

ẢNH HƯỞNG CỦA BỨC XẠ GAMMA COBALT 60 LÊN SINH TRƯỞNG VÀ HÀM LƯỢNG PHENOLIC TỔNG SỐ CỦA RỄ TƠ BỒ ĐỀ *FICUS RELIGIOSA* L IN VITRO.

HÀ THỊ NGỌC TRINH¹, ĐOÀN PHẠM NGỌC NGÀ¹, CAO THỊ BẰNG GIANG¹

¹Trung tâm Hạt nhân Thành phố Hồ Chí Minh_217 Nguyễn Trãi, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh

ngoctrinhathi@gmail.com, dpngocnga@gmail.com, caothibanggiang@gmail.com

Tóm tắt: Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cảm ứng tạo rễ tơ cây bồ đề *Ficus religiosa* L. đồng thời khảo sát ảnh hưởng của chiếu xạ gamma liều thấp lên đặc tính sinh trưởng và hàm lượng phenolic của rễ tơ *F. religiosa* L.

Các mẫu lá, cuống lá và đoạn thân *in vitro* của cây bồ đề được ngâm trong dịch vi khuẩn *A. rhizogenes* TR7, đồng nuôi cấy trên môi trường MS (bổ sung sucrose 3 %, agar 8 g / L, pH 5,8) trong tối, ở 25 °C. Rễ tơ xuất hiện sau 3 - 4 tuần được chuyển sang môi trường MS lỏng bổ sung sucrose 2 % là môi trường tốt nhất cho tăng sinh rễ tơ. Sau 4 tuần, các sợi rễ khỏe mạnh được xử lý chiếu xạ liều thấp bằng nguồn ⁶⁰Co từ 0-40 Gray (Gy).

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong ba loại vật liệu gây nhiễm với *A. rhizogenes* TR7 (lá, cuống lá và đoạn thân *in vitro*) thì mô lá là vật liệu thích hợp nhất có tần số cảm ứng đạt $66,67 \pm 7,64$ % với thời gian gây nhiễm 30 phút, đồng nuôi cấy 5 ngày. Sự hiện diện của gene *rolB*, *rolC* và vắng mặt của gene *virD* được kiểm tra bằng phương pháp PCR đã khẳng định rễ tơ được chuyển gene thành công. Dưới ảnh hưởng của bức xạ gamma ⁶⁰Co, tỉ lệ sống, khối lượng tươi và chỉ số tăng trưởng của rễ tơ giảm. Tuy nhiên khối lượng khô tại liều chiếu 30 Gy lại tăng ($22,25 \pm 1,38$ %) hơn so với đối chứng ($15,04 \pm 0,71$ %). Liều chiếu xạ 20 Gy cho hàm lượng phenolic cao nhất đạt 36,72 mg GAE/g DW, tăng 1,44 lần so với đối chứng.

Từ khóa: Bồ đề, *Ficus religiosa* L., *Agrobacterium rhizogenes* TR7, rễ tơ, bức xạ gamma

1. MỞ ĐẦU

Ficus religiosa L. (họ Moraceae), thường được gọi là cây bồ đề có nguồn gốc từ Ấn Độ, nơi nó có tầm quan trọng lớn về mặt y học từ thời xa xưa. Đây là cây duy nhất có hơn 50 ứng dụng y học đa dạng, được tạo ra bởi mọi bộ phận của cây như vỏ cây, lá và chồi non, quả khô, quả, hạt và mủ [1]. Loài thực vật này được báo cáo có phổ rộng các hoạt tính như chống ung thư, chống oxy hóa, chống đái tháo đường, kháng khuẩn, chống giun, chống loét, chống suy nhược và chống thoái hóa thần kinh.

Nuôi cấy rễ tơ, còn được gọi là nuôi cấy rễ biến đổi, là một loại nuôi cấy mô thực vật được sử dụng để nghiên cứu các quá trình trao đổi chất thực vật hoặc để sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp có giá trị. Nuôi cấy rễ tơ đã được phát triển cho hơn 100 loài thực vật. Tuy nhiên, đối với nhiều loại cây quan trọng về mặt y học và kinh tế, việc nuôi cấy rễ tơ vẫn chưa được phát triển; *Ficus religiosa* L. là một trong số đó.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về cây này còn khá khiêm tốn chỉ kể đến như các nghiên cứu về thành phần hóa học của cây được đề cập đến bởi tác giả Cẩm Thị Ính 2009 [2], [3]; Hoàng Thanh Hương 2009 [4]. Trên thế giới và đặc biệt là tại Ấn Độ đã có nhiều công trình nghiên cứu, thiết lập các điều kiện nuôi cấy *in vitro* phù hợp tạo cây và callus nhằm nhân giống cũng như thu nhận các hợp chất từ cây [5], [6]. Về mặt ứng dụng nuôi cấy rễ tơ bồ đề, duy nhất chỉ có năm 2014, Siwach và các đồng tác giả sở hữu bằng sáng chế về cảm ứng tạo rễ tơ bồ đề thu nhận dịch chiết có hoạt tính ức chế acetylcholinesterase cao có thể được sử dụng điều trị Alzheimer [7]. Điều này càng chứng tỏ giá trị kinh tế của cây cũng như khả năng ứng dụng nuôi cấy rễ tơ trên đối tượng này. Việt Nam, cũng là một trong những nơi có sự

phân bố rộng rãi của loài cây này, việc thiết lập một quy trình nhân nuôi rễ tơ đặc thù riêng cho cây bồ đề nhằm khai thác nguồn dược liệu địa phương là một điều cần thiết.

Bức xạ nói chung và tia gamma nói riêng là một trong những nhân tố kích thích phi sinh học đã được coi là một phương pháp nhanh và mới, có khả năng làm thay đổi đặc tính sinh trưởng cũng như khả năng tổng hợp các hợp chất của thực vật [8]. Với cường độ thích hợp, bức xạ gamma có thể gia tăng tốc độ sinh trưởng và tổng hợp các hợp chất thứ cấp ở thực vật [9]. Hơn nữa, sử dụng tia gamma có thể tạo ra đột biến gen liên quan đến biểu hiện của các enzyme chống oxy hóa với tác dụng giảm stress oxy hóa, bắt đầu từ thể hệ thực vật đầu tiên [10].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cảm ứng tạo rễ tơ cây bồ đề (*Ficus religiosa* L.) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* TR7; bước đầu khảo sát ảnh hưởng của bức xạ gamma Cobalt-60 đến khả năng sinh trưởng cũng như tổng hợp các hợp chất phenolic của rễ tơ bồ đề cho các nghiên cứu sâu hơn và ứng dụng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ loài cây dược liệu này.

2. NỘI DUNG

2.1. Đối tượng và Phương pháp

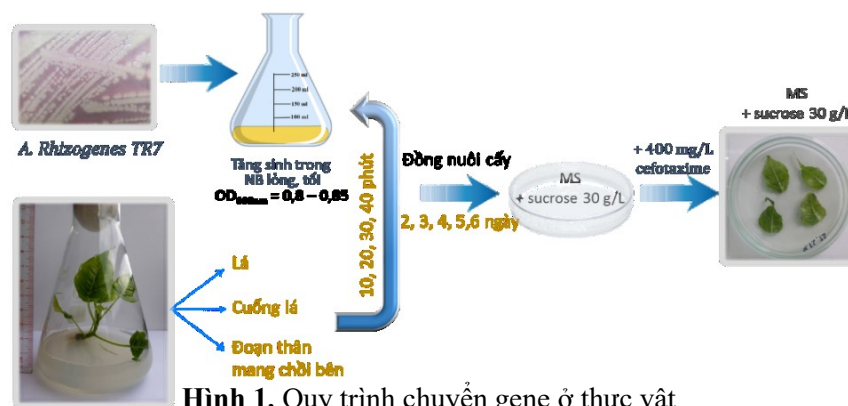
- Đối tượng

+ Chồi đỉnh và chồi nách thuộc các ngọn còn non của nhánh cây bồ đề khỏe mạnh 55-60 năm tuổi sinh trưởng tại khuôn viên chùa Lâm Tế (Thành phố Hồ Chí Minh) được sử dụng làm nguồn vật liệu tạo cây *in vitro*.

+ Chủng *A. rhizogenes* TR7 sử dụng chuyển gene được cung cấp bởi Phòng Công nghệ gene, Viện Sinh học Nhiệt đới.

- Phương pháp

2.1.1. Chuyển gene thực vật



Hình 1. Quy trình chuyển gene ở thực vật

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường NB lỏng đạt OD_{600nm} 0,8-0,85 được sử dụng để gây nhiễm. Lá, cuống lá và đoạn thân từ các cây bồ đề *in vitro* 2,5 tháng tuổi được sử dụng làm vật liệu gây nhiễm.

Các mẫu được cắt tạo vết thương, ngâm trong dịch huyền phù *A. rhizogenes* trong 10, 20, 30 hoặc 40 phút. Sau đó, thấm khô các mẫu bằng giấy thấm vô trùng để loại bỏ nước và vi khuẩn còn sót trên bề mặt; đồng nuôi cấy chúng trên môi trường MS (bổ sung 3 % sucrose, agar 8 g / L, pH 5,8) trong tối, ở 25 °C trong 2, 3, 4, 5 hoặc 6 ngày. Sau thời gian đồng nuôi cấy, các mẫu được chuyển vào đĩa môi trường MS bổ sung 400 mg / L cefotaxime và 3 % sucrose. Rễ tơ xuất hiện sau 3 - 4 tuần tại các vị trí bị thương của mẫu được cắt thành các đoạn dài 1 cm và nuôi cấy, duy trì trên môi trường MS được bổ sung 3 % sucrose.

2.1.2. Tách chiết DNA và khuếch đại bằng PCR

DNA bộ gene cây bồ đề được tách chiết từ rễ tơ giải định và rễ bình thường (chứng âm) sử dụng kit ISOLATE II Plant. Plasmid từ *A. rhizogenes* TR7 sử dụng làm chứng dương được tách chiết bằng kit QIAGEN.

Sự chuyển gene được xác nhận bởi sự hiện diện của gene *rolA*, *rolC* và sự vắng mặt của gene *virD* với trình tự mỗi đặc hiệu được thiết kế bởi Công ty TNHH MTV Sinh Hóa Phù Sa (Bảng 1).

Bảng 1. Môi sử dụng phân tích PCR

Gene	Primer	Trình tự mồi (5'→3')	Kích thước khuếch đại dự kiến (bp)
<i>RolB</i>	<i>RolBF</i> <i>RolBR</i>	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	780
<i>RolC</i>	<i>RolCF</i> <i>RolCR</i>	CTCCTGACATCAAACCTCGTC TGCTTCGAGTTATGGGTACA	540
<i>VirD</i>	<i>RolBF</i> <i>RolBR</i>	ATGTGCGCAAGGACGTAAGCCC GGAGTCTTTCAGCATGGAGCA	450

2.1.3. Chiếu xạ mẫu

Các sợi rễ phân nhánh cấp 1 có kích thước khoảng 6-7 cm đang trong quá trình tăng trưởng được xử lý chiếu xạ gamma Cobalt-60 ở các liều chiếu tăng dần 0, 10, 20, 30 và 40 Gy tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt. Mẫu sau khi xử lý chiếu xạ được tiếp tục nuôi cây trong môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose để ghi nhận sự tăng trưởng.

2.1.4. Xử lý số liệu

Các số liệu ghi nhận từ thí nghiệm được xử lý sơ bộ bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2013, xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 20.0 dành cho Window. Sự sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% của các giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự (a,b,c,d) kèm theo sau độ lệch chuẩn (standard deviation _SD). Kết quả được trình bày ở dạng: trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD).

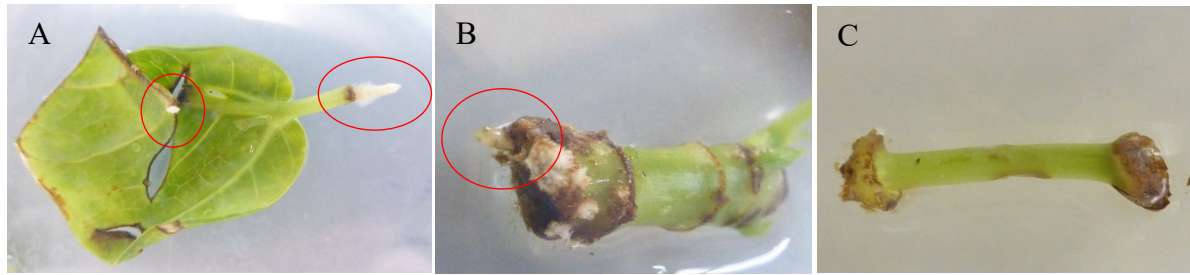
2.2. Kết quả

2.2.1. Ảnh hưởng của vật liệu gây nhiễm đến hiệu quả cảm ứng rễ tơ

Nhằm xác định bộ phận thích hợp sử dụng cho gây nhiễm với *A. rhizogenes* TR7 tạo rễ tơ, các bộ phận: lá, cuống lá và đoạn thân mang chồi bên của cây bồ đề *in vitro* được ngâm trong dịch vi khuẩn OD_{600nm} đạt 0,8 – 0,85 trong 20 phút, thời gian đồng nuôi cây 3 ngày. Kết quả thể hiện qua **Bảng 2** và **Hình 2**.

Bảng 2. Ảnh hưởng của vật liệu gây nhiễm đến cảm ứng tạo rễ tơ

	Vật liệu	Số rễ trung bình (rễ/mẫu)	Tỉ lệ mẫu tạo rễ (%)	Thời gian xuất hiện rễ tơ (ngày)
Chuyển gene	Lá	2.27 ± 0.05 ^a	32.00 ± 4.0 ^a	26.0 ± 2.0 ^a
	Cuống lá	-	-	-
	Đoạn thân	1.70 ± 0.11 ^b	16.00 ± 2.0 ^b	21.00 ± 2.0 ^b



Hình 2. Cảm ứng rễ tơ từ lá (A), đoạn thân (B) và cuống lá (C)

2.2.2. Ảnh hưởng của thời gian gây nhiễm đến hiệu quả cảm ứng rễ tơ

Để xác định thời gian gây nhiễm thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ, lá bồ đề *in vitro* được tạo vết cắt ngang qua gân chính nhằm tăng khả năng tiếp xúc với vi khuẩn, sau đó được ngâm trong dịch vi khuẩn OD_{600nm} đạt 0,8 – 0,85 trong thời gian từ 10 đến 40 phút; thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày. Kết quả được thể hiện trong **Bảng 3**.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian gây nhiễm đến khả năng tạo rễ tơ của lá bồ đề *in vitro*

Thời gian gây nhiễm (phút)	Số rễ trung bình (rễ/mẫu)	Tỉ lệ mẫu tạo rễ (%)	Thời gian xuất hiện rễ tơ (ngày)
10	2,10 ± 0,21 ^a	15,33 ± 1,15 ^c	25,53 ± 1,53 ^a
20	2,02 ± 0,09 ^a	36,67 ± 5,03 ^b	27,33 ± 2,52 ^a
30	2,20 ± 0,16 ^a	44,00 ± 6,00^a	26,67 ± 2,08 ^a
40	2,21 ± 0,45 ^a	21,33 ± 4,16 ^c	28,00 ± 1,73 ^a

2.2.3. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả cảm ứng rễ tơ

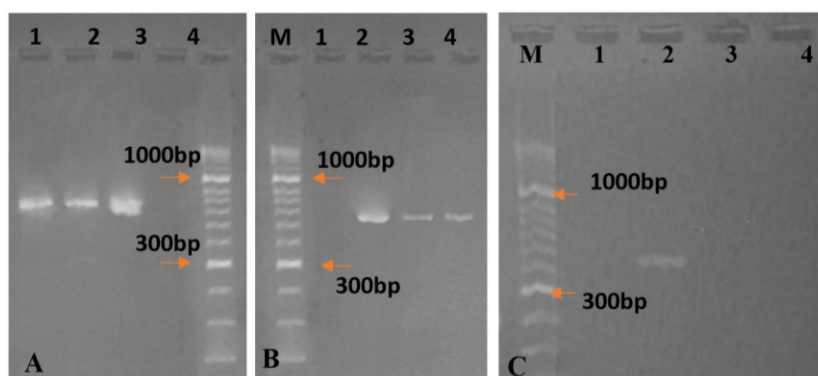
Nhằm xác định thời gian đồng nuôi cấy thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ trên cây bồ đề bằng vi khuẩn *A. rhizogenes* TR7, mẫu lá được tạo vết cắt và ngâm trong dịch vi khuẩn với thời gian 30 phút sau đó được đồng nuôi cấy trên môi trường MS từ 2 đến 6 ngày. Kết quả được thể hiện trong **Bảng 4**.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến khả năng tạo rễ tơ của lá bồ đề *in vitro*

Thời gian đồng nuôi cấy (ngày)	Số rễ trung bình (rễ/mẫu)	Tỉ lệ mẫu tạo rễ (%)	Thời gian xuất hiện rễ tơ (ngày)
2	2,08 ± 0,31 ^a	40,83 ± 3,82 ^c	30,33 ± 4,16 ^a
3	2,22 ± 0,26 ^a	51,67 ± 8,04 ^{bc}	29,67 ± 3,06 ^a
4	1,92 ± 0,49 ^a	59,17 ± 8,04 ^{ab}	26,67 ± 8,02 ^a
5	1,97 ± 0,44 ^a	66,67 ± 7,64^a	28,33 ± 4,16 ^a
6	1,94 ± 0,34 ^a	52,50 ± 9,01 ^{abc}	29,33 ± 2,52 ^a

2.2.4. Kiểm tra sự chuyển gene bằng kỹ thuật PCR

Bên cạnh những đặc điểm hình thái, sự xác nhận trạng thái biến đổi của rễ tơ đã được thực hiện bằng phân tích phân tử. Trong nghiên cứu này, plasmid DNA của *A. Rhizogenes* TR7, rễ tơ và rễ bình thường được phân tích bằng PCR. Kết quả được thể hiện trong **Hình 3**.



Hình 3. Xác nhận chuyển gene bằng PCR.

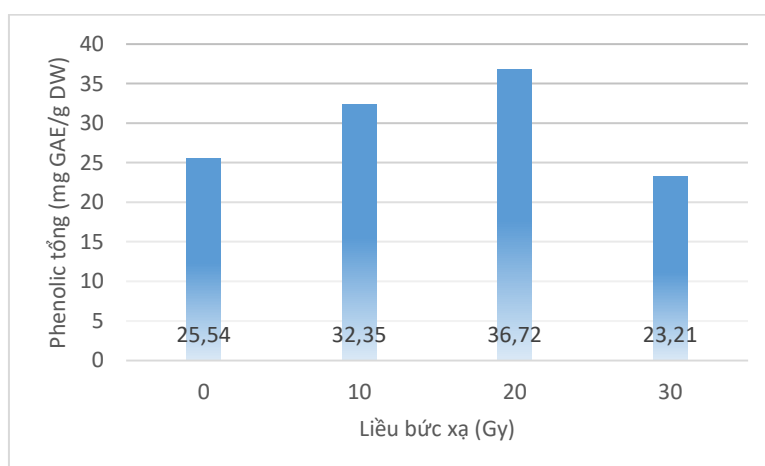
- A.** PCR khuếch đại gene *rolB* (780bp). Lane 1, 2: mẫu rễ tơ; Lane 3: *A. rhizogenes* plasmid DNA (chứng dương); Lane 4: rễ không chuyển gene (chứng âm).
- B.** PCR khuếch đại gene *rolC*. (540 bp). Lane 1: rễ không chuyển gene (chứng âm); Lane 2: *A. rhizogenes* plasmid DNA (chứng dương); Lane 3, 4: Mẫu rễ tơ.
- C.** PCR khuếch đại gene *virD*. (450 bp). Lane 1: rễ không chuyển gene (chứng âm); Lane 2: *A. rhizogenes* plasmid DNA (chứng dương); Lane 3, 4: mẫu rễ tơ.

2.2.5. Ảnh hưởng bức xạ gamma Cobalt-60 lên sự sinh trưởng phát triển và tích lũy hợp chất phenolic của rễ tơ bồ đề

Nhằm đánh giá ảnh hưởng của bức xạ gamma Cobalt-60 lên sự sinh trưởng phát triển và tổng hợp phenolic của rễ tơ bồ đề, rễ tơ được xử lý chiếu xạ ở dãy liều từ 0 (đối chứng) đến 40 Gy sau đó theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng, đặc điểm hình thái và hàm lượng phenolic tổng.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các liều chiếu xạ đến một số chỉ số tăng trưởng của rễ tơ

Liều (Gy)	Tỉ lệ sống (%)	Khối lượng tươi (g)	Chỉ số tăng trưởng	Khối lượng khô (%)
0	100,00 ± 0,0 ^a	0,362 ± 0,051 ^a	18,25 ± 1,39 ^a	15,04 ± 0,71 ^b
10	86,67 ± 13,33 ^b	0,284 ± 0,030 ^b	12,66 ± 1,19 ^b	14,05 ± 2,59 ^b
20	55,56 ± 10,18 ^c	0,184 ± 0,041 ^c	7,59 ± 1,18 ^c	14,13 ± 2,03 ^b
30	31,11 ± 10,18 ^d	0,161 ± 0,041 ^c	7,96 ± 2,51 ^c	22,25 ± 1,38 ^a
40	0,00 ± 0,0 ^e	-	-	-



Hình 4. Tác động của các liều chiếu xạ gamma lên hàm lượng phenolic tổng số

2.3. Bàn luận

2.3.1. Ảnh hưởng vật liệu, thời gian gây nhiễm và thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả cảm ứng rễ tơ

Kết quả khảo sát bộ phận thích hợp cảm ứng tạo rễ tơ cho thấy đối với bồ đề, lá là cơ quan thích hợp nhất cho việc cảm ứng tạo rễ tơ thông qua sự xâm nhiễm của *A. rhizogenes* TR7, tiếp theo là đoạn thân mang chồi bên với tỷ lệ tạo rễ tơ lần lượt tương ứng là $32,00 \pm 4,0\%$ và $16,00 \pm 2,0\%$; cuống lá không cho kết quả cảm ứng tạo rễ tơ. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây được thực hiện trên cây rau sam *Portulaca oleracea*, *Solanaceae* và cây đan sâm *Salvia miltiorrhiza* [11-13]. Theo Pavar và Maheshvari (2004), có sự khác nhau về tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ giữa các vật liệu là do phản ứng của các mô thực vật khác nhau với sự xâm nhiễm của vi khuẩn *A. rhizogenes* là khác nhau và phụ thuộc rất lớn vào trạng thái sinh lý của mô [14].

Kết quả ảnh hưởng của thời gian gây nhiễm đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ cho thấy tỉ lệ mẫu tạo rễ có xu hướng tăng dần tương ứng với thời gian gây nhiễm tăng từ 10 đến 30 phút; vượt quá 30 phút, tỉ lệ mẫu tạo rễ giảm. Thời gian gây nhiễm 30 phút là thời gian phù hợp nhất cho cảm ứng tạo rễ tơ trên lá bồ đề trong các nghiệm thức khảo sát đạt $44,00 \pm 6,00\%$. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng, thời gian gây nhiễm với *A. rhizogenes* cho hiệu quả chuyển gene phụ thuộc vào loài thực vật [15-17].

Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ cho thấy nhìn chung, tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ tăng theo thời gian đồng nuôi cấy từ 1 đến 5 ngày. Thời gian đồng nuôi cấy 5 ngày có tỷ lệ tạo rễ cao nhất đạt $66,67 \pm 7,64\%$, thời gian đồng nuôi cấy dài hơn 5 ngày không những không làm tăng tỷ lệ mẫu hình thành rễ mà ngược lại xuất hiện một số mẫu chết bởi tế bào vi khuẩn bao quanh, gây thối đen vết cắt do sự phát triển quá mức của vi khuẩn. Kết quả tương tự trong nghiên cứu trên *Plumbago zeylanica* L. [18].

2.3.2. Kiểm tra sự chuyển gene bằng kỹ thuật PCR

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, trong 2 mẫu rễ cảm ứng có sự xuất hiện vạch băng DNA kích thước 780 bp (giếng 1 và 2_Hình 3.A) và 540 bp (giếng 3 và 4_Hình 3.B) và trùng vị trí với đối chứng dương. Như vậy, 2 mẫu rễ tơ này có thể là rễ tơ chuyển gene chứa gene *rolB* và *rolC* trong genome.

Để loại trừ khả năng gene *rolB*, *rolC* có mặt trong 2 mẫu rễ tơ là do vi khuẩn *A. rhizogenes* còn tồn tại trong rễ, phản ứng PCR với cặp mồi *virDF* và *virDR* được thực hiện để khuếch đại gene *virD* một gene gây độc có mặt ở vùng gene *vir* của Ri-plasmid và không được chuyển vào genome thực vật trong quá trình lây nhiễm. Kết quả cho thấy, 2 mẫu rễ tơ (giếng 3 và 4_Hình 3.C) không xuất hiện vạch băng tương ứng với kích thước của gene *virD*. Điều này chứng tỏ 2 mẫu rễ tơ này là 2 mẫu rễ tơ chuyển gene.

2.3.3. Ảnh hưởng bức xạ gamma Cobalt-60 lên sự sinh trưởng phát triển và tích lũy hợp chất phenolic của rễ tơ bồ đề

Kết quả thu được cho thấy tỉ lệ sống, khối lượng tươi và chỉ số tăng trưởng giảm khi tăng liều bức xạ từ 10 đến 40. Kết quả này có thể được giải thích dựa vào sự tương tác của bức xạ gamma với các nguyên tử và phân tử trong tế bào để tạo ra các gốc tự do từ đó có khả năng làm thay đổi các thành phần quan trọng của tế bào thực vật. Những gốc tự do này đã được chứng minh là có ảnh hưởng đến hình thái, giải phẫu, sinh hóa và sinh lý của thực vật. Một số kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng gây đột biến bằng tia phóng xạ có thể làm thay đổi kiểu hình và giảm khả năng sinh trưởng ở callus [19], cây con [20] và protocorm-like bodies [21].

Có sự khác biệt rõ rệt hàm lượng phenolic của rễ tơ tại các liều chiếu xạ khác nhau. Hàm lượng phenolic tổng cao nhất tại liều chiếu 20 Gy đạt $36,72$ mg GAE/g DW gấp 1,44 lần so với đối chứng là $25,54$ mg GAE/g DW; rễ tơ tại liều chiếu 30 Gy có hàm lượng phenolic

tổng thấp nhất 23,21 mg GAE/g DW. Kết quả này cũng tương tự với một số nghiên cứu khi khảo sát ảnh hưởng của bức xạ đến các vật liệu *in vitro* ở trong khoảng liều gây chết 50 % [22-24]. Sự tăng hàm lượng phenolic của rễ tơ dưới tác dụng của bức xạ gamma có thể được giải thích do sự gây ra stress oxy hóa, các tế bào rễ tơ sản xuất các hợp chất phenolic chống lại stress này bằng cách tăng cường hoạt động của các enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa phenolic hoặc do sự phân giải các hợp chất phenolic phức tạp.

3. KẾT LUẬN

Mô lá là vật liệu thích hợp nhất cho cảm ứng tạo rễ tơ bằng vi khuẩn *A. rhizogenes* TR7. Tần số cảm ứng cao nhất đạt $66,67 \pm 7,64$ % với mô lá bị gây nhiễm trong thời gian 30 phút, đồng nuôi cây 5 ngày. Kết quả kiểm tra PCR để xác nhận quá trình chuyển gene bằng *A. rhizogenes* cho phản ứng dương tính với gene mục tiêu *rolB*, *rolC* và âm tính với gene *virD* chứng tỏ các mẫu rễ tơ đã chuyển gene thành công.

Bức xạ gamma ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng và hàm lượng phenolic tổng số của rễ tơ. Dưới tác động của bức xạ gamma, hàm lượng phenolic cao nhất đạt được với mẫu rễ tơ chiếu xạ tại liều 20 Gy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ruby Tiwari, C.S.Rana. "Plant secondary metabolites: a review", *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670, 2015.
2. Chăm Thị Ính, Trần Hồng Quang, Hoàng Thanh Hương, Châu Văn Minh, Phan Văn Kiệm. "Một megastigman glycoside mới từ lá cây đề *Ficus religiosa* L. (Moraceae)", *Tạp chí Hóa học*, 47(1), 81-84, 2009.
3. Chăm Thị Ính, Trần Hồng Quang, Hoàng Thanh Hương, Châu Văn Minh, Phan Văn Kiệm. "Axit shikimic và các axit phenolic phân lập từ vỏ cây đề *Ficus religiosa* L. (Moraceae)", *Tạp chí Hóa học*, 49(3), 367-370, 2011.
4. Hoàng Thanh Hương, Trần Hồng Quang, Chăm Thị Ính, Châu Văn Minh, Phan Văn Kiệm. "Phân lập và xác định hai cấu trúc dẫn xuất C13 nor-isoprenoid từ lá cây đề *Ficus religiosa* L. (Moraceae)", *Tạp chí Hóa học*, 47(6), 629-633, 2009.
5. Mohsen Hesami, Mohammad Hosein Daneshvar and Mohsen Yoosefzadeh-Najafabadi. "Establishment of a Protocol for in vitro Seed Germination and Callus Formation of *Ficus religiosa* L., an Important Medicinal Plant", *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, In Press (In Press):e62682, doi: 10.5812/jjnpp.62682, 2018.
6. Varsha Parasharami, Priya Yadav, Shilpa Mandkulkar and Sushama Gaikwad. "*Ficus religiosa* L.: Callus, Suspension Culture and Lectin Activity in Fruits and *In vitro* Regenerated Tissues", *British Biotechnology Journal*, 4(2), 215-227, 2014.
7. https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?recNum=1&queryString=EN_ALLTXT%3A%28A+process+for+preparing+a+hairy+root+culture+extract+of+Ficus+religiosa+L.+having+induced+acetylcholinesterase+inhibitory+activity+%29&office=&sortOption=Relevance&prevFilter=&maxRec=3&navig=previous
8. Ashouri Sheikhi A, Hassanpour H, Jonoubi P et al. The Effect of Gamma Irradiation on In vitro Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Ferula gummosa* Bioss. *Journal of Medicinal Plants*, 15(59), 122-131 (2016).
9. Chakravarty B and Sen, S. "Enhancement of regeneration potential and variability by γ -irradiation in cultured cells of *Scilla indica*", *Biologia plantarum*, 44(2), 189-193, 2001.
10. Ramazan Beyaz and Mustafa Yildiz. "The Use of Gamma Irradiation in Plant Mutation Breeding". *Plant Engineering*, Chapter 3, 32-42, 2017.
11. Pirian, K. Piri, T. Ghiyasvand. "Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production", *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.*, 3, 642-649, 2012.
12. P.K. Pawar, V.L. Maheshwari. "Agrobacterium Rhizogenes Mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae", *Indian Journal of Biotechnology*, 3(3), 414-417, 2004.
13. Ninh Thị Thảo, Lê Tiên Vinh, Lê Hoàng Anh, Nguyễn Thị Thủy, Nguyễn Thị Phương Thảo. "Nghiên cứu cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ cây đàn sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)". *Tạp chí*

- Khoa học và Phát triển*, 13(2), 251-258, 2015.
14. Pavar P. K., Maheshvari V.. “*Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family solanaceae”. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 414-417, 2004.
 15. Romero FR, Delate K, Kraus GA, Solco AK, Murphy PA, Hannapel DJ. “Alkamide production from hairy root cultures of *Echinacea*”. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 45 (5), 599-609, 2009.
 16. Samadi A, Carapetian J, Heidari R, Jafari M, Gorttapeh AH. “Hairy root induction in *Linum mucronatum* ssp *mucronatum*, an anti-tumor lignans producing plant”. *Not Bot Horti Agrobot*, 40(1), 125–131, 2012.
 17. Thwe A, Valan Arasu M, Li X, Park CH, Kim SJ, Al-Dhabi NA, Park SU (2016). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Front Microbiol*, 7:318, 2016.
 18. Sivanesan, B.R. Jeong. “Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L.”, *Journal of Biotechnology*, 8, 5294-5300, 2009.
 19. Ashouri Sheikhi A, Hassanpour H, Jonoubi P et al. “The Effect of Gamma Irradiation on *In vitro* Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Ferula gummosa* Bioss”. *Journal of Medicinal Plants*, 15(59), 122-131, 2016.
 20. Nor A Hasbullah, Rosna M Taha, Azani Saleh, “Noraini Mahmud. Irradiation effect on *in vitro* organogenesis, callus growth and plantlet development of *Gerbera jamesonii*. *Horticultura Brasileira* 30: 252-257 (2012).
 21. Raheleh Dehgahi, Alireza Joniyasa. Gamma Irradiation-Induced Variation in *Dendrobium Sonia-28* Orchid Protocorm-Like Bodies (PLBs)”, *Fungal Genomics & Biology*, 7(2), 1000151, 2017.
 22. Mohamed AA.. “Effect of low dose gamma irradiation on some phytochemicals and scavenger ability of *in vitro* culantro (*Eryngium foetidum* L.) plantlets”. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*. 3, 32–36, 2009.
 23. Taheri S, Abdullah TL, Karimi E, Oskoueian E, Ebrahimi M.. “Antioxidant capacities and total phenolic contents enhancement with acute gamma irradiation in *Curcuma alismatifolia* (Zingiberaceae) leaves”, *Int J Mol Sci*, 15, 13077–13090, 2014.
 24. Khalil SA, Ahmad N, Zamir R.. “Gamma radiation induced variation in growth characteristics and production of bioactive compounds during callogenesis in *Stevia rebaudiana* (Bert.)”, *New Negat Plant Sci.*, 1(2), 1–5, 2015.

THE EFFECT OF COBALT 60 GAMMA RADIATION ON GROWTH AND TOTAL PHENOLIC CONTENT OF SACRED FIG *FICUS RELIGIOSA* L. HAIRY ROOTS

HA THI NGOC TRINH¹, ĐOAN PHAM NGOC NGA¹, CAO THI BANG GIANG¹

¹*Center of Nuclear Techniques in Ho Chi Minh city_ 217 Nguyen Trai Street, District 1, HCM city*
ngoctrinhathi@gmail.com, dpngocnga@gmail.com, caothibanggiang@gmail.com

Abstract: This study was carried out to induce the hairy roots of *F. religiosa* L. and investigate the effects low doses of gamma irradiation on growth characteristics and accumulation of phenolic compound of *F. religiosa* L. hairy roots.

In vitro leaves, leaf stalks and inter nodes of *F. religiosa* L. were submerged in the *A. rhizogenes* TR7 suspension medium, co-culture them on MS medium (supplemented with 3 % sucrose, 8 g/L agar, pH 5.8) in darkness, at 25 °C.

Hairy roots appeared after 3 - 4 weeks were transferred into liquid MS medium supplemented with 20 g/L sucrose that the best medium for growth hairy roots. After 4 weeks, vigorous hairy roots were irradiated at low doses ranging from 0 to 40 Gray (Gy). The source of gamma rays was Cobalt 60

The results indicated that among of three materials (leaves, leaf stalk and inter node) infiltrated by *A. rhizogenes* TR7, leaves were the best appropriate materials to the bacteria genetic transformation with success induction after 30 minutes of infection and five days of co-cultivation at 66.67 ± 7.64 %. The hairy roots from *A. rhizogenes* TR7 was confirmed by PCR method using *rolB*, *rolC* gene and *virD* gene. Co-60 gamma radiation made a significant decline in survival rate, fresh and dry weight in comparison with control. However, at dose of 30 Gy dry weight marginally increased at (22.25 ± 1.38 %) higher than control (15.04 ± 0.71 %). Whereas at 20 Gy the highest total phenolic content recorded 36.72 mg GAE/g DW higher 1.44 times than the control.

Key word: hairy roots, gamma radiation, *Agrobacterium rhizogenes* TR7, *Ficus religiosa* L.