



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0001895

(51)⁷ **A01H 1/06, 4/00, 3/04, C12N 15/00,** (13) **Y**
15/05

(21) 2-2018-00065

(22) 22.12.2014

(67) 1-2014-04284

(45) 25.12.2018 369

(43) 27.06.2016 339

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)**

A10, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Chu Hoàng Hà (VN), Phạm Bích Ngọc (VN), Nguyễn Đình Trọng (VN), Nguyễn Khắc Hưng (VN)**

(74) **Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)**

(54) **QUY TRÌNH TẠO RỄ TƠ TỪ THÂN RỄ SÂM NGỌC LINH (PANAX VIETNAMENSIS HA ET GRUSHV) NHỜ VI KHUẨN AGROBACTERIUM RHIZOGENES**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tạo rễ tơ từ thân rễ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* làm cơ sở nuôi cấy sinh khối rễ tơ sâm Ngọc Linh tạo nguyên liệu trong sản xuất dược phẩm, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm. Quy trình này bao gồm các bước tạo nguyên liệu chuyển gen, tạo dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy, diệt khuẩn sau đồng nuôi cấy, chọn lọc và tái sinh dòng chuyển gen, và kiểm tra biểu hiện của gen rol.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ gen, cụ thể là đề cập đến việc xây dựng quy trình chuyển gen tạo rễ tơ ở cây sâm Ngọc Linh thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* làm cơ sở nuôi cấy sinh khối rễ tơ sâm Ngọc Linh tạo nguyên liệu trong sản xuất dược phẩm, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sâm Ngọc Linh là loại dược liệu quý hiếm, chỉ phân bố ở vùng núi cao trong sơn hệ Ngọc Linh thuộc một số ít huyện của Kon Tum và Quảng Nam. Năm 1973, cây sâm Ngọc Linh đầu tiên được dược sĩ Đào Kim Long và các nhà khoa học phát hiện ở độ cao khoảng 1800m ở vùng núi Ngọc Linh thuộc Kon Tum. Và tới năm 1988, TS. Hà Thị Dung và GS. Grushvisky đã xác định đây là một loài nhân sâm mới của thế giới và đặt tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, thường được gọi là sâm Việt Nam.

Nhiều công trình nghiên cứu về công dụng sâm Ngọc Linh cho thấy thành phần hóa học của rễ sâm Ngọc Linh chủ yếu là saponin. Phân tích các hợp chất hóa học trong rễ củ sâm Ngọc Linh chứa tới 52 saponin (Nguyễn Minh Đức và cộng sự, 1997). Trong 52 saponin tách chiết được từ rễ sâm Ngọc Linh có 26 loại saponin đã biết trong các loài sâm khác và có đến 26 saponin mới mà đại diện là nhóm Vina - ginsenosit (VR1- VR25). Bên cạnh đó, ngoài các nhóm triterpen saponin, trong rễ sâm Ngọc Linh còn chứa một số ocotillol saponin như Majonosit (MR1 và MR2). Như vậy, sâm Việt Nam là một trong những loại sâm có hàm lượng saponin nhiều nhất, tương tự một số cây sâm quý đã từng được nghiên cứu sử dụng từ lâu trên thế giới.

Theo sách “ Cây thuốc và động vật làm thuốc của Việt Nam”, sâm Ngọc Linh có các tác dụng như tăng cường sức lực, cải thiện thể lực; bổ thần kinh,

tăng cường trí nhớ và hoạt động của hệ thần kinh; chống stress và giảm gốc tự do; giảm đau, chống viêm; bên cạnh đó, sâm Ngọc Linh còn có khả năng điều hòa tim mạch, làm giảm lipid trong máu và ngăn ngừa chứng xơ vữa động mạch.

Do giá trị dược liệu cũng như giá trị kinh tế lớn, sâm Ngọc Linh đang bị khai thác quá mức, bên cạnh đó, khả năng nảy mầm từ hạt trong môi trường tự nhiên của sâm Ngọc Linh thấp gây cạn kiệt nguồn tài nguyên trong tự nhiên. Sâm Ngọc Linh đã được đưa vào danh mục các thực vật nguy cấp trong sách đỏ Việt Nam năm 1994 để bảo tồn.

Nhiều đề tài khoa học được thực hiện với mục đích bảo tồn và phát triển sâm Ngọc Linh như i) nghiên cứu nhân giống cây sâm Ngọc Linh, nghiên cứu về điều kiện trồng trọt: chế độ phân bón đa lượng, vi lượng, các yếu tố kỹ thuật để nâng cao năng suất, rút ngắn thời gian thu hoạch như phá thời kỳ ngủ đông, nhổ cây trồng lại hàng năm, v.v., và ii) nghiên cứu nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh. Đây được xem là giải pháp tối ưu để bảo tồn loài sâm Ngọc Linh, bên cạnh đó còn có khả năng phát triển sản xuất sâm Ngọc Linh thương phẩm. Tuy nhiên, do thời gian sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh dài, khả năng thích ứng với tự nhiên của cây nuôi cấy mô còn yếu nên sản lượng sâm Ngọc Linh thu được vẫn còn hạn chế.

Đứng trước tình hình trên, bên cạnh việc ứng dụng nghiên cứu khoa học vào nhân giống vô tính, trồng và bảo tồn cây sâm Ngọc Linh, một vấn đề đặt ra là cần triển khai, phát triển sinh khối tế bào thực vật tạo nguồn nguyên liệu ổn định cho các ngành công nghiệp khác.

Nuôi cấy sinh khối tế bào thực vật là một hướng ứng dụng mới của công nghệ sinh học, giải pháp này cho phép thu một lượng lớn sinh khối tế bào thực vật trong thời gian ngắn, tạo nguồn nguyên liệu phong phú, ổn định cho các lĩnh vực khác như sản xuất dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm. Hiện nay, có nhiều hướng nghiên cứu nuôi cấy sinh khối đã được áp dụng cho các đối tượng sâm khác nhau trên thế giới.

Patent Mỹ số US6326202B1, Archana Mathur và cộng sự mô tả phương pháp nuôi cấy mô sẹo cho sản lượng ginsenosit cao, phát triển ổn định trên đối tượng cây sâm Mỹ *Panax quinquefolium*. Mẫu thân rễ sâm Mỹ được tiết trùng và chuyển lên môi trường MS có bổ sung 1mg/l 2,4D và 0,25mg/l kinetin. Dòng mô sẹo có khả năng sinh trưởng tốt cũng như hàm lượng ginsenosit cao được nhân nuôi sinh khối trên môi trường MS có bổ sung 200mg/l myo-inositol, 2,0 – 4,0mg/l glyxin, 0,5 – 1,0mg/l axit nicotinic, 0,5 – 2,0mg/l pyridoxin.HCl và 0,2 – 0,4mg/l thiamin.HCl, 0,1 – 0,5mg/l 2,4D và 0,25 – 0,50mg/l kinetin.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN102898493A đưa ra phương pháp nuôi cấy sinh khối rễ bất định sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng* CA May) trong các bình lên men dung tích nhỏ 3 – 10L. Các đoạn rễ bất định được cắt thành các đoạn có độ dài 1cm sau đó chuyển vào các bình lên men dung tích 3L chứa 2L môi trường ½SH có bổ sung 3mg/l và 20g/l sacaroza. Hàm lượng Rg1, Rb1 và Re tích lũy trong rễ bất định sâm Hàn Quốc sau 7 tuần nuôi cấy lần lượt đạt 2,81mg/g, 0,47mg/g và 1,88mg/g.

Các phương pháp nuôi cấy sinh khối tế bào thu hợp chất thứ cấp đã được ứng dụng trên đối tượng sâm Ngọc Linh.

Công trình của Dương Tấn Nhựt và cộng sự đăng trên Tạp chí Công nghệ sinh học tập 7 số 3 năm 2009, cho thấy nhóm tác giả đã thành công trong việc tạo rễ bất định sâm Ngọc Linh từ mô sẹo. Các khối mô sẹo được chuyển lên môi trường SH chứa các chất điều hòa sinh trưởng NAA, IBA và IAA để khảo sát khả năng hình thành rễ bất định. Kết quả thu nhận được tỷ lệ tạo rễ cao nhất khi môi trường chứa 3mg/l NAA hoặc 5mg/l IBA.

Bằng độc quyền sáng chế số VN 1-0007523, nhóm tác giả Học viện Quân Y đưa ra giải pháp nuôi cấy dịch huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh thu hoạt chất thứ cấp. Các mẫu cây sâm Ngọc Linh 2-5 năm tuổi được tiết trùng, sau đó được cắt thành các mẫu nhỏ dày 1mm và đặt lên môi trường tạo mô sẹo có chứa một trong các chất điều tiết sinh trưởng như 2,4 D, NAA ở nồng độ 5 – 30μM kết

hợp 5 – 15 μ M kinetin. Mô sẹo được cấy chuyển nhiều lần mất khả năng biệt hóa được chuyển lên môi trường chứa 10 – 20 μ M kinetin và 10 – 40 μ M auxin nuôi lỏng lắc thu sinh khối dịch huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh.

Như vậy, cũng như một số loài sâm trên thế giới sâm Ngọc Linh hiện đã được nghiên cứu nuôi cấy thu sinh khối theo hướng nuôi dịch huyền phù tế bào và rễ bất định. Tuy nhiên, cả hai phương pháp này có nhược điểm là cần phải bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng vào trong môi trường nuôi cấy để sinh khối phát triển. Theo phương pháp này, dư lượng chất điều hòa sinh trưởng trong sinh khối thu nhận được có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe của người sử dụng. Khắc phục nhược điểm của các phương pháp trên, kỹ thuật nuôi cấy sinh khối rễ tơ đã được ứng dụng trên nhiều đối tượng thực vật nhằm thu hoạt chất sinh học.

Rễ tơ là tên một loại bệnh ở thực vật gây ra do vi khuẩn đất, gram âm *Agrobacterium rhizogenes* gây ra. Đây là một loại vi khuẩn gây bệnh mọc rễ tại các vết thương ở thực vật bậc cao. Trong tự nhiên, rễ tơ có khả năng phát triển mạnh, gây ảnh hưởng cho cây chủ và làm cho cây chết. Khả năng gây bệnh của *Agrobacterium rhizogenes* đã được chứng minh là do sự có mặt của pRi (plasmid root induction). Plasmid này mang một đoạn T-ADN có khả năng được chuyển và tích hợp vào hệ gen tế bào vật chủ và kích thích tạo rễ tơ do chứa các gen tạo rễ như: *rolA*, *rolB*, *rolC*, v.v.. Về bản chất rễ tơ phát sinh từ những tế bào thực vật mang một đoạn gen gây bệnh của *Agrobacterium rhizogenes*, do đó những tế bào này vẫn mang đầy đủ bộ gen vốn có và vẫn có khả năng tổng hợp những hoạt chất có trong thực vật. Dựa trên những đặc điểm này các nhà khoa học đã tìm cách chuyển đoạn gen gây bệnh rễ tơ vào thực vật một cách có chủ ý. Rễ tơ có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa chất điều hòa sinh trưởng, có khả năng nuôi cấy trong các bình lên men dung tích lớn, sản phẩm thu nhận sạch hơn do không có dư lượng chất điều hòa sinh trưởng. Rễ tơ đang được nghiên cứu ứng dụng trên nhiều đối tượng thực vật để thu hoạt chất sinh học phục vụ cho các mục đích nghiên cứu và ứng dụng trong y dược.

Nghiên cứu của Yu K.W và cộng sự tại đại học Quốc gia Chungbuk, Hàn Quốc đăng trên tạp chí *Acta Horticulturae* số 597 năm 2003 đã thành công trong việc nuôi cấy rễ tơ sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng* CA May). Kết quả cho thấy rễ tơ sâm Hàn Quốc hình thành khi lây nhiễm rễ, lá và cuống lá với vi khuẩn *A.rhizogenes* KCTC 2703. Bên cạnh đó, nghiên cứu đã thu nhận thành công ginsenosit từ sinh khối rễ tơ sâm Hàn Quốc sau 30 ngày nuôi cấy trong bình lên men dung tích 5L.

Archana Mathur và cộng sự đã tạo thành công rễ tơ cây sâm Mỹ *Panax quinquefolium* khi lây nhiễm lá mầm, thân mầm, rễ và lá thật của cây nảy mầm từ hạt sau 25 đến 30 ngày với các chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* khác nhau ATCC15834, LBA 9402 và ATCC 11325. Nhóm tác giả cho thấy sinh khối rễ tơ sâm Mỹ có thể tăng gấp 10 lần sau 8 tuần nuôi cấy. Bên cạnh đó, thành phần saponin thu nhận từ sinh khối rễ tơ đã được xác định bao gồm Rb2, Rd, Re, Rf, Rg1 và hàm lượng ginsenosit tổng số vào khoảng 47–49%. Công trình nghiên cứu được công bố trên tạp chí *Biotechnology Letters* tập 32 số 3 năm 2010.

Bên cạnh vật liệu chuyển gen có nguồn gốc từ cây mầm như thân mầm hay lá mầm, thân rễ cũng được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình chuyển gen tạo rễ tơ ở một số loài sâm trên thế giới như sâm Mỹ (*Panax quinquefolium*) hay sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng* CA May).

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số KR1020030091291 (Yu Yong Bong và cộng sự, 2005) đưa ra phương pháp chuyển gen tạo rễ tơ trên nguồn mẫu rễ sâm rừng Hàn Quốc (*Panax schinseng* NESS) tự nhiên. Mẫu thân rễ sâm rừng được tiệt trùng, sau đó được cắt thành các lát cắt mỏng và tiên nuôi cấy trên môi trường không chứa kháng sinh trong 7 ngày. Sau thời gian tiên nuôi cấy, các mẫu lát cắt được chuyển gen theo các bước sau: lây nhiễm, đồng nuôi cấy và diệt khuẩn. Mẫu lát cắt được lây nhiễm trong thời gian 5 phút, đồng nuôi

cấy trong 3 đến 7 ngày sau đó tiến hành diệt khuẩn với môi trường bổ sung kháng sinh diệt khuẩn.

Đối với đối tượng sâm Ngọc Linh, hiện nay đã có một số nghiên cứu bước đầu trong xây dựng quy trình chuyển gen tạo rễ tơ trên đối tượng loài sâm này.

Trần Thị Ngọc Hà và nhóm tác giả Viện Sinh học Nhiệt đới công bố trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập 51, số 5B (2013) bước đầu đưa ra phương pháp chuyển gen tạo rễ tơ trên đối tượng sâm Ngọc Linh thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* trên nguồn nguyên liệu cuống lá.

Hà Thị Loan và nhóm tác giả Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh công bố trên Tạp chí Sinh học, tập 36 (1se) (2014) về tạo rễ tóc trên đối tượng sâm Ngọc Linh sử dụng phương pháp chuyển gen *rol* nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. Công trình sử dụng nguồn vật liệu chuyển gen là lá và cuống lá sâm Ngọc Linh *in vitro* 2-3 tháng tuổi. Tỷ lệ chuyển gen thu nhận được lần lượt là 3,3% đối với mẫu lá và 14,8% đối với mẫu cuống lá.

Cho đến nay chưa có một tài liệu nào trong nước cũng như trên thế giới công bố phương pháp chuyển gen tạo rễ tơ vào mẫu thân rễ sâm Ngọc Linh cho hiệu quả chuyển gen cao. Do đó, cần có quy trình chuyển gen cho hiệu quả chuyển gen cao và sinh khối rễ sâm lớn để phục vụ vào mục đích sản xuất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến quy trình tạo rễ tơ từ rễ sâm Ngọc Linh thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a. tạo nguyên liệu chuyển gen: cắt ngang thân rễ sâm Ngọc Linh tự nhiên từ 2 năm tuổi trở lên, có đường kính củ từ 1cm đến 1,5cm; sau đó cảm ứng mẫu trên môi trường MT1 bao gồm môi trường SH có bổ sung 3% sacaraza, 0,5 - 1mg/l auxin (IAA, IBA hoặc NAA), 50 - 100 μ M axetosyringon và 7,5 g/l agar; độ pH là 5,8;

b. tạo dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*: hòa tan cặn khuẩn sau ly tâm với môi trường ½SH có bổ sung 10 – 100mM glucoza hoặc galactoza và 50 – 200μM axetosyringon, điều chỉnh mật độ vi khuẩn đạt giá trị OD₆₀₀ trong khoảng 0,3 đến 0,7;

c. nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy: gây tổn thương lát cắt ngang thân rễ sâm Ngọc Linh tự nhiên từ 2 năm tuổi trở lên có độ dày từ 0,2cm đến 0,3cm, đường kính lát cắt từ 1cm đến 1,5cm bằng sóng siêu âm từ 30 giây đến 3 phút, sau đó gây nhiễm mẫu bằng sóng siêu âm với dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* trong thời gian từ 10 phút đến 30 phút, sau đó thấm khô mẫu bằng giấy thấm và đặt trên môi trường SH đồng nuôi cấy từ 2 ngày đến 3 ngày trong điều kiện tối ở nhiệt độ từ 22°C đến 25°C;

d. diệt khuẩn sau đồng nuôi cấy: rửa các mẫu sau khi đồng nuôi cấy từ 1 đến 2 lần bằng nước cất khử trùng, tiếp đó rửa với nước cất khử trùng có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn trong 5 đến 10 phút, thấm khô mẫu bằng giấy thấm khử trùng;

e. chọn lọc và tái sinh dòng chuyển gen: chuyển các lát cắt lên môi trường chọn lọc không chứa chất điều hòa sinh trưởng MT2 bao gồm môi trường SH có bổ sung 3% sacaroza, kháng sinh diệt khuẩn và 7,5g/l agar, nuôi cấy trong 1 tháng, sau đó tách các đoạn rễ tơ sang môi trường MT2 mới với chu kỳ cấy chuyển 3 đến 4 tuần/chu kỳ, sau 3 đến 5 chu kỳ chọn lọc các mẫu rễ tơ sống sót thành các dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh; và

f. kiểm tra biểu hiện của gen *rol* bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu gen *rol*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình chuyển gen tạo rễ tơ thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* hoàn chỉnh trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*), khác biệt ở chỗ quy trình này sử dụng lát cắt ngang thân rễ sâm Ngọc Linh làm nguyên liệu chuyển gen thông qua *Agrobacterium rhizogenes*. Các mẫu biến nạp được diệt khuẩn và chuyển lên

môi trường không chứa chất điều hòa sinh trưởng để chọn lọc. Các dòng rễ tơ sinh trưởng, phát triển tốt trên môi trường không chứa chất điều hòa sinh trưởng được kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển bằng phản ứng PCR.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng sinh khối rễ tơ sâm Ngọc Linh làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm chức năng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng sinh khối rễ tơ sâm Ngọc Linh làm nguyên liệu sản xuất mỹ phẩm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng sinh khối rễ tơ sâm Ngọc Linh làm nguyên liệu sản xuất dược phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện ảnh chụp mẫu củ sâm Ngọc Linh tự nhiên 2,5 năm tuổi.

Hình 2 thể hiện ảnh chụp kích thước lát cắt củ sử dụng trong chuyển gen tạo rễ tơ sâm Ngọc Linh, trong đó hình (a) là đường kính lát cắt củ từ 1 – 1,5cm và hình (b) là độ dày lát cắt từ 0,2 – 0,3cm.

Hình 3 thể hiện ảnh chụp các mẫu thân rễ sâm Ngọc Linh trên môi trường đồng nuôi cấy SH.

Hình 4 thể hiện ảnh chụp các mẫu cấy phát sinh rễ tơ sau 4 tuần trên môi trường MT2.

Hình 5 thể hiện ảnh chụp rễ tơ hình thành phát triển trên môi trường MT2.

Hình 6 thể hiện ảnh chụp rễ tơ sâm Ngọc Linh phát triển ổn định trên môi trường MT2.

Hình 7 thể hiện ảnh chụp kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen *rolA*, *rolB* và *rolC* ở các dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh, trong đó các giếng từ 1 đến 4 lần lượt là các dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh số từ 1 đến 4, giếng (+) là đối

chứng dương PCR với vi khuẩn Ri-plasmid từ *A. rhizogenes* ATCC15834 và giếng M là thang ADN chuẩn kích thước 1kb.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để thực hiện các mục tiêu trên, tác giả của sáng chế đã nghiên cứu sâu rộng và tìm ra được quy trình tạo rễ tơ từ thân rễ thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* hoàn chỉnh trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*). Trong đó, quy trình này bao gồm các bước tạo nguyên liệu chuyển gen; tạo dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*; nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy; diệt khuẩn sau đồng nuôi cấy; chọn lọc và tái sinh dòng chuyển gen; và kiểm tra biểu hiện của gen *rol*.

Trong phần mô tả dưới đây, các bước của quy trình sẽ được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần hiểu rằng, sẽ có nhiều phương án và phương pháp khác nhau để tiến hành các bước nêu trên. Do đó, các phương án và phương pháp như vậy cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

a. Tạo nguyên liệu chuyển gen

Việc chuyển gen tạo rễ tơ ở đối tượng cây sâm Ngọc Linh thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* được tiến hành trên nguồn mẫu củ tự nhiên. Mẫu củ sâm Ngọc Linh từ 2 năm tuổi trở lên có đường kính củ từ 1cm đến 1,5cm thu nhận tại nhà lưới của Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình chuyển gen. Cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên được rửa sạch đất bám dưới dòng nước chảy liên tục, cùng lúc đó, dùng dao cắt bỏ cọng lá và rễ phụ chỉ thu thân củ. Thân củ được tiệt trùng sơ bộ với nước cất và chất tẩy rửa trong 10 đến 15 phút, sau đó rửa sạch lại với nước cất. Mẫu củ đã tiệt trùng sơ bộ được đưa vào tủ cấy để tiến hành tiệt trùng mẫu. Rửa mẫu với nước cất tiệt trùng từ 2 đến 5 lần, mỗi lần 10 đến 15 phút. Tiệt trùng mẫu bằng cồn 90° trong 1 phút. Rửa sạch cồn với nước cất tiệt trùng. Tiệt trùng mẫu với HgCl₂

0,1% trong 15 đến 20 phút. Rửa sạch HgCl_2 0,1% bằng nước cất tiệt trùng. Sau đó, làm khô mẫu bằng giấy thấm tiệt trùng và cắt mẫu thành các lát cắt có đường kính từ 1 đến 1,5cm và độ dày 0,2 đến 0,3cm. Đặt mẫu trên môi trường cảm ứng SH (môi trường Schenk and Hildebrandt, 1972) có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng 0,1 đến 1mg/l auxin (IBA, IAA hoặc NAA) và axetosyringon 50 đến 100 μM (MT1).

Mẫu thân rễ sâm Ngọc Linh có độ tuổi từ 2 năm tuổi trở lên có chứa nhiều thành phần dinh dưỡng giúp các lát cắt có tỷ lệ sống sót cao trong quá trình chuyển gen, giúp góp phần cải thiện tỷ lệ chuyển gen hơn so với các mẫu lá và cuống lá chứa ít chất dinh dưỡng dự trữ. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng có mối tương tác giữa sự có mặt của auxin và sự biểu của gen *rolB* - một trong các gen *rol* có chức năng biểu hiện rễ tơ. Ở cây cà rốt, nếu chỉ có 1 mình gen *rolB* thì không thể hiện kiểu hình rễ tơ, auxin là cần thiết cho việc tạo rễ tơ và có thể được cung cấp bởi các gen mã hóa cho các enzym sinh tổng hợp auxin IAA nằm trên vùng T_R -ADN (Tomy Michael and Angelo Spen, 1995).

Quá trình bổ sung auxin vào trong môi trường cảm ứng giúp lát cắt mẫu tích tụ được một lượng auxin cần thiết từ môi trường, lượng auxin này có tác dụng cảm ứng hoạt động của các gen *rol* sau khi được chuyển vào tế bào thực vật và giúp cải thiện hiệu quả chuyển gen.

b. Tạo dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*

Môi trường nuôi khuẩn (Yeast Manitol Broth-YMB) được chuẩn bị trên đĩa petri. Lấy khuẩn từ ống giữ chủng *A. rhizogenes* và cấy rìa trên môi trường nuôi khuẩn đã được chuẩn bị, đặt đĩa khuẩn trong tủ ôn nhiệt 28°C trong thời gian 48 giờ. Lấy một khuẩn lạc từ đĩa khuẩn đã được chuẩn bị và nuôi trong 5 đến 10ml môi trường YMB lỏng, nuôi lắc ở tốc độ 200 đến 220 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 16 đến 18 giờ. Nuôi nhân thu sinh khối trong môi trường YMB lỏng với tỷ lệ tiếp giống từ 1 đến 5%, nuôi lắc ở tốc độ 200 đến 220 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 4 đến 6 giờ. Ly tâm dịch khuẩn ở tốc độ 6500 vòng/phút

trong thời gian 15 đến 20 phút ở điều kiện 4°C, loại bỏ môi trường nuôi cấy, thu sinh khối. Sau đó, hòa tan sinh khối vi khuẩn thu được trong môi trường ½SH (môi trường Schenk and Hildebrandt 1972 với hàm lượng muối đa lượng và vi lượng giảm một nửa) lỏng để tạo dịch huyền phù vi khuẩn và điều chỉnh mật độ đến giá trị OD₆₀₀ từ 0,3 đến 0,7.

Dịch huyền phù vi khuẩn được bổ sung 10 đến 100mM glucoza và 50 đến 200μM AS (axetosyringon). Stachel và cộng sự (1985) đã chứng minh rằng các hợp chất phenol đơn vòng có khả năng cảm ứng hệ gen *vir* hoạt động thực hiện chức năng chuyển đoạn T-ADN vào tế bào thực vật. Axetosyringon là hợp chất phenol được sử dụng rộng rãi trong các thí nghiệm chuyển gen. Việc bổ sung AS giúp cho vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* chuyển sang trạng thái hoạt động và cảm ứng quá trình chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào thực vật, giúp tăng hiệu quả chuyển gen. Bên cạnh đó, Citovsky và cộng sự (1992) đưa ra việc bổ sung các gốc đường đơn như glucoza hay galactoza vào môi trường lây nhiễm có khả năng tăng hiệu quả chuyển gen thông qua việc cảm ứng hoạt động gen *virA* trong hệ gen *vir*.

c. Nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy

Các lát mẫu sâm Ngọc Linh sạch bệnh sau 5 đến 7 ngày trên môi trường MT1 tạo tổn thương bằng sóng siêu âm từ 0,5 đến 3 phút được dùng để chuyển gen. Quá trình siêu âm giúp cho vi khuẩn dễ dàng xâm nhập vào mẫu mô thực vật và tiến hành chuyển đoạn T-ADN vào trong tế bào. Đối với một số loài thực vật, việc siêu âm giúp tăng hiệu quả chuyển gen rõ rệt so với việc không siêu âm (Kumar và cộng sự, 2006, Choudhary và cộng sự, 1995). Các lát cắt sau khi siêu âm được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn đã được chuẩn bị trong 10 đến 30 phút. Sau khi nhiễm khuẩn, thấm khô mẫu bằng giấy thấm tiệt trùng và đặt trên môi trường đồng nuôi cấy SH (môi trường Schenk and Hildebrandt, 1972). Đồng nuôi cấy trong điều kiện tối ở nhiệt độ 22 đến 25°C trong thời gian 2 đến 3 ngày.

d. Diệt khuẩn sau đồng nuôi cấy

Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu được rửa từ 1 đến 2 lần bằng nước cất vô trùng, mỗi lần 5 đến 10 phút. Sau đó, rửa mẫu với nước cất tiệt trùng bổ sung kháng sinh diệt khuẩn trong 5 đến 20 phút. Sau đó, thấm khô mẫu bằng giấy thấm tiệt trùng, cấy mẫu trên môi trường SH bổ sung kháng sinh diệt khuẩn (MT2). Mẫu cấy được nuôi trong điều kiện tối ở nhiệt độ 22 đến 25°C. Sau 3 đến 5 tuần, các đoạn rễ tơ hình thành trên các lát cắt sâm Ngọc Linh.

e. Chọn lọc và tái sinh dòng chuyển gen

Các rễ tơ không mang gen chuyển sẽ không có khả năng phát triển ổn định trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Nếu như khi đưa vào sản xuất hợp chất tự nhiên mà trong hệ thống nuôi cấy có lẫn tạp nhiều rễ không mang gen chuyển thì khả năng tổng hợp hợp chất tự nhiên sẽ kém hơn nhiều so với môi trường đồng nhất các dòng rễ tơ có mang gen chuyển. Không những thế các dòng không mang gen chuyển đó sẽ không duy trì ổn định được trong suốt thời gian sản xuất. Vì vậy để đảm bảo tất cả hệ thống rễ tơ đưa vào sản xuất phải đều mang gen đã chuyển từ vi khuẩn *A. rhizogenes* cần phải tiến hành bước kiểm tra và chọn lọc. Quá trình chọn lọc các dòng rễ trên môi trường SH không bổ sung chất điều hòa thực vật được tiến hành như sau:

Tại thời điểm 3 đến 5 tuần sau diệt khuẩn, các đoạn rễ hình thành được cấy chuyển lên môi trường MT2. Các đoạn rễ tiếp tục sinh trưởng và phát triển trên môi trường MT2 được chọn lựa và cấy chuyển riêng biệt lên các môi trường MT2 tạo thành các dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh.

Các dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh tiếp tục chuyển lên môi trường MT2, chu kỳ cấy chuyển 3 tuần/lần. Sau 3 đến 5 lần cấy chuyển, các dòng rễ sinh trưởng ổn định trên môi trường MT2 được tái sinh thu sinh khối.

f. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển

Các dòng rễ sâm Ngọc Linh được kiểm tra bằng phương pháp PCR nhằm xác định trực tiếp việc có mặt của đoạn T-ADN trong bộ gen của rễ tơ sẽ cho kết quả chọn lọc chính xác hơn. Các gen *rolA*, *rolB* và *rolC* đóng vai trò quan trọng trong quá trình cảm ứng tạo rễ tơ ở mô tế bào thực vật. Sự biểu hiện đồng thời của ba gen này gây nên kiểu hình rễ tơ ở mô tế bào thực vật bị xâm nhiễm.

ADN tổng số các dòng rễ tơ được tách chiết theo phương pháp sử dụng CTAB của Sambrooks và cộng sự (2001). ADN tổng số được tinh sạch sau khi tách chiết được pha về nồng độ 100ng/μl. Phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu cho từng gen *rolA*, *rolB* và *rolC* được thực hiện trên máy PCR system 9700 với chu kỳ nhiệt và thành phần phản ứng như bảng 1 và 2.

Bảng 1: Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μl)
H ₂ O	13,5
Đệm (10X)	2,5
MgCl ₂	2,5
dNTPs	2,0
Môi xuôi	1,0
Môi ngược	1,0
Tag Polymeraza	0,5
ADN	2,0
Tổng	25,0

Bảng 2: Chu kì nhiệt cho phản ứng PCR

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
95	5 phút	35 ↖
94	30 giây	
55	30 giây	
72	40 giây	
72	7 phút	
4	∞	

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế này được trình bày cụ thể qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, cần hiểu rằng phần ví dụ thực hiện sáng chế chỉ có mục đích mô tả chi tiết sáng chế mà không giới hạn phạm vi của sáng chế ở các phương án được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo nguyên liệu chuyển gen

Cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên được rửa sạch đất bám dưới dòng nước chảy liên tục, cùng lúc đó, dùng dao cắt bỏ cọng lá và rễ phụ chỉ thu thân củ. Thân củ được tiệt trùng sơ bộ với nước cất và chất tẩy rửa trong 10 đến 15 phút sau đó rửa sạch lại với nước cất. Mẫu củ đã tiệt trùng sơ bộ được đưa vào tủ cấy để tiến hành tiệt trùng mẫu. Rửa mẫu bằng nước cất vô trùng từ 2 đến 5 lần, mỗi lần 10 đến 15 phút. Tiệt trùng mẫu bằng cồn 90° trong 1 phút. Rửa sạch cồn bằng nước cất tiệt trùng. Tiệt trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% trong 15 đến 20 phút. Rửa sạch HgCl_2 0,1% bằng nước cất tiệt trùng. Thấm khô mẫu với giấy thấm tiệt trùng sau đó cắt mẫu thành các lát có đường kính từ 1 đến 1,5cm và dày 0,2 đến 0,3cm. Đặt mẫu trên môi trường nuôi cấy MT1 (môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/l NAA và 50 μM axetonsyringon).

Ví dụ 2: Tạo dịch huyền phù vi khuẩn

30ml môi trường YMB đặc được cho lên đĩa petri. Sau đó, lấy khuẩn từ ống giữ chủng *A. rhizogenes* ATCC15834 và cấy ria trên môi trường YMB đặc đã được chuẩn bị, đặt đĩa khuẩn trong tủ ôn nhiệt 28°C trong thời gian 48 giờ. Sau 48 giờ nuôi cấy, lấy một khuẩn lạc riêng biệt từ đĩa, cấy ria và nuôi trong 10ml môi trường YMB lỏng. Bình nuôi được đặt trong máy lắc ở tốc độ 220 vòng/phút, nhiệt độ 28°C, thời gian nuôi cấy 18 giờ. Sau 18 giờ, nuôi nhân thu sinh khối trong môi trường YMB lỏng. Chuyển 5ml dịch khuẩn đã chuẩn bị vào bình tam giác 250ml, sau đó bổ sung 45ml YMB lỏng. Bình nuôi được đặt trong máy lắc ở tốc độ 220 vòng/phút, nhiệt độ 28°C, thời gian nuôi 5 giờ. Dịch khuẩn được ly tâm ở tốc độ 6500 vòng/phút trong thời gian 15 phút ở điều kiện nhiệt

độ 4°C để thu sinh khối. Đo mật độ vi khuẩn ở bước sóng 600nm, điều chỉnh dịch huyền phù đến mật độ đạt giá trị OD₆₀₀ là 0,5 bằng ½ SH lỏng. Sau đó bổ sung AS đạt nồng độ 100µM và glucoza 50mM.

Ví dụ 3: Lây nhiễm và đồng nuôi cấy

Ba lô thí nghiệm chuyển gen độc lập được thực hiện, các lát cắt ngang thân rễ sâm Ngọc Linh có độ dày 0,2 đến 0,3cm được ngâm trong môi trường ½ SH lỏng và gây tổn thương bằng sóng siêu âm trong 2 phút. Sau khi siêu âm, các lát cắt được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn đã được chuẩn bị trong 15 phút. Sau thời gian lây nhiễm, các lát cắt được thấm khô mẫu bằng giấy thấm tiệt trùng và đặt trên các đĩa peptri chứa 25ml môi trường SH có bổ sung 3% sacaroza và 7,5g/l agar, độ pH là 5,8. Đĩa đồng nuôi cấy được đặt trong tủ tối ở nhiệt độ 22°C trong thời gian 2 ngày.

Ví dụ 4: Diệt khuẩn sau đồng nuôi cấy

Sau 2 ngày đồng nuôi cấy, các lát cắt thân rễ sâm Ngọc Linh được rửa 3 lần với 100ml nước cất tiệt trùng, mỗi lần 10 phút. Sau đó, các mẫu được rửa với 100ml nước cất tiệt trùng có bổ sung 500mg/l cefotaxim trong 10 phút. Rửa lại mẫu với 100ml nước cất tiệt trùng. Thấm khô mẫu bằng giấy thấm tiệt trùng, cấy mẫu trên môi trường MT2 bao gồm môi trường SH có bổ sung 500mg/l cefotaxim, 3% sacaroza và 7,5g/l agar, độ pH là 5,8. Mẫu cấy được đặt trong tủ tối ở nhiệt độ 22 - 23°C.

Ví dụ 5: Chọn lọc và tái sinh dòng chuyển gen

Sau 3 đến 5 tuần, các đoạn rễ hình thành trên các lát cắt ngang thân rễ sâm Ngọc Linh sau khi được lây nhiễm với vi khuẩn *A.rhizogenes*. Các mẫu cấy có xuất hiện rễ được cấy chuyển lên các đĩa peptri riêng biệt chứa môi trường MT2 hình thành các dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh. Các dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh tiếp tục chuyển lên môi trường không chứa chất điều hòa thực vật (MT2), chu kỳ cấy chuyển 3 tuần/lần. Sau 3 đến 5 lần cấy chuyển, các dòng rễ sống sót trên môi trường MT2 được tái sinh thu sinh khối. Sau 2 tháng, thu được tập đoàn giống

gồm 14 dòng rẽ sinh trưởng ổn định trên môi trường SH không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng.

Ví dụ 6: Kiểm tra biểu hiện của gen chuyển bằng phương pháp PCR

Thu 100mg rẽ mỗi dòng rẽ tơ để tách chiết ADN tổng số. Nghiền mẫu rẽ bằng máy nghiền bi trong ống eppendorf với nitơ lỏng. Sau khi nghiền mẫu thành bột mịn, bổ sung ngay 800µl đệm chiết (100mM Tris-HCl (độ pH là 8); 1,5M NaCl; 50mM EDTA (độ pH là 8); 4% (trọng lượng/thể tích) CTAB). Trộn đều hỗn hợp và ủ ở nhiệt độ 65°C trong 1 giờ, 15 phút lắc đảo 1 lần. Giữ mẫu ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó bổ sung 800µl hỗn hợp chloroform:isoamyl alcohol (24:1) và trộn hỗn hợp bằng cách đảo đều ống trong 10 phút. Ly tâm hỗn dịch ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C, sau đó chuyển lớp dung dịch ở pha trên sang ống eppendorf 1,5ml. Bổ sung isopropanol thể tích tỷ lệ 1:1 để tủa ADN, trộn đều hỗn hợp sau đó ủ 1 giờ ở -20°C. Ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C để thu ADN, loại bỏ dịch lỏng. Rửa ADN 3 lần, mỗi lần với 500µl etanol 70% lạnh. ADN được làm khô sau đó hòa tan trong đệm TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 10mg/ml RNaza A, độ pH là 8). Ủ hỗn hợp trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C. ADN tinh sạch được pha loãng về nồng độ 100ng/µl để làm nguyên liệu tiến hành phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu cho mỗi gen *rolA*, *rolB* và *rolC*. Thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt được thể hiện ở bảng 1 và 2. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa 0,8%; kiểm tra và chụp ảnh trên máy soi gel.

Bảng 3: các cặp môi đặc hiệu sử dụng cho các gen *rolA*, *rolB* và *rolC*

Tên môi	Trình tự môi	Nhân gen hoặc đoạn gen/kích thước (kp)
<i>rolC</i> _R	AAACTTGCACTCGCCATGCC	Đoạn gen <i>rolC</i> /0,4
<i>rolC</i> _F	TGTGACAAGCAGCGATGAGC	
<i>rolB</i> _R	CGGATCCCCTCGAATAGGTT	Đoạn gen <i>rolB</i> /0,75
<i>rolB</i> _F	TCAGGTTTACTGCAGCAGGC	
<i>rolA</i> _F	ACGGTGAGTGTGGTTGTAGG	Đoạn gen <i>rolA</i> /0,5
<i>rolA</i> _R	GCCACGTGCGTATTAATCCC	

Bảng 4: Kết quả thí nghiệm chuyển gen tạo rễ tơ ở cây sâm Ngọc Linh

Lô thí nghiệm	Số mẫu biến nạp	Số mẫu ra rễ	Số lượng dòng PCR dương tính	Hiệu suất chuyển gen (%)	Số dòng rễ sinh trưởng ổn định trên môi trường MT2
(1)	(2)	(3)	(4)	$((4)/(2))*100$	(5)
1	97	42	25	25,77	5
2	86	32	20	23,25	3
3	91	40	26	28,57	6
Tổng	575	208	71	$25,86 \pm 2,65$	14

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình chuyển gen tạo rễ tơ ở cây sâm Ngọc Linh thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* trên nguồn nguyên liệu thân rễ cho hiệu quả chuyển gen cao, phương pháp chuyển gen đơn giản hơn cũng như thời gian thực hiện ngắn hơn. Sử dụng nguồn nguyên liệu chuyển gen là các lát cắt thân rễ sâm Ngọc Linh cho tỷ lệ chuyển gen trung bình $25,86 \pm 2,65\%$, cao hơn so với các phương pháp sử dụng nguyên liệu là mẫu lá và cuống lá. Thu nhận sinh khối sâm Ngọc Linh theo phương pháp nuôi cấy rễ tơ cho ưu điểm là không chịu tác động của các yếu tố ngoại cảnh như thời tiết, dịch bệnh và thời vụ. Phương pháp nuôi cấy sinh khối có khả năng thu hồi sản phẩm nhanh hơn ngoài tự nhiên. Mặt khác, nuôi cấy *in vitro* có thể kiểm soát các yếu tố ảnh hưởng nên sản phẩm tạo ra có chất lượng ổn định, tạo nguồn nguyên liệu phong phú cho các ngành công nghiệp dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm chủ động hơn so với sản phẩm sinh khối từ tự nhiên. Bên cạnh đó, giải pháp cũng góp phần bảo tồn nguồn gen sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tạo rễ tơ từ thân rễ sâm Ngọc Linh nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a. tạo nguyên liệu chuyển gen: cắt ngang thân rễ sâm Ngọc Linh tự nhiên từ 2 năm tuổi trở lên, có đường kính củ từ 1cm đến 1,5cm; sau đó, cảm ứng mẫu trên môi trường MT1 bao gồm môi trường SH có bổ sung 3% sacaroza, 0,5 - 1mg/l auxin (IAA, IBA hoặc NAA), 50 - 100 μ M axetosyringon và 7,5g/l agar; độ pH là 5,8;

b. tạo dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*: hòa tan cặn khuẩn sau ly tâm với môi trường $\frac{1}{2}$ SH có bổ sung 10 – 100mM glucoza hoặc galactoza và axetosyringon 50 – 200 μ M, điều chỉnh mật độ vi khuẩn đạt giá trị OD₆₀₀ trong khoảng 0,3 đến 0,7;

c. nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy: gây tổn thương lát cắt ngang thân rễ sâm Ngọc Linh tự nhiên từ 2 năm tuổi trở lên có độ dày từ 0,2cm đến 0,3cm và đường kính lát cắt từ 1cm đến 1,5cm bằng sóng siêu âm từ 30 giây đến 3 phút, sau đó gây nhiễm mẫu bằng sóng siêu âm với dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* trong thời gian từ 10 phút đến 30 phút, sau đó thấm khô mẫu bằng giấy thấm và đặt trên môi trường SH đồng nuôi cấy từ 2 ngày đến 3 ngày trong điều kiện tối ở nhiệt độ từ 22°C đến 25°C;

d. diệt khuẩn sau đồng nuôi cấy: rửa các mẫu sau khi đồng nuôi cấy từ 1 đến 2 lần bằng nước cất khử trùng, tiếp đó rửa với nước cất khử trùng có bổ sung chất kháng sinh diệt khuẩn trong 5 đến 10 phút, thấm khô mẫu bằng giấy thấm khử trùng;

e. chọn lọc và tái sinh dòng chuyển gen: chuyển các lát cắt lên môi trường chọn lọc không chứa chất điều hòa sinh trưởng MT2 bao gồm môi trường SH có bổ sung 3% sacaroza, kháng sinh diệt khuẩn và 7,5g/l agar, nuôi cấy trong 1 tháng, sau đó tách các đoạn rễ tơ sang môi trường MT2 mới với chu kỳ cấy chuyển 3

đến 4 tuần/chu kỳ, sau 3 đến 5 chu kỳ chọn lọc các mẫu rễ tơ sống sót thành các dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh; và

f. kiểm tra biểu hiện của gen *rol* bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu gen *rol*.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó nồng độ auxin được bổ sung ở bước (a) nằm trong khoảng từ 0,1mg/l đến 1mg/l.

Fig. 1

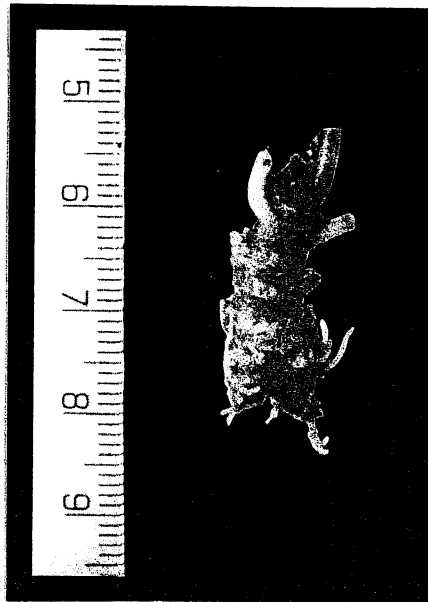


Fig. 2

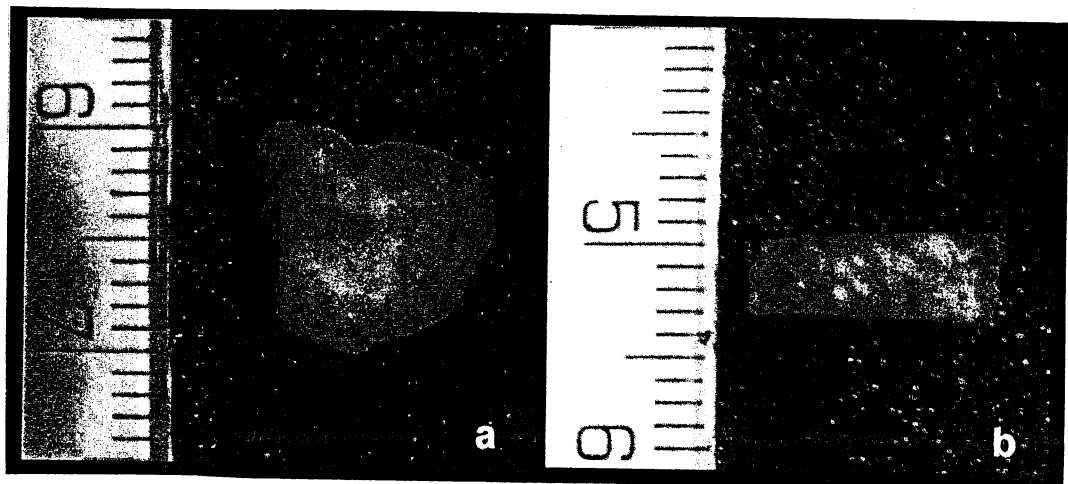


Fig. 3

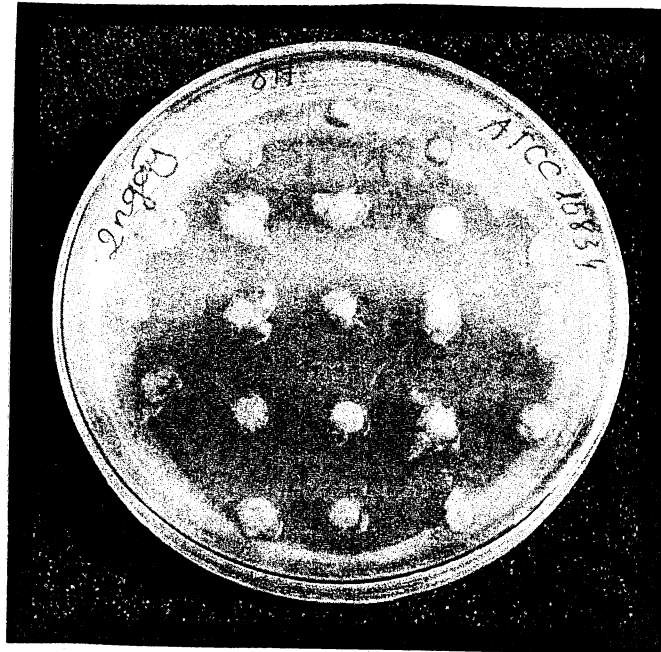


Fig. 4



Fig. 5

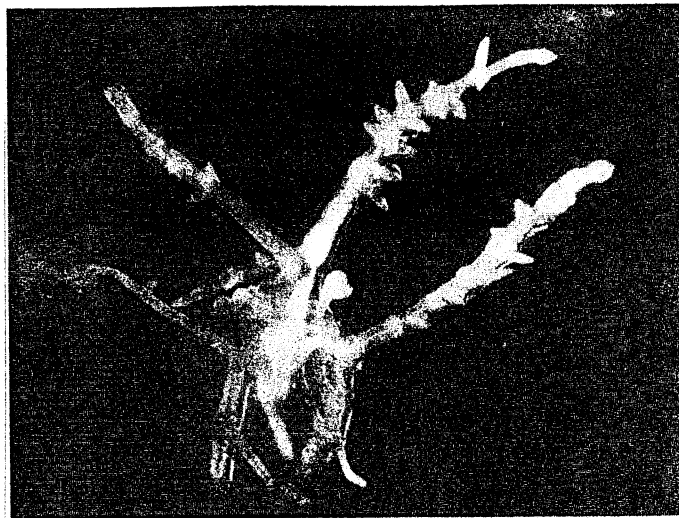


Fig. 6

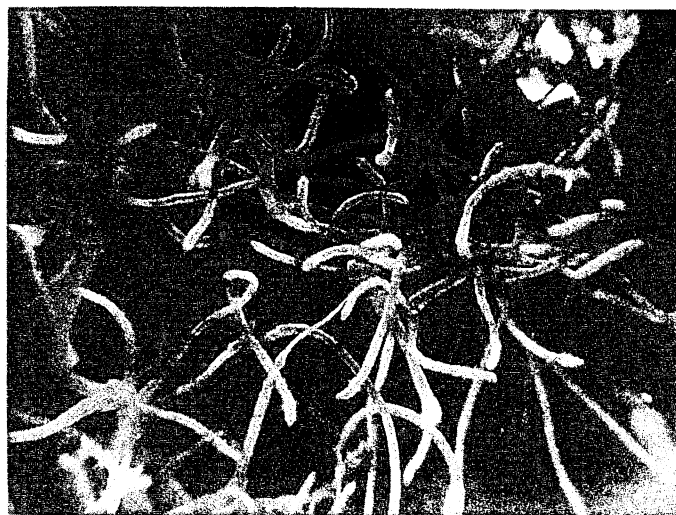


Fig. 7

