhizogenes* K599 là 11,38, cao hơn hẳn với số lượng rễ được hình thành từ chủng ATCC 15834 9,13 (Hình 3.6 a).

Hơn thế, tỉ lệ rễ tơ chuyển gen có biểu hiện GUS - của chủng *R. rhizogenes* K599 cũng cao và đạt 49,5%. Tỉ lệ này cao hơn so với tỉ lệ rễ tơ chuyển gen thu được khi đậu xanh được nhiễm với chủng ATCC 15834, 33,2%,  $p < 0.05$  (Hình 3.6 b).



**Hình 3.6.** (a) Số rễ cảm ứng trên cây và (b) Tỉ lệ rễ tơ có biểu hiện GUS của 2 chủng vi khuẩn trên cây đậu xanh.

Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Phân tích thống kê sử dụng phương pháp phân tích Student t-test. \*  $p < 0.05$ ;  $n = 10$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ,  $n = 60$ .

Như vậy, hai chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 và ATCC 15834 đều có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ in vivo trên giống đậu xanh. Tuy nhiên, chúng tôi ghi nhận sự khác biệt lớn không chỉ về tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ và số lượng rễ tơ thu được trên mỗi mẫu lây nhiễm. Chủng ATCC 15834 thường phù hợp với cây thân gỗ, tuy nhiên với cây thân thảo chủng vi khuẩn này cho hiệu quả

kém hơn. Điều này chúng tôi cũng ghi nhận trên cây dưa chuột trong nghiên cứu trước đây [51].

Như vậy, chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 thể hiện sự phù hợp hơn cho chuyển gen và cảm ứng tạo rễ *in-vivo* trên giống đậu xanh DX2 thể hiện qua số lượng rễ tơ và tỷ lệ rễ tơ chuyển gen cao hơn chủng ATCC 15834. Trong các thí nghiệm tiếp theo về cảm ứng tạo rễ *in vivo* trên cây đậu xanh, chúng tôi sẽ lựa chọn chủng khuẩn K599 để tiến hành lây nhiễm.

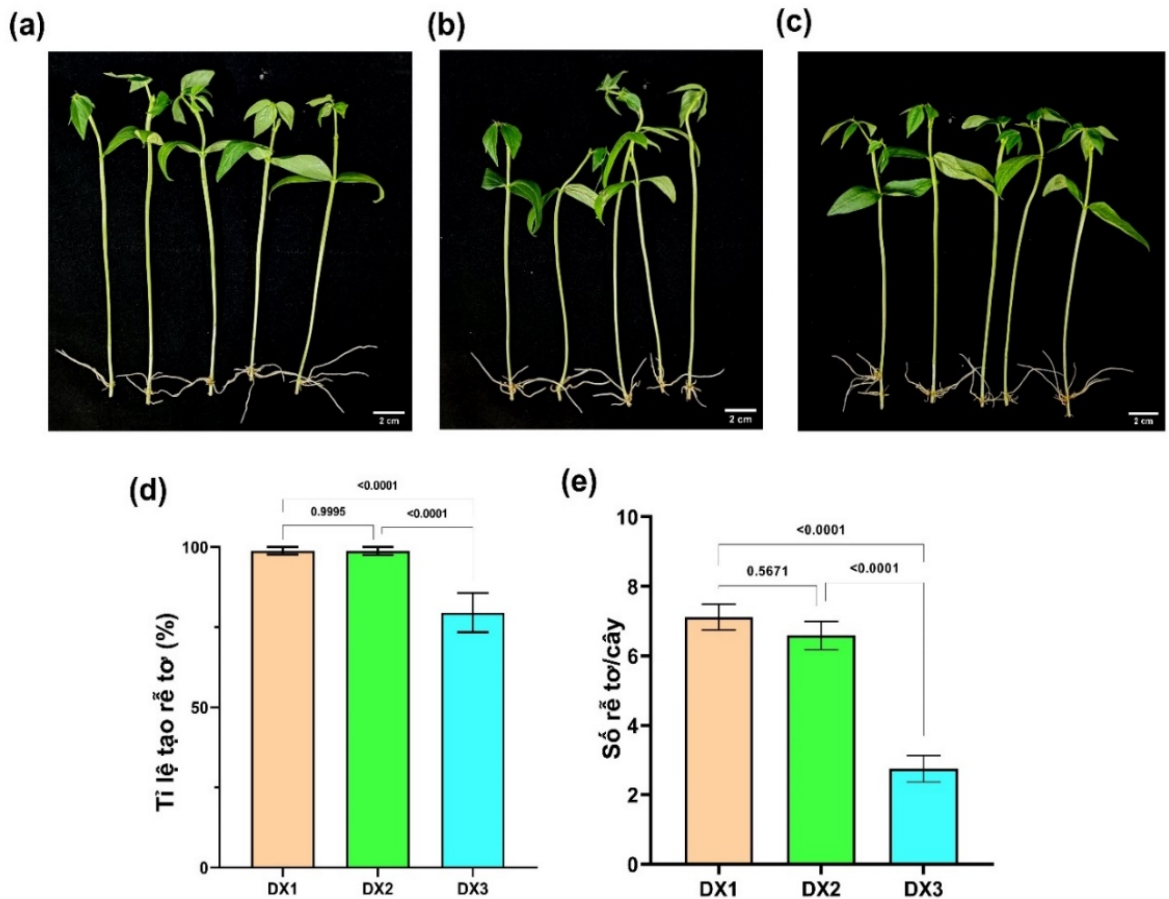
### **3.2.2. Đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ *in vivo* của các giống đậu xanh**

Một số nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng không có sự khác biệt về tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ giữa các giống khác nhau của cùng một loài [76, 77, 78]. Nhưng bên cạnh đó, cũng có một số nghiên cứu khác chỉ ra mối liên hệ giữa kiểu gen với hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ thông qua *R. rhizogenes* [79, 80, 81].

Trong kết quả nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng tạo rễ *in vitro* bên trên, chúng tôi nhận thấy yếu tố giống có ảnh hưởng đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ của đậu xanh. Do vậy trong nội dung nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của 3 giống đậu xanh Việt Nam là DX1, DX2, DX3 đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ trong điều kiện *in vivo*.

Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 có khả năng kích thích tạo rễ tơ trong điều kiện *in vivo* trên cả 3 giống đậu xanh Việt Nam với tỷ lệ cao từ 79,55% - 98,85% (Hình 3.7 a-d). Cụ thể, mô sẹo và rễ tơ xuất hiện tại vị trí tiêm nhiễm khuẩn rất sớm, ở ngày thứ 12.

Kết quả quan sát sau 18 ngày lây nhiễm cho thấy khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên các giống đậu xanh DX1 và DX2 cao hơn (98,75 và 98,85%) so với giống đậu xanh DX3 (79,55%). Không chỉ ghi nhận tỷ lệ tạo rễ tơ *in vivo* cao hơn ở hai giống đậu xanh DX1 và DX2, số lượng rễ tơ trung bình của hai giống đậu xanh này cũng cao hơn (6,59 và 7,11 rễ/cây) so với giống đậu xanh DX3 (2,75 rễ/cây) (Hình 3.7).



**Hình 3.7.** *Rhizobium rhizogenes* K599 kích thích khả năng tạo rễ *in vivo* trên 3 giống đậu xanh Việt Nam.

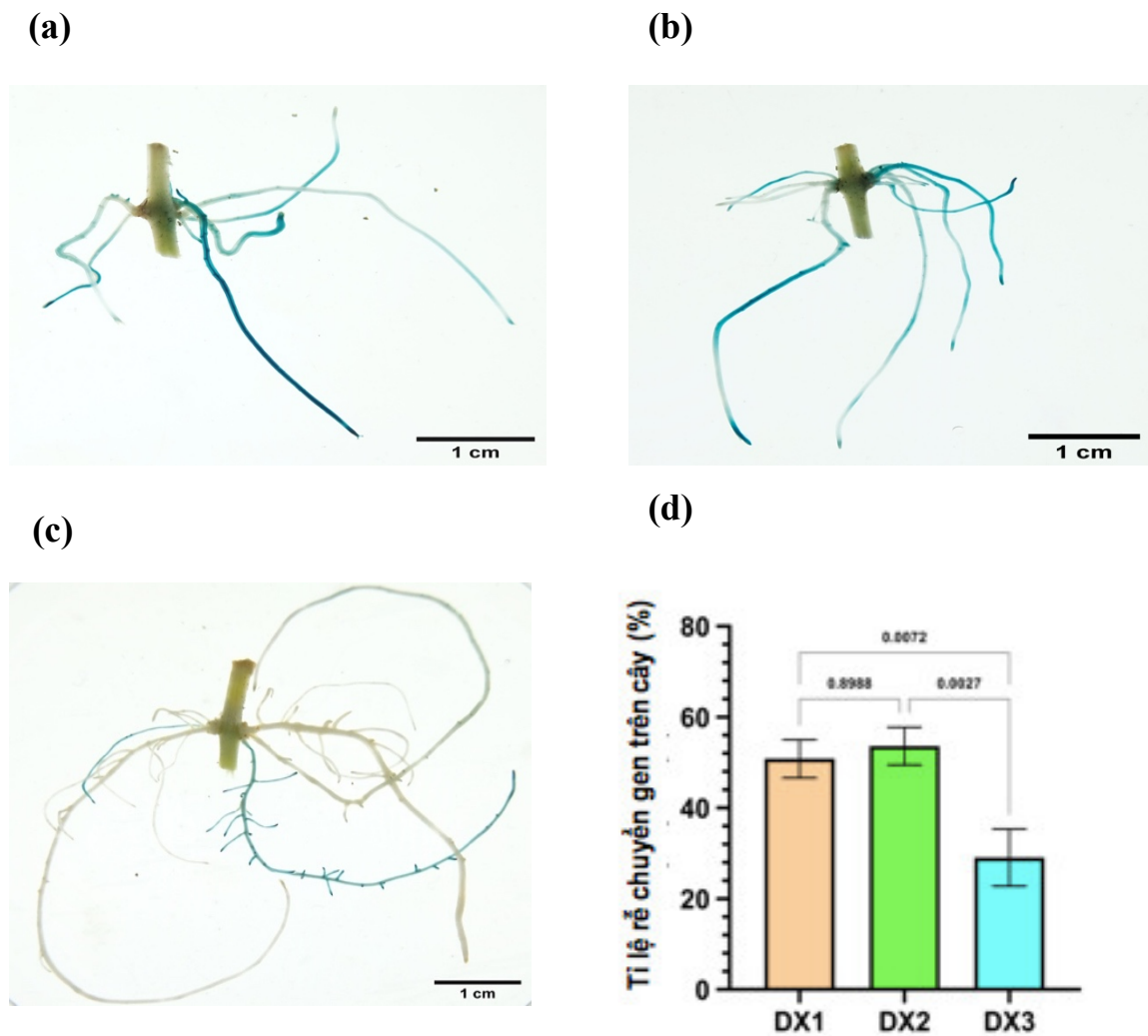
Rễ tơ hình thành trên các giống đậu xanh DX1 (a), DX2 (b) và DX3 (c) sau 18 ngày chuyển vi khuẩn. Tỉ lệ tạo rễ tơ (d) và số lượng rễ tơ hình thành trên cây (e) được quan sát sau 18 ngày chủng vi khuẩn. Biểu đồ thể hiện số liệu trung bình của từng giống đậu xanh với  $\pm$  SEM,  $n > 44$ . Số liệu được phân tích bằng one-way ANOVA và xử lý với Tukey's multiple range test. Giá trị p được thể hiện trên biểu đồ.

### 3.2.3. Kiểm tra sự có mặt và hoạt động của gen chuyển trên rễ tơ *in vivo* cây đậu xanh

Tương tự như nghiên cứu với hệ thống rễ tơ *in vitro*, các đoạn thân có chứa mô sẹo và rễ tơ *in vivo* sẽ được tách và ngâm trong dung dịch X-Gluc [9].

Kết quả phân tích ghi nhận các dòng rễ tơ *in vivo* có biểu hiện màu GUS đặc trưng (Hình 3.8 a-c). Tỷ lệ rễ tơ *in vivo* có biểu hiện GUS thấp nhất ở giống DX3 (29,08%) và cao nhất ở giống DX2 (53,61%).

Mặc dù vậy, tỷ lệ này không có sự khác biệt thống kê giữa hai giống đậu xanh DX1 và DX2 (Hình 3.8 d). Như vậy, ở điều kiện *in vivo*, yếu tố giống đậu xanh không chỉ ảnh hưởng tới tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ mà còn cho thấy sự khác biệt về hiệu quả chuyển gen thông qua rễ tơ.

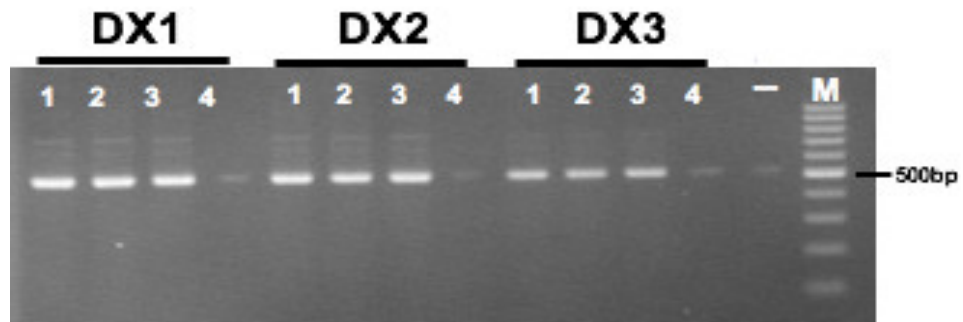


**Hình 3.8.** Biểu hiện gen chỉ thị GUS trên rễ tơ đậu xanh.

(a) Rễ tơ nhuộm GUS các giống đậu xanh DX1, (b) DX2 và (c) DX3 sau chuyển *R. rhizogenes* K599 mang pZY102, (d) Tỷ lệ tạo rễ tơ mang gen chỉ thị GUS được quan sát sau 18 ngày chuyển vi khuẩn. Biểu đồ thể hiện số liệu trung bình của từng giống đậu xanh với  $\pm$  SEM,  $n > 15$ . Số liệu được phân tích bằng one-way ANOVA và xử lý với Tukey's multiple range test. Giá trị p được thể hiện trên biểu đồ.



Để xác định xem các rễ tơ được tạo ra là rễ chuyển gen hay không, bên cạnh việc nhuộm GUS, chúng tôi cũng tiến hành phân tích khuếch đại gen đối với mỗi dòng rễ tơ riêng biệt. Kết quả PCR ngẫu nhiên hoàn toàn phù hợp với kết quả nhuộm GUS, khẳng định rằng các dòng rễ tơ là rễ tơ mang gen chuyển *gus*.



**Hình 3.9.** Sản phẩm PCR cho gen GUS từ các rễ tơ thu được từ các cây chuyển gen.

1-3: rễ tơ chuyển gen, 4: DNA từ rễ không chuyển gen, -: đối chứng âm.

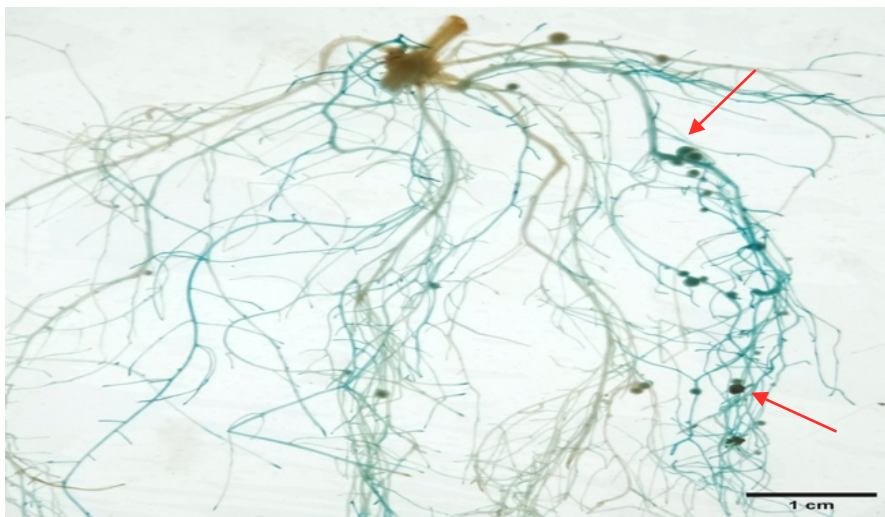
Như vậy các kết quả thu được cho thấy, giống đậu xanh DX2 là giống có hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ và chuyển gen thông qua rễ tơ cao nhất trong ba giống thử nghiệm. Tương tự như phương pháp *in vitro*, ảnh hưởng của chủng vi khuẩn, kiểu gen thực vật và tuổi của mẫu đến hiệu quả cảm ứng và biến nạp rễ tơ *in vivo* cũng rất đáng kể. K599 là chủng *R. rhizogenes* duy nhất được sử dụng trong các thí nghiệm trước đây nhằm tối ưu hóa quá trình biến nạp rễ tơ *in vivo* của cây đậu tương [53, 75].

#### **3.2.4. Đánh giá khả năng tương tác cộng sinh với vi khuẩn nốt sần của rễ tơ *in vivo* ở cây đậu xanh**

Hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ và chuyển gen thông qua rễ tơ trong điều kiện *in vivo* đã được phát triển và ứng dụng thành công trên nhiều đối tượng cây trồng. Trên đậu tương, hệ thống chuyển gen thông qua rễ tơ *in vivo* đã được ứng dụng trong nghiên cứu tương tác với vi khuẩn nốt sần. Nghiên cứu trên cây lạc sử dụng hệ thống cảm ứng rễ tơ *in vivo* đã được thực hiện thành công để tạo ra các dòng rễ tơ chuyển gen *AdEXLB8* kháng tuyến trùng *Meloidogyne arenaria* [82].

Đậu xanh, thuộc các cây họ đậu, được chứng minh là có khả năng cộng sinh với *rhizobia*. Để đánh giá khả năng cộng sinh với vi khuẩn của rễ tơ *in vivo* ở cây đậu xanh, chúng tôi tiến hành lây nhiễm với vi khuẩn tạo nốt sần *B. japonicum* USDA110. Tiếp đó, các dòng rễ tơ chuyển gen được đưa xuống giá thể thích hợp để phát triển và khảo sát khả năng tương tác của rễ tơ đậu xanh với chủng vi khuẩn cố định đạm.

Sau 25 ngày lây nhiễm vi khuẩn, các cây mang rễ tơ được nhổ lên, nhuộm GUS và quan sát. Kết quả nghiên cứu ghi nhận việc hình thành nốt sần (kết quả của tương tác giữa vi khuẩn *B. japonicum*) trên các dòng rễ tơ (Hình 3.10). Đặc biệt, chúng tôi ghi nhận nốt sần có biểu hiện GUS từ các dòng rễ tơ có màu xanh đặc trưng.

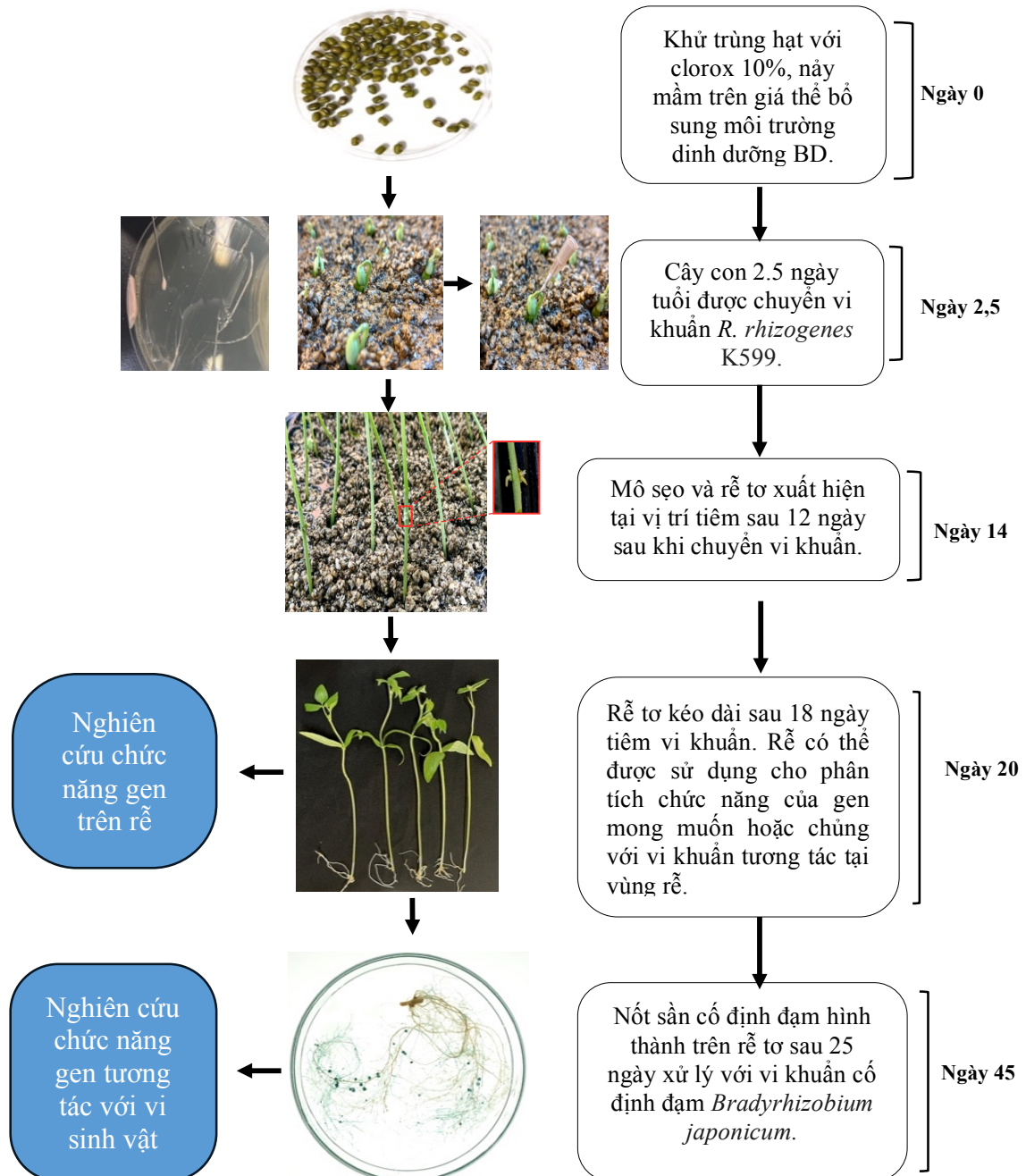


**Hình 3.10.** Rễ mang nốt sần biểu biểu hiện GUS sau 25 ngày xử lý với vi khuẩn tạo nốt sần, *B. japonicum* USDA110. Mũi tên đỏ chỉ các vị trí nốt sần hình thành trên rễ tơ.

Như vậy, các rễ tơ *in vivo* trên cây đậu xanh đều có khả năng tương tác và lây nhiễm bởi vi khuẩn *B. japonicum* để hình thành các đơn vị cố định đạm (nốt sần). Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng của hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ và chuyển gen thông qua rễ tơ *in vivo* trên cây đậu xanh trong nghiên cứu tiếp theo về tương tác với vi sinh vật cũng như các nghiên cứu cơ bản về chức năng gen.

### 3.2.5. Mô tả quy trình chuyển gen thông qua rễ tơ *in vivo* trên giống đậu xanh Việt Nam

Với kết quả nêu trên, chúng tôi đưa ra phương pháp chuyển gen cảm ứng rễ tơ *in vivo* cho một số giống đậu xanh Việt Nam thể hiện trên hình 3.11 với các bước chi tiết như sau:



**Hình 3.11.** Quy trình tạo rễ tơ *in vivo* trên đậu xanh sử dụng vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 trên giống đậu xanh Việt Nam.

### **Bước 1: Chuẩn bị cây mầm đậu xanh**

Hạt đậu xanh được lựa chọn cẩn thận, loại bỏ các hạt kém chất lượng sau đó được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, tiếp theo khử trùng bằng Javen 20% trong 10 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Hạt sau khi khử trùng sẽ được nảy mầm trên giá thể đã khử trùng chứa perlite : vermiculite với tỉ lệ 1:1 được tưới với dung dịch dinh dưỡng BD (thành phần có trong phụ lục 1) được bổ sung 1mM KNO<sub>3</sub> và nuôi trong buồng sinh trưởng với nhiệt độ 27°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ.

***Yêu cầu về kết quả đạt được:*** Các cây mầm đậu xanh to mập, không có hiện tượng biến dạng, chưa mở lá chết (lá thật đầu tiên), có chiều cao đồng đều.

### **Bước 2: Chuẩn bị đĩa khuẩn phục vụ cho biến nạp**

Chủng vi khuẩn K599 (chủng hoang dại hoặc chủng có mang vector chuyển gen ví dụ pZY102 (Addgene Cat: 73933) được ria trên môi trường LB bổ sung kháng sinh phù hợp.

Sau 2 ngày nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn, một khuẩn lạc đơn được lấy ra và hòa trong 1 ml môi trường LB lỏng, sau đó nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 2 giờ.

200 µl dịch huyền phù khuẩn đồng nhất này được cấy trải trên các môi trường LB có bổ sung kháng sinh phù hợp và nuôi qua đêm trong điều kiện tối hoàn toàn ở 28°C.

***Yêu cầu về kết quả đạt được:*** Khuẩn sinh trưởng đồng nhất trên toàn bộ bề mặt môi trường.

### **Bước 3: Biến nạp khuẩn vào cây mầm đậu xanh**

Sinh khối vi khuẩn được lấy bằng mũi tiêm và đâm trực tiếp vào thân mầm đậu xanh phía dưới nốt lá mầm.

Mũi tiêm đâm xuyên qua chính giữa thân mầm và dịch khuẩn được đưa đồng đều ở cả hai phía của vị trí tiêm.

***Yêu cầu về kết quả đạt được:*** Vị trí tiêm nằm gần nốt lá mầm, đường tiêm là duy nhất để tránh gây tổn thương đến sinh trưởng của cây. Vết tiêm không bị nát, quan sát được dịch khuẩn động trên vị trí tiêm.

**Bước 4: Nuôi cây đậu xanh sau biến nạp và đánh giá khả năng sinh rễ tơ**

Các khay cây đậu xanh mầm sau biến nạp được chụp kín bằng nắp trong suốt và được tưới ẩm ban đầu bằng nước.

Trong các ngày tiếp theo, không gian trong lồng kín được duy trì ẩm cao bằng cách phun sương trên nắp đậy. Các cây biến nạp được đặt trong cùng điều kiện với bước chuẩn bị cây mầm.

Khả năng sinh rễ tơ của các cấu trúc chuyển gen được quan sát và đếm số rễ sinh ra bằng mắt thường.

***Yêu cầu về kết quả đạt được:*** Các cây đậu xanh chuyển gen sinh trưởng bình thường, không gian trong túi chứa luôn phải được duy trì độ ẩm cao. Các rễ tơ sinh ra tại vị trí biến nạp có màu trắng.

**Bước 5: Tiến hành nghiên cứu chức năng gen trên rễ tơ**

Khi các rễ tơ đạt chiều dài khoảng 5-10 cm, một số hoặc toàn bộ rễ tơ có thể được cắt để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo như nghiên cứu hiệu quả của hệ thống CRISPR, biểu hiện gen, ...

Ngoài ra, để nghiên cứu tương tác vi sinh vật, phần rễ sơ cấp của các cây đậu xanh được loại bỏ bằng cách cắt vào thân phía dưới vị trí tạo rễ tơ. Phần ngọn cùng với rễ tơ được chuyển sang giá thể mới (thành phần giống với giá thể sử dụng trong bước 1).

Sau 4 ngày, cây mới được ủ với vi khuẩn để nghiên cứu tương tác vi sinh vật.

***Yêu cầu về kết quả đạt được:*** Cây đậu xanh với rễ tơ chuyển gen tiếp tục sinh trưởng bình thường trên khay nuôi, các rễ tơ được đưa xuống giá thể tiếp tục phát triển và phân nhánh.

Phương pháp chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ *in vivo* được thiết lập trên các đậu xanh Việt Nam có ưu điểm đơn giản, nhanh chóng, không tốn nhiều

vật liệu và trang thiết bị. Chúng tôi tiến hành áp dụng quy trình này thêm nhiều lần với giống đậu xanh DX2 và kết quả thu được tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ dao động từ trên 80% đến 100%.

Điều này cho thấy, tính ổn định và hiệu quả của hệ thống này, đồng thời mở ra tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu chức năng gen và tương tác vi sinh vật.

## CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Đã xây dựng được quy trình cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* và chuyển gen thông qua rễ tơ *in vitro* trên 3 giống đậu xanh của Việt Nam. Trong đó, hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất ở giống đậu xanh DX2 khi được lây nhiễm với vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 tại mật độ  $OD_{600} = 0,3$ . Hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* trên đậu xanh đã được ứng dụng thành công trong đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen với tỷ lệ rễ tơ có biểu hiện gen chỉ thị GUS đạt từ 42,5 tới 50%.

2. Đã xây dựng được quy trình cảm ứng tạo rễ tơ *in vivo* và đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen trên rễ tơ *in vivo* cây đậu xanh.

- Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả hai chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 và ATCC 15834 đều có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ *in vivo*, trong đó chủng K599 cho hiệu quả tốt hơn. Ngoài ra, trong các giống đậu xanh dùng cho nghiên cứu này, giống DX2 mang lại hiệu quả chuyển gen cao nhất.

- Các rễ tơ *in vivo* chuyển gen có khả năng tương tác và lây nhiễm bởi vi khuẩn *B. japonicum* để hình thành nốt sần.

### KIẾN NGHỊ

Tiếp tục tối ưu và thử nghiệm các hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ và chuyển gen thông qua rễ tơ *in vitro* và *in vivo* trên các giống đậu xanh khác của Việt Nam. Phát triển và ứng dụng hệ thống này trong các nghiên cứu tiếp theo về đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen, chỉnh sửa gen cũng như nghiên cứu chức năng gen và cải tạo giống đậu xanh.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

*Vietnam Journal of Biotechnology* **21**(2): 375-384, 2023

**“HIGHLY EFFICIENT *RHIZOBIUM RHIZOGENES*-MEDIATED HAIRY ROOT TRANSFORMATION FOR GENE FUNCTIONAL STUDY IN MUNGBEAN (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)”**

**Cuong Xuan Nguyen<sup>1,2</sup>, Loan Thi Tran<sup>2,3</sup>, Linh Khanh Chu<sup>1</sup>, Dong Thi Ta<sup>1,2</sup>, Thao Thi Phuong Bui<sup>1,4</sup>, Phat Tien Do<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup> *Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam*

<sup>3</sup> *Lao Cai High School for Gifted Students, Phan Ke Binh Street, Bac Cuong, Lao Cai City, Lao Cai, Vietnam*

<sup>4</sup> *University of Science and Technology of Hanoi*



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Cường, 2009, *Kỹ thuật trồng đậu xanh*, NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ, Hà Nội.
2. Nguyễn Đăng Khôi, 1997, Các cây đậu ăn hạt ở Việt Nam, *Tạp chí Sinh học*, 2), 5 – 6.
3. B.M. Khalikov, F.B. Namozov, S.T. Negmatova, SH.E. Ekhmedov, *Mung bean*, 2020, Novateur Publication, 1-25.
4. Nguyễn Thanh Tuấn, 2018, *Đánh giá sinh trưởng phát triển và năng suất của một số dòng đậu xanh nhập nội tại Gia Lâm, Hà Nội*, 27-32.
5. Trần Đình Long, Lê Khả Trường, 1998, *Cây đậu xanh*, NXB NN.
6. Oplinger, E. S., Hardman, L.L., Kaminski, A.R., et al., 1990, *Mungbean, In Alternative feed crop manual*, University of Wisconsin.
7. Sefa-Dedeh, S., & Stanley, D. W. (1979), *The relationship of microstructure of cowpeas to water absorption and dehuling properties*, *Cereal Chemistry*, 56(4), 379-386.
8. Đường Hồng Dật, 2006, *Cây đậu xanh, kỹ thuật thâm canh và biện pháp tăng năng suất, chất lượng sản phẩm*, NXB Lao Động – Xã Hội, 5 - 31.
9. Kết quả nghiên cứu khoa học đậu đỗ 1991 - 1995, 1996, Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp, Việt Nam, 4 - 188.
10. Trần Văn Lại, Trần Nghĩa, Ngô Quang Thăng, Lê Trần Trung, Ngô Đức Dương, 1993, *Kỹ thuật gieo trồng đậu lạc vừng*, NXB NN.
11. Phạm Văn Thiều, 1997, *Cây đậu xanh, kỹ thuật trồng và chế biến sản phẩm*, NXB Nông nghiệp.
12. Adsule, R. N., Kadam, S. S., Salunkhe, D. K., et al, 1986, *Chemistry and technology of green gram (Vigna radiata [L]. Wilczek)*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25(1), 73-105.
13. Mazumdar, D., Saikat, D., et al., 2016, *Utilization of pulses – Value addition and product development, In pulses for sustainable food and nutrition security in SAARC region*, 65-97.

14. Hou D., Yousaf L., Xue Y., Hu J., Wu J., Hu X., Feng N., Shen Q., 2019, *Mung bean (Vigna Radiata L.); Bioactive Polyphenols, Polysaccharides, Peptides, and Health Benefits, Nutrients*, MDPI AG.
15. Nguyễn Thị Luyện, 2009, *Phát triển hệ thống tái sinh ở cây đậu xanh (Vigna Radiata (L.) Wilczek) phục vụ chọn dòng chịu hạn và chuyển Gen*, Luận căn thạc sĩ Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.
16. Ministry of Agriculture and Farmers Welfare, 2018, *Pulses revolution from food to nutritional security-success report*, from <https://www.farmer.gov.in/SucessReport2018-19.pdf>.
17. Misiak K., Gorna B., Krol E., et al., 2017, *Yield and quality of mung bean (Vigna radiata (L) Wilczek) seeds produced in Poland, Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Horticulture*, 74(2), 149.
18. Riker AJ, Banfield WM, Wright WH, Keitt GW, 1930, *Studies on infectious hairy root of nursery apple trees*, 507-540.
19. Conn HJ, 1942, *Validity of the genus Alcaligenes*, *J Bacteriol*, 343-360.
20. Meyer A, Temple J, Constantino P, 2000, *Hairy root: a molecular overview functional analysis of Agrobacterium rhizogenes T-DNA genes*, In Stacey G, Keen N (eds) *Plant-microbe interactionz*, 93-139.
21. Citovsky V, Zupan J, Warnick D, Zambryski P, 1992, *Nuclear localization of Agrobacterium VirE2 protein in plant cells*, 1802-1805.
22. Giri CC, Giri A, 2007, *Plant biotechnology, Practical Manual I* International Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi, 69-76.
23. Murugesan S, Manoharan C, Vijayakumar E, Panneerselvam A, 2010, *Isolation and characterization of Agrobacterium rhizogenes from the root nodules of some leguminous*, 1(3), 92-96.
24. Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Shahid AA, Husnain T,

- Riazuddin S, 2009, *The myth of plant transformation*, 753-763.
25. Ozyigit II, 2012, *Agrobacterium tumefaciens and its use in plant biotechnology*, 317-361.
  26. Filetici P, spano L, Costantino P, 1987, *Conserved regions in the T-DNA of different Agrobacterium rhizogenes root inducing plasmid*, 19-26.
  27. Ream W (2002) *Agrobacterium genetics*. In: Streips UN, Yasbin RE (eds) *Modern Microbial Genetics*, 323-348.
  28. Binns AN, Costantino P, 1998, *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*, 251-266.
  29. Weller SA, Stead DE, 2002, *Detection of root mat associated Agrobacterium strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR*, 118-126.
  30. Weller SA, Stead DE, Young JPW, 2005, *Induction of root-mat symptoms on cucumber plants by Rhizobium, but not by Ochrobactrum or Sinorhizobium, harbouring a cucumopine Ri plasmid*, 799-805.
  31. Guillon S, Trémouillaux- Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantent P, 2006, *Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era*, 24(9), 403-409.
  32. Veena, V., & Taylor, C. G., 2007, *Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications*, 43, 383-403.
  33. Slightom JL, Durand-Tardif M, Jouanin L, Tepfer D, 1986, *Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of Agrobacterium rhizogenes agropine type plasmid*, 108-121.
  34. Hansen G, Das A, Chilton MD, 1994, *Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by Agrobacterium*, 7603- 7607.
  35. White FF, Ghidossi G, Gordon MP, Nester EW, 1982, *Tumor induction by Agrobacterium rhizogenes involves the transfer of plasmid*

- DNA to the plant genome*, 3193-3197.
36. Petit A, David C, Dahl G, Ellis JG, Guyon P, Casse-Delbart FC, Tempe J, 1983, *Further extension of the opine concept: plasmids in Agrobacterium rhizogenes cooperate for opine degradation*, 204-214.
  37. Filetic P, Spano L, Costantino P, 1987, *Conserved regions in the T-DNA of different, Agrobacterium rhizogenes root inducing plasmid.*, 19-26.
  38. David C, Chilton MD, Tempe J, 1984, *Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures*, 73-76.
  39. Isogai A, Fukuchi N, Hayashi M, Kamada H, Harada H, Suzuki A, 1988, *Structure of a new opine, mikimopine, in hairy root induced by Agrobacterium rhizogenes*, 3235-3237.
  40. Porter J, 1991, *Host range and implications of plant infection by Agrobacterium rhizogenes*, 107-121.
  41. Chandra S, 2012, *Natural plant genetic engineer Agrobacterium rhizogenes: role of T-DNA in plant secondary metabolism*, 407-415.
  42. Ackermann C, 1977, *Pflanzen aus Agrobacterium rhizogenes tumoren and Nicotiana tabacum*, 23-30.
  43. Tepfer D, 1983, *The potential uses of Agrobacterium rhizogenes in the genetic engineering of higher plants: nature got there first*, 153-164.
  44. Kumar V, Sharma A, Prasad BCN, Gururaj HB, Ravishankar GA, 2006, *Agrobacterium rhizo-genes mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultra-sonication and acetosyringone treatment*, 349-357.
  45. Yadav NS, Van Der Leyden J, Bennett DR, Barnes WM, Chilton MD, 1982, *Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid*, 6322-6326.
  46. Guyon P, Chilton M-D, Petit A, Tempe J, 1980, *Agropine in "null type" crown gall tumors: evidence for generality of the opine concept*,

- 2693-2697.
47. Guyon P, Petit A, Tempe J, Dessau Y, 1993, *Transformed plants producing opines specifically promote growth of opine-degrading agrobacteria*, 92-98.
  48. Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Shkryl YN, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN, 2004, *The rolB and rolC genes activate synthesis of anthraquinones in Rubia cordifolia cells by mechanism independent of octadecanoid signaling pathway*, 1069-1075.
  49. Vilaine F, Charbonnier C, Casse-Delbart F, 1987, *Further insight concerning the TL- region of the Ri plasmid of Agrobacterium rhizogenes strain A4: transfer of a 1.9 kb fragment is sufficient to induce transformed roots on tobacco leaf fragments*, 111-115.
  50. Georgiev MI, Agostini E, Ludwig-Müller J, and Xu J, 2012, *Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource*, 528-537.
  51. Nguyen, C. X., Dohnalkova, A., Hancock, C. N., Kirk, K. R., Stacey, G., & Stacey, M. G., 2021, *Critical role for uricase and xanthine dehydrogenase in soybean nitrogen fixation and nodule development*, 103 - 159.
  52. Hu ZB, Du M., 2006, *Hairy root and its application in plant genetic engineering*, J Inter Plant Biol, 48, 121-127.
  53. Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, Nguyen CDT, Nontachaiyapoom S, Kinkema M, & Gresshoff PM, 2007, *Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean to study root biology*, 2, 948-952.
  54. Lee S, Blackhall NW, Power JB, Cocking EC, Tepfer D, Davey MR, 2001, *Genetic and morphological transformation of rice with the rolA gene from the Ri TL – DNA of Agrobacterium rhizogenes*, 917-925.
  55. Bulgakov VP, 2008, *Functions of rol genes in plant secondary metabolism*, 318-324.

56. Hussain M.J., Abbas Y., Nazli N., Fatima S., Drouet S., Hano C. & Abbasi B.H., 2022, *Root cultures, a boon for the production of valuable compounds: A comparative review*, *Plants*, 11, 439.
57. Khanam M.N., Anis M., Javed S.B., Mottaghipisheh J. & Csupor D., 2022, *Adventitious root culture an alternative strategy for secondary metabolite production.*, 12, 1178.
58. Alamillo, Josefa M., et al, 2003, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein and hairy roots: a perfect match for gene functional analysis and crop improvement*, 79, 102-176.
59. Hwang TY, Nakamoto Y, Kono I, Enoki H, Funatsuki H, Kitamura K, Ishimoto M, 2008, *Genetic diversity of cultivated and wild soybeans including Japanese elite cultivars as revealed by length polymorphism of SSR markers*, 315-323.
60. Hinchey MAW, 1988, *Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer*, *Nat Biotech*, 6(8), 915-922.
61. Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE, 1999, *The use of glufosinate as a selective agent in Agrobacterium-mediated transformation of soybean*, 56(1), 37-46.
62. Olhoft PO, Somers DS, 2001, *L-Cysteine increases Agrobacterium-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells*, 20(8): 706-711.
63. Paz MM, Shou HX, Guo ZB, Zhang ZY, Banerjerr AK, Wang K, 2004, *Assessment of conditions affecting Agrobacterium-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant*, 136(2), 167-179.
64. Paz M, Martinez J, Kalvig A, Fonger T, Wang K, 2006, *Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean*

- transformation*, 25, 206-223.
65. Podevin N, Davies HV, Hartung F, Nogue F, Cassacuberta JM, 2013, *Sitedirected nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant*, 16(2), 140-162.
  66. Korotkova AM, 2019, *Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system*, 631(527), 224-234.
  67. Cai Y, Chen L, Liu X, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W, 2015, *CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots*, 10(8), 59-102.
  68. Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA, 2015, *Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9*, *BMC Biotechnol*, 131-152.
  69. Kanazashi Y, Hirose A, Takahashi I, Mikami M, Endo M, Hirose S, Toki S, Kaga A, Naito K, Ishimoto M, Abe J, Yamada T, 2018, *Simultaneous site- directed mitagenesis of duplicated loci in soybean using a single guide RNA*, 553-563.
  70. Do, P. T., Nguyen, C. X., Bui, H. T., Tran, L. T., Stacey, G., Gillman, J. D., ... & Stacey, M. G., 2019, *Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes to yield a high oleic, low linoleic and  $\alpha$ -linolenic acid phenotype in soybean*, 19, 1-14.
  71. Lê Thị Như Thảo, Nguyễn Hồng Nhung, Lê Quang Huy, Bùi Phương Thảo, Lê Thu Ngọc, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát, 2020, *Phát triển hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ in vitro trên một số giống đậu tương phục vụ nghiên cứu biểu hiện gen và chỉnh sửa hệ gen*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 19(3), 459-470.
  72. Nguyễn Hồng Nhung, Lê Quang Huy, Lê Như Thảo, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát, 2018, *Thiết lập hệ thống cảm ứng rễ tơ trên giống đậu tương Việt Nam và sử dụng trong đánh giá hoạt động*

- của cấu trúc chuyên gen*, Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, 483-487.
73. Cheng Y, Wang X, Cao L et al., 2021, *Highly efficient Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root transformation for gene functional and gene editing analysis in soybean*, 17-73.
  74. Olhoft PM, Flagel LE, Donovan CM, and Somers DA, 2003, *Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cytoledonary-node method*, 723–735.
  75. Cao D, Hou W, Song S, Sun H, Wu C, Gao Y, Han T, 2009, *Assessment of conditions affecting Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean*, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 45-52.
  76. Cheng Y, Wang X, Cao L et al., 2021, *Highly efficient Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root transformation for gene functional and gene editing analysis in soybean*, 17-73.
  77. Fan Y, Zhang X, Zhong L, Wang X, Jin L, Lyu S, 2020, *One-step generations of composite soybean plants with transgenic roots by Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation*, 1-11.
  78. Zhou L, Wang Y, Wang P, Wang C, Wang J, Wang X, Cheng H, 2022, *Highly efficient Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root transformation for gene editing analysis in cotton*, *Frontiers in Plant Science*.
  79. Aggarwal PR, Nag P, Choudhary P, Chakraborty N, Chakraborty S, 2018, *Genotype independent Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of chickpea: a rapid and efficient method for reverse genetics studies*, 14-55.
  80. Xu S, Lai E, Zhao L, Cai Y, Ogutu C, Cherono S, Han Y, Zheng B, 2020, *Development of a fast and efficient root transgenic system for functional genomics and genetic engineering in peach*, 102-136.
  81. Niazian M, Belzile F, Curtin SJ, de Ronne M, Torkamaneh D, 2023,



*Optimization of in vitro and ex vitro Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root transformation of soybean for visual screening of transformants using RUBY*, *Frontiers in Plant Science*.

82. Guimaraes LA, Pereira BM, Araujo ACG, Guimaraes PM, Brasileiro ACM, 2017, *Ex vitro hairy root induction in detached peanut leaves for plant-nematode interaction studies*, *Plant Methods*, Apr 11, 13-25.

## PHỤ LỤC

**Bảng phụ lục 1: Thành phần môi trường sử dụng cho chuyển gen**

Tên môi trường	Thành phần môi trường
Gieo hạt GM	3,1 g/L Muối B5; 20 g/L Sucrose; 2,8 g/l Phytigel; pH: 5,8
Môi trường lây nhiễm khuẩn CCM <sub>L</sub>	2.15g/L Muối MS; 0,5 g/L MES; 20g/L sucrose; 1mg/L BAP; 0,25 mg/L GA3; 100mg/L AS; pH 5,7
Môi trường đồng nuôi cấy CCM	2,15 g/L Muối MS; 0,5 g/L MES; 20g/L sucrose; 1mg/L BAP; 0,25 mg/L GA3; 100mg/L AS; pH 5,7; 2,8 g/l Phytigel
Môi trường rửa khuẩn RM <sub>L</sub>	2,15 g/L Muối MS ; 0,5 g/L MES; 20g/L sucrose; 250 mg/L cefotaxime; pH 5,7
Môi trường nuôi cấy tạo rễ tơ RM	2,15 g/L MS (Murashige and Skoog, 1962); 0,5 g/L MES; 20g/L sucrose; 250 mg/L cefotaxime; pH 5,7; 2,8g/l phytigel
Môi trường dinh dưỡng BD	Dung dịch A: 2 M CaCl <sub>2</sub> ; Dung dịch B 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; dung dịch C 20 mM Fe-citrate; dung dịch D: 0,5 M MgSO <sub>4</sub> , 0,5 M K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 mM MnSO <sub>4</sub> , 4 mM H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> , 1 mM ZnSO <sub>4</sub> , 4 mM CuSO <sub>4</sub> , 0,2 mM CoSO <sub>4</sub> , 0,2 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .

*MS: Murashige and Skoog, 1962; B5: Gamborg B5; MES: 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, 4-Morpholineethanesulfonic acid monohydrate; AS: acetosyringone; BAP: 6-Benzylaminopurine; GA3: Gibberellin.*

**Bảng phụ lục 2: Thành phần môi trường sử dụng cho nuôi khuẩn**

<b>Tên môi trường</b>	<b>Thành phần môi trường</b>
LB, Môi trường nuôi khuẩn <i>R. rhizogenes</i> K599	10 g/L Yeast Extract; 5 g/L Peptone; 10 g/L NaCl; pH: 7; 15 g/L bacto agar
MGL Môi trường nuôi khuẩn <i>R. rhizogenes</i> chủng ATCC: 15834	5g/L mannitol; 1g/L L-glutamic acid; 1g/l MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,25g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1g/L NaCl; 5g/L Tryptone; 2,5g/L Yeast extract; pH: 7; 15 g/L Bacto agar
Môi trường HM	0,125g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,25 g/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,32 g/L NH <sub>4</sub> Cl; 0,18 g/L MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,004 g/L FeCl <sub>3</sub> ; 0,013 g/L CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O; 1,3 g/L HEPES; 1,1 g/L MES; 5 g/L manitol; 0,25 g/L yeast extract; 0,5g/L Arabinose; pH 6,6.

## HIGHLY EFFICIENT *RHIZOBIUM RHIZOGENES*-MEDIATED HAIRY ROOT TRANSFORMATION FOR GENE FUNCTIONAL STUDY IN MUNG BEAN (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)

Nguyen Xuan Cuong<sup>1,2</sup>, Tran Thi Loan<sup>2,3</sup>, Chu Khanh Linh<sup>1</sup>, Ta Thi Dong<sup>1,2</sup>, Bui Phuong Thao<sup>1,4</sup>, Do Tien Phat<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Lao Cai High School for Gifted Students, Phan Ke Binh Street, Bac Cuong, Lao Cai City, Lao Cai, Vietnam

<sup>4</sup>University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

✉To whom correspondence should be addressed. E-mail: dtphat@ibt.ac.vn

Received: 23.4.2023

Accepted: 25.6.2023

### SUMMARY

Mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) is one of the economically important legume crops in Asia. The demand for high quality mung bean seeds is currently increasing. Moreover, the crop can fix the atmospheric nitrogen. Those make the crop is suitable for sustainable agriculture and a major source of the plant-based protein foods. Functional genomics study in mung bean is required to comprehend the molecular mechanisms behind agronomic traits and elevate the crop trait improvement process; however, it is severely hampered due to the lacking of efficient and large-scale genetic analysis tool. *Rhizobium rhizogenes*-mediated hairy root transformation is a quick and efficient alternative to investigate root-specific processes and interactions in different species. In this study, we developed a protocol to generate hairy roots with low cost and high transformation efficiency that has not been reported in mung bean. Using the method, nearly 100% of the *R. rhizogenes* infected plants formed hairy roots and carried at least three transgenic roots harboring the desired construct per plant. It only required twenty days to complete the whole transformation process. In addition, the composite plants, that are composed transgenic roots and wild-type shoot, were used to examine with the fixing nitrogen bacteria and showed the GUS expression in nodules. In conclusion, our highly efficient *R. rhizogenes*-mediated transformation system provides high throughput genetic analysis assay for functional genetics study, and biotechnological application in mung bean.

**Keywords:** Hairy root transformation, mung bean, nodulation, *Rhizobium rhizogenes*

## INTRODUCTION

Mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) is a traditional cultivated legume in South, East, and Southeast Asia. Short duration and low input requirements are the advantages make mung bean as a suitable rotation crop for small holder farmers. Mung bean seeds are rich in protein, fiber, and contain higher levels of folate and iron than most other legumes (Keatinge *et al.*, 2011). Moreover, mung bean can fix atmospheric nitrogen via root rhizobial symbiosis, leading to improve soil fertility and texture (Graham and Vance, 2003). Therefore, mung bean is an ideal crop for sustainable agriculture and has become a major source of the plant-based protein foods.

Despite the socioeconomic importance, genomic and genetic resources for molecular breeding and crop improvement of the legume lag behind others such as *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and soybean (Sato *et al.*, 2008; Schmutz *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2011; Varshney *et al.*, 2013). The draft genome of mung bean sequence was recently constructed that covered 80% of the estimated genome size (Kang *et al.*, 2014). The reference genome sequence is an useful resource for developing molecular markers that accelerate the mung bean breeding program (Kim *et al.*, 2015). However, translational genomics, studies comparing the genome organization or gene structure and function of model versus crop species, are not sufficient to study gene function and improve mung bean crop traits due to low-quality reference genomes, and less effective molecular tools (Somta *et al.*, 2022). Genetic modification by overexpression or gene knock-out is the approach to investigate gene function, and stable genetic transformation is an efficient

gene analysis tool. However, the stable transformation is labor-intensive and too inefficient to be useful on a large scale. In contrast, the transient transformation especially hairy root transformation mediated by *Rhizobium rhizogenes* (*R. rhizogenes*), provides an alternative fast, efficient, and large-scale tool to study gene function in plants. Importantly, the approach would be effective tool to investigate genes that are involved in root biology, such as those functioning in symbiotic and pathogenic interactions, biotic and abiotic stress tolerance, or nutrient uptake (Nguyen *et al.*, 2021; Jain *et al.*, 2023).

Though *R. rhizogenes*-mediated hairy root transformation is well-established in different legume species both *in vitro* and in plant inoculation method, no systematic method has been conducted in mung bean using *in vivo* inoculation approach yet (Somta *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023). In this study, we established a rapid and highly efficient *R. rhizogenes*-mediated hairy root transgenic system for mung bean. The transgenic efficiencies of different mung bean genotypes were assessed based on the GUS staining assay. In addition, the approach is efficient for analyzing the symbiotic interaction between mung bean and nitrogen-fixing, *Bradyrhizobium japonicum* (*B. japonicum*) soil bacteria.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant materials

Mature seeds of different mung bean cultivars including DX1, DX2 and DX3 were provided as gifts from Dr. Tran Thi Truong, at the Legumes Research and Development Center, Vietnam Academy of Agricultural Sciences, Hanoi, Vietnam. These cultivars

have been widely cultivated in the North provinces of Vietnam and showed high yield and adaptation.

### **Bacterial strains and plasmids**

The *R. rhizogenes* K599 harboring the pZY102 plasmid and microsymbiotic nitrogen-fixing, *B. japonicum* USDA110 were provided as gifts from Prof. Gary Stacey at University of Missouri- Columbia, MO, USA.

### **Seed sterilization and plant growth conditions**

Mung bean seeds were surface sterilized with 70% ethanol for 1 min, followed by 10% Clorox for 10 min. They were then rinsed four - five times with sterile deionized water and germinated on trays that contain 72 pots and were filled with 1:1 (v/v) mixture of sterilized perlite and vermiculite. Trays were watered regularly with plant nutrient solution B&D, supplemented with 1mM KNO<sub>3</sub> (Broughton and Dilworth, 1971) and maintained in an environmentally controlled plant growth chamber (16:8 h light/dark photoperiod, 27°C, 100% humidity). Microsymbiotic nitrogen-fixing, *B. japonicum* USDA110 was cultured in HM medium (Cole and Elkan, 1973) with 0.004% chloramphenicol and grown at 28-30°C for 3 days. After 3 days of culture, bacteria were pelleted and diluted in sterile water to an optical density, OD<sub>600</sub> of 0.02 for inoculation. Bacterial solution was inoculated directly onto the composite mung bean plants.

### ***R. rhizogenes*-mediated mung bean hairy root transformation**

The binary plasmid pZY102 was used in

this study (Zeng *et al.*, 2004). The *GUS* gene that contains an intron and driven by CaMV 35S promoter was used as a selection marker. Mung bean hairy root induction and transformation procedures were developed based on previous reports in soybean (Nguyen *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2021) with some modification. Briefly, the single colony of *R. rhizogenes* K599 harboring the pZY102 plasmid was picked, streaked on the LB plates containing 50 mg/L spectinomycin, and incubated at 28°C for one day. A day before inoculation, fresh bacterial culture of K599 was resuspended in 1 mL liquid LB medium, then spread on the LB plates containing appropriate antibiotics. The plates were incubated at 28°C overnight, and fresh bacterial paste was used to inoculate into the 2.5-3 days old seedlings. The day of inoculation, the fresh bacteria were collected by scraping on the surface of the plates. Bacterial mass was stabbed through the hypocotyl proximal to the cotyledon using needles. Infected seedlings were covered with a sterile transparent lid to keep 100% humidity, and maintained in plant growth chamber (16:8 h light/dark photoperiod, 27°C). Twelve days after infection, hairy roots about 0.5-1 cm in length were observed and counted.

For mung bean nodule formation, transgenic composite plants (mung bean plant with hairy roots) were then inoculated with *B. japonicum* USDA110. Nodules produced on transgenic roots were harvested at 25 dpi, confirmed for GUS expression.

### **DNA extraction and PCR assay**

Chromosomal DNA was isolated using CTAB method (Doyle, 1990), following routine isolation techniques from hairy roots for genotyping assay. Hairy roots that

formed at the inoculated site of the infected plant were collected, pooled, and used for DNA extraction. The PCR amplification was performed using *GUS* gene-specific primers with PCR master mix (K0172, Thermo Scientific, USA). Specific primer pairs used for genotyping were GUS-F: TGGTGGGAAAGCGCGTTACAAG; GUS\_R: ACCTGCCAGTCAACAGACGCGTG were designed based on the *GUS* gene sequence and synthesized by Phusa Genomics, Can Tho, Vietnam. The PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel.

#### **GUS histochemical staining and calculation of transformation frequency**

Eighteen days after inoculation with K599, fifteen to thirty plants per treatment that formed hairy roots were randomly collected, immersed in the GUS staining solution and incubated at 37°C overnight (Blázquez, 2007). Samples were then transferred into ethanol 70% for clearing and storage. The hairy root transformation frequency was calculated by numbers of plants produced hairy root per total inoculated plants, and the transgenic roots frequency was based on the numbers of GUS-stained roots per total induced hairy roots per plant.

#### **Statistical analysis**

Each experiment with 50 seedlings was a biological replicate and repeated two additional times. Sample means between genotypes or treatments were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. All statistical analyses and graphs were performed using Graphpad Prism v9.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

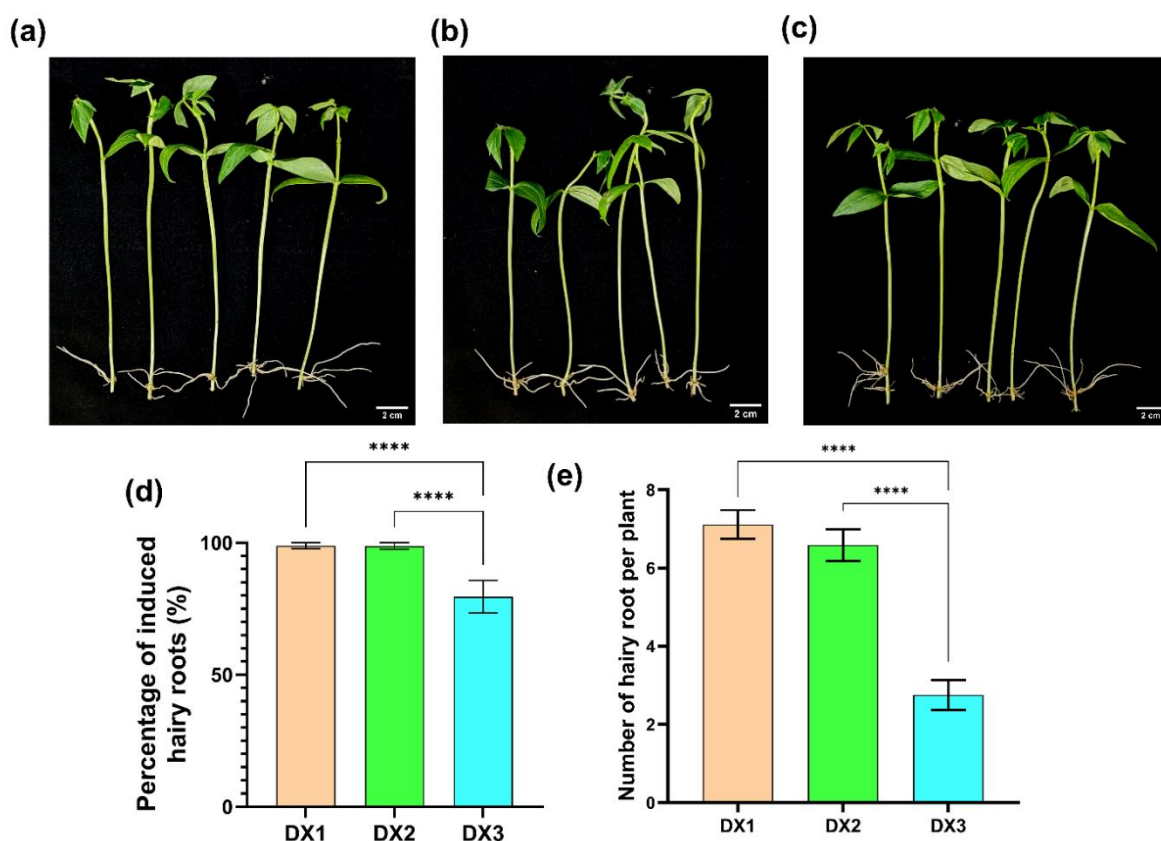
## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Genotype-dependent in *R. rhizogenes* mediated hairy root transformation in mung bean**

*R. rhizogenes* strain K599 causes hairy root disease and effectively induces hairy root formation in different plant species including several legume species (Boisson-Dernier *et al.*, 2001; Kereszt *et al.*, 2007; Geng *et al.*, 2012; Aggarwal *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2021). Moreover, the composite plants that contain induced hairy roots are effective material to study root biology (Kereszt *et al.*, 2007). Therefore, we developed an efficient, simple and rapid *R. rhizogenes*-mediated hairy root transformation *in vivo* in mung bean using strain K599. Three mung bean cultivars; DX1, DX2, and DX3 were tested with *R. rhizogenes* K599, and all genotypes produced hairy root at the infected site at twelve days after inoculation (Figure 1a-c). However, hairy root induction frequency was different among genotypes. While nearly 100% of the tested seedlings from the cultivars DX1 and DX2 produced hairy roots, this frequency was significantly reduced in the DX3, 79.55% (Figure 1d). Not only the hairy root induction frequency was low in the DX3, numbers of hairy root per plant produced by the DX3 were reduced to a half as compared to other cultivars (Figure 1e). These data suggested the hairy root induced by *R. rhizogenes* K599 in mung bean was dependent on genotype, and the DX1, DX2 cultivars performed better than the DX3 in transformation efficiencies (98.85±1.15%, 98.75±1.25% and 79.55±6.15%) and numbers of root hair formation (7.1±0.37, 6.5±0.4, and 2.7±0.38). Induced hairy roots transformation through *R. rhizogenes* has been considered as genotype-independent

approach to generate transgenic root that no significant difference in hairy root induction frequency were observed among tested cultivars (Fan *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2022). However, several reports recently indicated that genotype is a critical factor effect the transformation efficiency in

*R. rhizogenes* mediated hairy root transformation (Aggarwal *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020; Niazi *et al.*, 2023). Thus, our results suggested that genotype is a critical factor should be considered to examine before establish *R. rhizogenes* mediated hairy root transformation in mung bean.



**Figure 1.** Hairy roots induction in three Vietnamese mung bean cultivars. Representative photographs of mung bean plants: (a) DX1, (b) DX2, (c) DX3 produced hairy roots at 18 days post injected with *R. rhizogenes* strain K599. (d) Hairy roots induction rate and (e) numbers of hairy roots produced per plant at 18 days after injected with *R. rhizogenes* strain K599. Data represent means  $\pm$  SEM,  $n > 44$ . Statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey's multiple range test, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

To determine whether the induced hairy roots are transgenic or not, we performed GUS staining and PCR analysis for independent infected plants. More than fifteen hairy roots from each cultivar were randomly selected for GUS staining.

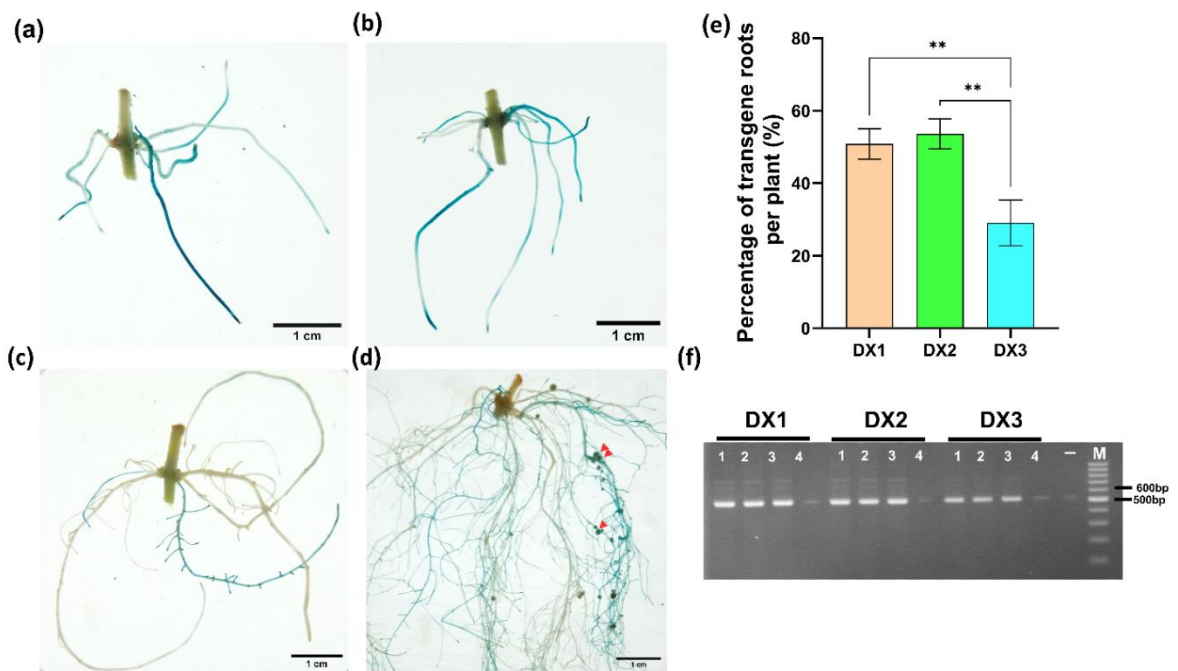
Consistence with low transformation efficiency, the transgenic root ratio per plant was also genotype dependent. Whereas 50-53% of transformed roots from the cultivars DX1 and DX2 were transgenic roots, only  $29.08 \pm 6.29\%$  of hairy roots produced by the



DX3 cultivar were carrying the *GUS* gene (Figure 2a,b,c,e). PCR analysis further confirmed that the induced hairy roots from these cultivars were indeed transgenic roots, contained *GUS* gene (Figure 2f).

Belongs to legume species, mung bean can establish a symbiosis with *rhizobia* (Graham and Vance, 2003). Therefore, to evaluate the reliability of the approach to study root biology in mung bean, we inoculated the composite mung bean plants

with nitrogen-fixing soil bacteria, *B. japonicum* strain USDA110. Twenty-five days after inoculation, nodules were formed in the induced hairy roots of the composite plants. In addition, GUS staining showed nodules and the hairy roots carrying the nodules were positive transgenic roots and nodules (Figure 2d). Thus, the result indicates the method we developed here is reliable and useful for root functional study in mung bean.



**Figure 2.** Verification of the transgenic hairy roots. (a-c) GUS staining assay of the 18dpi hairy roots from DX1, DX2 and DX3 respectively. (d) Transgenic hairy roots carrying nodules at 25 days after inoculation with *B. japonicum* USDA110 showed GUS expression. Red arrows indicate GUS-stained nodules. (e) Positive hairy root transformation frequency from different mung bean genotypes. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n > 15$ . Statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey's multiple range test, \*\*  $p < 0.01$ . (f) PCR analysis of *GUS* gene in transgenic hairy roots. 1-3: Hairy roots induced by K599; 4: non transgene root; -: negative control.

### Detailed *R. rhizogenes*-mediated hairy root transformation protocol for generating composite mung bean plants

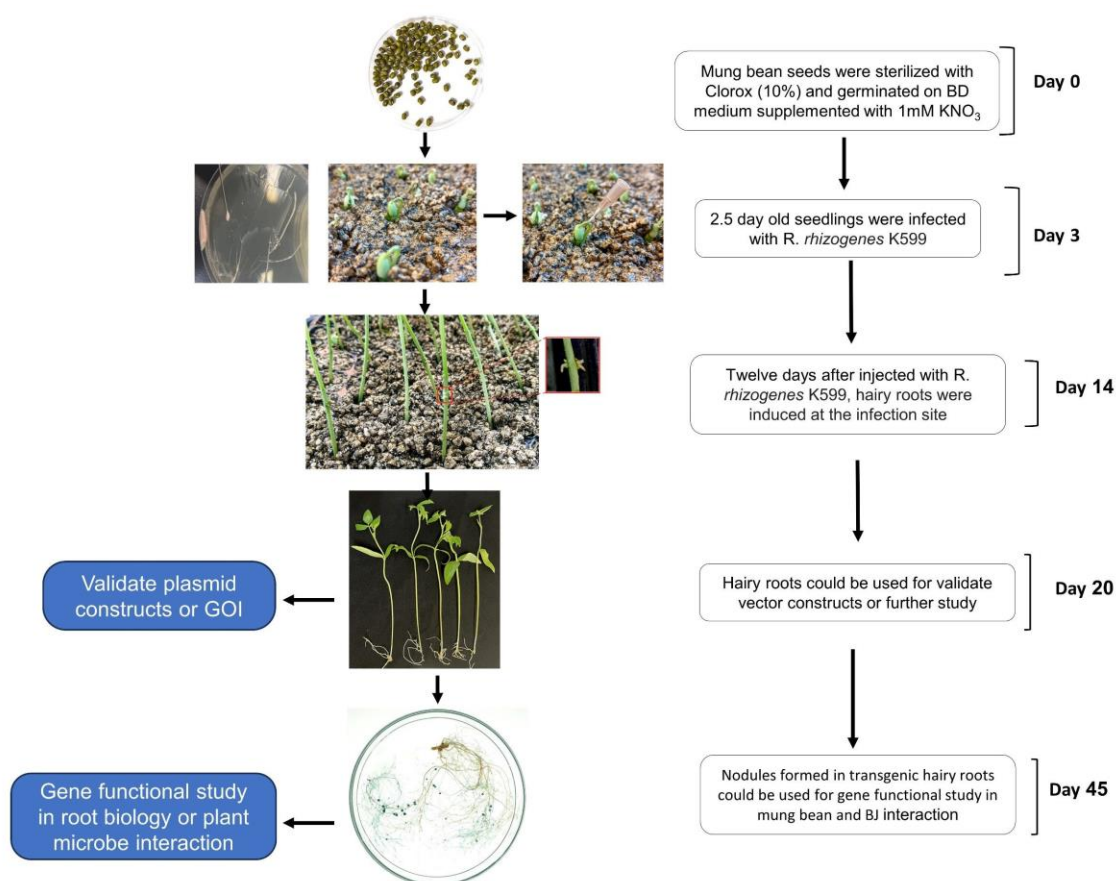
The pipeline steps of *R. rhizogenes*-mediated hairy root transformation in mung

bean are shown in Figure 3. The method described here is time and cost-efficient approach to obtain transgenic roots that can expect 80–100% of the *R. rhizogenes*-infected plants, develop 6–7 hairy roots with at least three transgenic roots carrying the

desired gene construct within twenty days.

Briefly, mature mung bean seeds were surface sterilized using ethanol 70% for one minute, followed by 10% Clorox for ten minutes. Seeds were then washed with four-five times sterilized deionized water and placed into sterilized perlite: vermiculite with ratio 1:1 and watered with the sterilized BD medium supplemented 1 mM KNO<sub>3</sub>. The tray containing seeds were covered with a transparent lid sterilized with 70% ethanol, and maintained in a growth chamber at 27°C.

On the same day as the sterilization of the seeds, *R. rhizogenes* K599 harboring the desired construct was streak on the LB plate containing appropriate antibiotics and incubated at 28°C for 2 days. The single colony was resuspended in 1 mL liquid LB medium, incubated at 28°C with orbital shaking at 200 rpm for 2 h. About 200 µL of the bacterial suspension were spread on the LB plate containing the appropriate antibiotics and incubate at 28°C overnight.



**Figure 3.** Workflow of the *R. rhizogenes* K599 –mediated hairy root transformation in mung bean to study root biology. GOI (gene of interest).

On day 3, fresh bacteria were collected from the plates and used for inoculation.

Three days after germination, healthy seedlings with unfolded green cotyledons

were used for the transformation experiments. Bacterial paste was stabbed through the central part of the hypocotyl proximal to the cotyledon of the plantlets using needle. *R. rhizogenes* infected plants were watered with BD media, kept at high humidity by covering the transparent lids, and maintained under growth chamber condition (27°C, 16:8 h light/dark photoperiod). Tenth days after inoculation, callus and hairy root were observed at the infected sites.

When the hairy roots were approximately 5–10 cm in length, individual or all hairy roots could be cut off for future analysis such as CRISPR efficiency, mRNA expression of gene of interest. In addition, the primary root could be removed and transferred the composite plant to new trays. Plants could be inoculated with symbiotic bacteria, *B. japonicum* USDA110 and phenotype and genotype of the hairy roots can be analyzed after three weeks.

## CONCLUSIONS

In this study, we developed a simple, fast, low cost and labor-efficient protocol to generate hairy roots in mung bean for functional genomic study. The method has advantage over other approaches that it does not require aseptic condition to conduct the experiments and produce large number of composite plants within three weeks. This efficient, high-throughput transformation method makes available to analyze gene function and biotechnological applications in different mung bean cultivars.

**Acknowledgments:** *We would like to acknowledge Dr. Tran Thi Truong, Legumes Research and Development Center supplied*

*mung bean seeds. Funding was provided by Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology to Nguyen Xuan Cuong, award number CST23-02.*

## REFERENCE

- Aggarwal PR, Nag P, Choudhary P, Chakraborty N, Chakraborty S (2018) Genotype-independent *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation of chickpea: a rapid and efficient method for reverse genetics studies. *Plant Methods* 14: 55. doi: 10.1186/s13007-018-0315-6
- Blázquez M (2007) Quantitative GUS activity assay in intact plant tissue. *Cold Spring Harb Protoc* 2: pdb.prot4688. doi: 10.1101/pdb.prot4688
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 695–700.
- Broughton WJ, Dilworth MJ (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 125: 1075–1080.
- Chen J, Zhan J, Wang H, Zhao Y, Zhang D, Chen X, Su N, Cui J (2023) VrMYB90 Functions synergistically with VrbHLHA and VrMYB3 to regulate anthocyanin biosynthesis in mung bean. *Plant Cell Physiol* 64: 221–233.
- Cheng Y, Wang X, Cao L, Ji J, Liu T, Duan K (2021) Highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation for gene functional and gene editing analysis in soybean. *Plant Methods* 17: 73. doi: 10.1186/s13007-021-00778-7
- Cole MA, Elkan GH (1973) Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob Agents Chemother* 4: 248–253.

- Doyle JJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Fan Y, Zhang X, Zhong L, Wang X, Jin L, Lyu S (2020) One-step generation of composite soybean plants with transgenic roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *BMC Plant Biol* 20: 208. doi: 10.1186/s12870-020-02421-4
- Geng L, Niu L, Gresshoff PM, Shu C, Song F, Huang D, Zhang J (2012) Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 109: 491–500.
- Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872–877.
- Jain D, Jones L, Roy S (2023) Gene editing to improve legume-rhizobia symbiosis in a changing climate. *Curr Opin Plant Biol* 71: 102324. doi: 10.1016/j.pbi.2022.102324
- Kang YJ, Kim SK, Kim MY, Lestari P, Kim KH, Ha B-K, Jun TH, Hwang WJ, Lee T, Lee J, et al. (2014) Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species. *Nat Commun* 5: 5443. doi: 10.1038/ncomms6443
- Keatinge J, Easdown W, Yang R, Chadha M, Shanmugasundaram S (2011) Overcoming chronic malnutrition in a future warming world: the key importance of mungbean and vegetable soybean. *Euphytica* 180: 129–141.
- Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, Nguyen CD, Nontachaiyapoom S, Kinkema M, Gresshoff PM (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat Protoc* 2: 948–952.
- Kim SK, Nair RM, Lee J, Lee S-H (2015) Genomic resources in mungbean for future breeding programs. *Front Plant Sci* 6: 626. doi: 10.3389/fpls.2015.00626
- Nguyen CX, Dohnalkova A, Hancock CN, Kirk KR, Stacey G, Stacey MG (2021) Critical role for uricase and xanthine dehydrogenase in soybean nitrogen fixation and nodule development. *Plant Genome* 16: e20172. doi: 10.1002/tpg2.20172
- Nguyen NH, Le H, Le TN, Pham NB, Chu HH, Do PT (2018) Establishment of hairy root induction procedure for Vietnamese soybean cultivar to validate activities of gene expression vector. *Proc Vietnam Natl Conf Biotechnol* 2018: 483–487.
- Niazian M, Belzile F, Curtin SJ, de Ronne M, Torkamaneh D (2023) Optimization of *in vitro* and *ex vitro* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of soybean for visual screening of transformants using RUBY. *Front Plant Sci* 14: 1207762. doi: 10.3389/fpls.2023.1207762
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A, Kawashima K (2008) Genome structure of the legume *Lotus japonicus*. *DNA Res* 15: 227–239.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, et al (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178–183.
- Somta P, Laosatit K, Yuan X, Chen X (2022) Thirty years of mung bean genome research: Where do we stand and what have we learned. *Front Plant Sci* 13: 944721. doi: 10.3389/fpls.2022.944721
- Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Yu S, Sharpe AG, Cannon S, Baek J, Rosen BD, Tar'an B (2013) Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat Biotechnol* 31: 240–246.
- Xu S, Lai E, Zhao L, Cai Y, Ogutu C, Cherono S, Han Y, Zheng B (2020) Development of a fast and efficient root transgenic system for functional genomics and genetic engineering in

peach. *Sci Rep* 10: 2836. doi: 10.1038/s41598-020-59626-8

Young ND, Debellé F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KF, Gouzy J, Schoof H (2011) The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520–524.

Zeng P, Vadnais DA, Zhang Z, Polacco JC (2004)

Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep* 22: 478–482.

Zhou L, Wang Y, Wang P, Wang C, Wang J, Wang X, Cheng H (2022) Highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation for gene editing analysis in cotton. *Front Plant Sci* 13: 1059404. doi: 10.3389/fpls.2022.1059404

Số: 316/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 08 tháng 04 năm 2024

**QUYẾT ĐỊNH**  
**Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ**

**GIÁM ĐỐC**  
**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/08/2021 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 896/QĐ-HVKHCN ngày 25/05/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 1 năm 2022;

Căn cứ Quyết định số 1088/QĐ-HVKHCN ngày 02/10/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;  
Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

**QUYẾT ĐỊNH:**

**Điều 1.** Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Trần Thị Loan với đề tài: “Nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ tơ cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)”.  
Mã số: 8 42 01 14

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

**Điều 2.** Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

**Điều 3.** Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /.

**Nơi nhận:**

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.14.

**GIÁM ĐỐC**



GS.TS. Vũ Đình Lâm



## DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Kèm theo Quyết định số 316/QĐ-HVKHCN ngày 08/04/2024  
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Chợ luận văn của học viên: Trần Thị Loan

Tên đề tài: Nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ tơ cây  
đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: 1. TS. Đỗ Tiến Phát

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Nguyễn Xuân Cường

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS.TS. Chu Hoàng Hà	Công nghệ sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	PGS.TS. Đoàn Văn Thước	Công nghệ sinh học	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Phản biện 1
3.	PGS.TS. Phạm Bích Ngọc	Công nghệ sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 2
4.	TS. Hoàng Thị Thu Hằng	Di truyền - Truyền nhiễm	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	PGS.TS. Nguyễn Quang Huy	Hóa sinh học	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./.

Hà Nội, ngày 17 tháng 05 năm 2024

## BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 316/QĐ-HVKHCN ngày 08/04/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Trần Thị Loan

Tên đề tài: Nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ tơ cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 17/05/2024 Hội đồng đã họp tại phòng họp 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 14 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

- |                             |                   |
|-----------------------------|-------------------|
| 1. GS.TS. Chu Hoàng Hà      | Chủ tịch hội đồng |
| 2. TS. Hoàng Thị Thu Hằng   | Thư ký hội đồng   |
| 3. PGS. TS. Đoàn Văn Thược  | Phản biện 1       |
| 4. PGS.TS. Phạm Bích Ngọc   | Phản biện 2       |
| 5. PGS.TS. Nguyễn Quang Huy | Ủy viên hội đồng  |



Thành viên vắng mặt: ..... (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

### NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng

5. Phản biện 1: — Phương pháp hiện tại cho kết quả đang tìm cây.

- Thu được 03 kết quả chính
- Một số hạn chế: ... trang 6, tr 11 phần tổng quan; bổ sung cơ chế phân tử chuyển gen từ *R. rhizogenes* sang thực vật; cơ chế cảm ứng tạo rễ tơ; bổ sung trích dẫn phương pháp; chú thích rõ ràng hình 3.1 —
- Tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ sau nuôi cấy để tính như thế nào?
- Giải thích cơ chế tạo rễ tơ? Giải thích cụ thể các quy trình.
- Rút ngắn kết luận. Luận văn đạt yêu cầu.



6. Phản biện 2:

... Căn trính bày chi tiết, cụ thể hơn các phương pháp, kết quả thu được của luận văn... Bộ ning tổng quan về khả năng ứng dụng hệ thống rết to; chỉnh sửa một số lỗi chính tả; rút ngắn kết luận

7. Học viên trả lời:

... Dựa trên số lượng mà seo tạo rết to để tính %; tính số lượng rết to trung bình ở từng giá trị OD  
... Học viên xin tiếp thu góp ý & chỉnh sửa lại quy trình  
... Học viên sẽ chú thích lại các hình rõ ràng  
... Mong muốn phát triển nghiên cứu tại Lào Cai

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

... PGS.TS. Nguyễn Quang Huy: Rà soát lại TLTK, không đánh số trang Phụ lục; rút ngắn kết luận; giải thích sự khác nhau của 3 giống đầu xanb; chỉnh sửa lại phần mã tử quy trình... Học viên phát triển hướng nghiên cứu trong tương lai?  
... TS Hoàng Thị Thu Hằng

9. Học viên trả lời

... Học viên xin tiếp thu & chỉnh sửa

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: ... PGS.TS. Nguyễn Quang Huy

Ủy viên: ... PGS.TS. Phạm Bích Ngọc

Ủy viên: ... TS. Hoàng Thị Thu Hằng

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: ... 05

Số phiếu thu về: ... 05

Tổng số điểm: ... 43

Điểm trung bình: ... 8,6

Điểm thưởng công trình công bố:.....0.8.....

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:.....9.4.....

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn .....Đạt..... (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:

.....Không trùng lặp.....  
.....  
.....

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

.....Kết quả của luận văn đạt chất lượng tốt, có ý nghĩa khoa học & thực tiễn cao, đạt yêu cầu Luận văn Thạc sỹ. Cần chỉnh sửa theo yêu cầu của Hội đồng......  
.....  
.....

Buổi họp đã kết thúc vào 16 giờ 30 phút, ngày 18<sup>17</sup>/5/2024

Hà Nội, ngày 17 tháng 5 năm 2024

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG



Hoàng Thị Thu Hằng

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



Chu Hồng Hà

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO  
**GIÁM ĐỐC**



**Vũ Đình Lãm**



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

**BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ và tên người nhận xét: Đoàn Văn Thước      Học hàm, học vị: PGS.TS

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện

Cơ quan công tác: Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Họ và tên học viên: Trần Thị Loan

Tên đề tài: Nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ tơ cây đậu xanh  
(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm      Mã số 8420114

**NỘI DUNG NHẬN XÉT**

**1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:**

Rễ tơ là một loại bệnh ở thực vật được tạo ra do tế bào bị nhiễm vi khuẩn *Rhizobium rhizogenes*. Ở vị trí lây nhiễm xuất hiện lượng lớn rễ tơ và sinh trưởng rất mạnh. Hệ thống nuôi cấy rễ tơ đã được ứng dụng trong quy trình sản xuất các chất hoạt tính đặc biệt là các sản phẩm thứ cấp. Bên cạnh đó, việc tạo ra rễ tơ cũng có ý nghĩa trong các nghiên cứu khác ví dụ như đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen hay nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen. Trong luận văn này, nhóm tác giả nghiên cứu tạo rễ tơ ở cây đậu xanh nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu khác.

**2. Sự trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo**

Đã có một số công trình nghiên cứu tạo rễ tơ ở cây đậu tương cho các mục đích khác nhau, tuy nhiên đối tượng và nội dung của nghiên cứu này có một số khác biệt so với các nghiên cứu trước đó. Luận văn trích dẫn tương đối đầy đủ, rõ ràng các tài liệu tham khảo.

### **3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo**

Các nội dung của đề tài luận văn phù hợp với tên đề tài, với chuyên ngành đào tạo (Sinh học thực nghiệm) và mã số đào tạo.

### **4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã được sử dụng để hoàn thành luận văn**

Tác giả đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu cơ bản được dùng trong chuyên ngành bao gồm các phương pháp nuôi cấy vi khuẩn, phương pháp lây nhiễm tạo rễ tơ ở cây đậu xanh, phương pháp đánh giá khả năng tạo rễ tơ và kiểm tra sự có mặt của gen bằng chỉ thị màu hoặc sản phẩm PCR sử dụng trình tự môi đặc hiệu. Đây là các phương pháp cơ bản thường được dùng trong nghiên cứu. Các phương pháp hiện đại, đảm bảo độ tin cậy của các kết quả nghiên cứu thu được.

### **5. Kết quả nghiên cứu của luận văn**

- Tác giả đã thử nghiệm tạo rễ tơ trên 3 giống đậu xanh và xác định được hiệu quả cao nhất trên giống DX2.
- Đã thử nghiệm hiệu quả chuyển gen của hai chủng vi khuẩn *R. rhizogenes* K599 và ATCC 15834, kết quả cho thấy chủng K599 cho hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ tốt hơn.
- Các rễ tơ *in vivo* chuyển gen trên cây đậu xanh có khả năng tương tác và lây nhiễm bởi vi khuẩn *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 để hình thành nốt sần.

### **6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi**

Luận văn có một số lỗi, tác giả nên xem xét chỉnh sửa, cụ thể như sau:

- Tên đề tài chưa phù hợp với nội dung nghiên cứu
- Chỉnh sửa lại nội dung nghiên cứu 1 – chuyển gen vào tế bào thực vật và tạo rễ tơ chứ không phải chuyển vào rễ tơ.

#### ***Phần tổng quan***

- Trang 6, đoạn 2 dòng thứ 4 từ trên xuống – câu không rõ nghĩa.
- Trang 11, phần (c) nên chỉnh sửa lại
- Trang 12, cuối đoạn 2 – câu thiếu

- Bổ sung cơ chế phân tử của quá trình chuyển gen từ vi khuẩn *R. rhizogenes* sang thực vật.

- Bổ sung cơ chế hình thành rễ tơ. Hạn chế phần tổng quan liên quan đến Opine.

- Cần tổng quan thêm các thành tựu của công nghệ hình thành rễ tơ

### ***Phần phương pháp***

- Trang 16, cuối đoạn 2 – bỏ học hàm.

- Trang 19, thay 3 tiếng bằng 3 giờ

- Bổ sung các phương pháp nghiên cứu cho nội dung 2 – Thiết lập hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ *in vivo* và đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen trên rễ tơ *in vivo* cây đậu xanh.

### ***Phần kết quả và thảo luận***

- Hình 3.1; 3.2 và 3.3 nên chú thích rõ ràng cho trực tung, bổ sung kí hiệu a, b, c cho những sai khác có ý nghĩa thống kê.

- Hình 3.6 mờ - nên vẽ lại.

- Hình 3.2. Tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ sau 24 giờ lây nhiễm được tính theo tỷ lệ nào? So với ban đậu hay so với mô sẹo?

- Giải thích cơ chế hình thành rễ tơ nhiều hay ít (hình 3.3) là do đâu?

- Tác giả giải thích rõ hơn quy trình trong hình 3.5.

### ***Phần kết luận***

- Nên viết lại cho gọn, nêu bật các kết quả chính của luận văn, tránh kể lại các kết quả chính đã được đề cập trong phần kết quả và thảo luận.

### ***Phần tài liệu tham khảo***

- Chính sửa lại theo một mẫu thống nhất: xem lại cách viết một số tài liệu ví dụ 3, 12,..

- Không nên tham khảo khóa luận của sinh viên (tài liệu 1)

**7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên các tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?**

Nội dung nghiên cứu và các kết quả cơ bản của luận văn đã được công bố trên tạp chí Công nghệ Sinh học.

## 8. Kết luận chung

Hình thức và nội dung của luận văn đáp ứng yêu cầu của một luận văn thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm theo quy chế đào tạo thạc sĩ của Bộ Giáo dục và Đào tạo.

Luận văn có đủ điều kiện để bảo vệ trước Hội đồng để tác giả nhận học vị Thạc sĩ.

*Hà nội, ngày 14 tháng 5 năm 2024*

**Người viết nhận xét**  
(Ký và ghi rõ họ tên)



**PGS.TS. Đoàn Văn Thược**

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Phạm Bích Ngọc..... Học hàm, học vị: PGS.TS  
Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 2.....  
Cơ quan công tác: Viện Công nghệ Sinh học.....  
Họ và tên học viên: Trần Thị Loan.....  
Tên đề tài: Nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ tế bào cây đậu xanh.....  
Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Đề tài đã thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ tế bào cây đậu xanh, kết quả có ý nghĩa khoa học trong việc kiểm tra hoạt động của cấu trúc chuyển gen thay chèn sửa gen phục vụ công tác nghiên cứu về chức năng gen, chọn tạo cây trồng chuyển gen, chèn sửa gen sau này

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài không trùng lặp với các nghiên cứu trong nước. Là lần đầu tiên sử dụng nghiên cứu tạo rễ tế bào trên một số cây họ đậu đậu xanh Việt Nam

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Nội dung nghiên cứu phù hợp tên đề tài và chuyên ngành và mã số đào tạo

- Nội dung 1: Thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen thông qua rễ tế bào in vitro trên cây đậu xanh

- Nội dung 2: Thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen thông qua rễ tế bào in vivo trên cây đậu xanh

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

- Phương pháp nghiên cứu phù hợp, tự nhiên các lâm ra phương case study để thu nghiên cứu để thu được kết quả.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã xây dựng được quy trình cảm ứng tạo tế bào in vitro chuyên gen thối qua tế bào vào tế bào giống đầu xans V  
- Đã xây dựng được quy trình cảm ứng tạo tế bào in vitro và đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyên gen trên tế bào in vivo cây đầu xans

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Còn một số lỗi chính tả in ấn cần hoàn thiện, chính sửa.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Đồng tác giả bài báo đã đăng trên Tạp chí CNSTH.



8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

- Đề luận văn đáp ứng yêu cầu về nội dung khoa học, kết quả luận văn công bố trên Tạp chí ENSH, VAST. Kèm đề nghị Hội đồng thông qua luận văn và Học viện nhân học vị Thạc sĩ.

..H.N..., ngày 14. tháng 05. năm 2024

Người nhận xét  
(Ký, ghi rõ họ tên)

Phạm Bích Ngọc .

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT02438689977- 0946082099

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN  
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: **TRẦN THỊ LOAN**

Lớp: BIO - 2022A

Tên đề tài luận văn: “Nghiên cứu thiết lập hệ thống cảm ứng và chuyển gen vào rễ  
tơ cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)”

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học: Hướng dẫn 1: TS Đỗ Tiến Phát

Hướng dẫn 2: TS Nguyễn Xuân Cường

Ngày bảo vệ luận văn: 16/5/2024.

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh  
sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	<b>Phần tổng quan:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Trang 6, đoạn 2 dòng thứ 4 từ trên xuống – câu không rõ nghĩa.</li><li>- Trang 11 phần c nên chỉnh sửa lại.</li><li>- Trang 12, cuối đoạn 2 – câu thiếu.</li><li>- Một số lỗi diễn đạt trang 10, 11.</li><li>- Chỉnh lại tên vi khuẩn ở trang 7.</li><li>- Một số lỗi chính tả, thuật ngữ dùng chưa thống nhất trang 1, 5, 6, 11, 12, 14.</li><li>- Bổ sung cơ chế hình thành rễ tơ và cơ chế phân tử của quá trình chuyển gen từ vi khuẩn <i>R. Rhizogenes</i> sang thực vật, hạn chế phần tổng quan liên quan đến Opine.</li><li>- Cần tổng quan thêm các thành tựu trong nghiên cứu rễ tơ trên thực vật.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Đã chỉnh sửa các lỗi chính tả và diễn đạt ở các trang 1, 5, 6, 11, 12, 14.</li><li>- Đã bổ sung cơ chế hình thành rễ tơ và cơ chế phân tử của quá trình chuyển gen từ vi khuẩn <i>R. Rhizogenes</i> sang thực vật.</li><li>- Đã bổ sung thêm các thành tựu về nghiên cứu rễ tơ trên thực vật.</li></ul>
2	<b>Phần phương pháp:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Trang 16, cuối đoạn 2 - bỏ học hàm.</li><li>- Trang 19, thay 3 tiếng bằng 3 giờ.</li><li>- Một số lỗi chính tả trang 18, 19.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Đã chỉnh sửa lỗi chính tả và thuật ngữ ở các trang 16, 18, 19.</li></ul>



3	<b>Phân kết quả và thảo luận:</b> - Một số lỗi chính tả trang 27, 29, 31 - Hình 3.6 mờ.	- Đã chỉnh sửa lỗi chính tả ở các trang 27, 29, 31. - Đã thay hình 3.6 bằng hình mới rõ nét hơn.
4	<b>Phân kết luận:</b> - Nên viết cho gọn lại, nêu bật các kết quả chính của luận văn.	- Đã viết lại kết luận cho ngắn gọn, phù hợp.
5	<b>Phân tài liệu tham khảo:</b> - Chỉnh sửa lại theo một mẫu thống nhất.	- Đã chỉnh sửa lại tài liệu tham khảo theo một mẫu chung thống nhất.

Hà Nội, ngày 27 tháng 5 năm 2024

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS.TS. Chu Hoàng Hà

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

Đỗ Tiến Phát

Nguyễn Xuân Cường

HỌC VIÊN

Trần Thị Loan

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



KT. GIÁM ĐỐC  
PHÓ GIÁM ĐỐC

Trần Thị Phương Anh

