

**ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC HỢP CHẤT PHENOL
TRONG HUYỀN PHÙ *Agrobacterium rhizogenes*
LÊN KHẢ NĂNG CẢM ỨNG HÌNH THÀNH RỄ CHUYỂN GENE
TỪ CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus*)**

NGUYỄN NHƯ NHÚT*, BÙI VĂN LỆ**

TÓM TẮT

Mức độ ảnh hưởng của các hợp chất phenol lên sự cảm ứng rễ tùy từng chủng *Agrobacterium rhizogenes* và tùy từng giống Dừa cạn. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ cao nhất từ giống dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 khi bổ sung resorcylic acid 100, 100 và 50 μM tương ứng vào huyền phù chủng *A. rhizogenes* C18. Chủng *A. rhizogenes* C26 có khả năng cảm ứng rễ cao nhất trên giống Dừa cạn VIN077 khi trong huyền phù có acetosyringone 50 μM .

Từ khóa: *Agrobacterium rhizogenes*, dừa cạn, cảm ứng, rễ tơ.

ABSTRACT

Impacts of phenolic compounds in Agrobacterium rhizogenes suspension on induction of hairy root formation from Catharanthus roseus

Impacts of phenolic compounds on hairy root induction depended on strain of Agrobacterium rhizogenes and Catharanthus roseus strain. The ratio of hairy root-forming explants was highest in C. roseus VIN002, VIN005, and VIN072 with A. rhizogenes C18 suspension containing a final resorcylic acid concentration of 100, 100, and 50 μM respectively. A. rhizogenes C26 suspension containing 50 μM acetosyringone was the most favourable condition to induce hairy roots in C. roseus VIN077.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, *Catharanthus roseus*, hairy root, induction.

1. Mở đầu

Từ những năm 80 của thế kỉ trước, nuôi cấy rễ chuyển gene (transgenic root) hay rễ tơ (hairy root) từ cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*) được cảm ứng bằng *Agrobacterium rhizogenes* đã được kì vọng như một phương pháp hiệu quả để thu nhận những hợp chất alkaloid có giá trị cao trong chữa bệnh ung thư [1]. Cho đến nay, các nghiên cứu về rễ tơ cây Dừa cạn không ngừng được quan tâm nhằm làm sáng tỏ các cơ chế của các con đường sinh tổng hợp alkaloid để từ đó có thể ứng dụng vào trong nuôi cấy rễ chuyển gene với quy mô lớn. [7]

Tuy nhiên, quá trình sản xuất sinh khối rễ chuyển gene từ cây Dừa cạn hiện nay còn gặp nhiều vấn đề làm đau đầu các nhà nghiên cứu và sản xuất. Trong đó, việc thu

* ThS, Trường Đại học KHTN, ĐHQG TP HCM; Email: nhunhutnguyen@yahoo.co.uk

** PGS TS, Trường Đại học KHTN, ĐHQG TP HCM

nhận được dòng rễ chuyển gene có thể phát triển nhanh và ổn định trong thời gian dài được xem là khó khăn nhất. Thêm vào đó, vị trí chèn các gene cảm ứng tạo rễ từ *A. rhizogenes* vào bộ gene tế bào thực vật nói chung và cây Dừa cạn nói riêng là một quá trình ngẫu nhiên. Do đó, các dòng rễ tơ khác nhau sẽ có các kiểu tăng trưởng và biến dưỡng khác nhau tùy thuộc vào vị trí mà các gene vi khuẩn được chèn [2]. Chính vì thế, việc thu nhận nhiều dòng rễ tơ cây Dừa cạn khác nhau là bước đầu tiên luôn được các nhà nghiên cứu quan tâm.

Các báo cáo trước đây đã cho thấy hiệu quả cảm ứng tạo rễ chuyển gene của *A. rhizogenes* chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau [1], [2]. Trong đó, vài hợp chất phenol được nhiều báo cáo cho thấy là giúp tăng tần số chuyển gene cảm ứng tạo rễ tơ ở nhiều loài thực vật khác nhau bằng những chủng *A. rhizogenes* khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của một số hợp chất phenol lên hiệu quả chuyển gene của *A. rhizogenes* thông qua tỉ lệ mẫu hình thành rễ từ mô lá cây Dừa cạn. Kết quả của nghiên cứu nhằm góp phần hoàn thiện quy trình thu nhận rễ chuyển gene cây Dừa cạn cho các nghiên cứu sau đó.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

2.1.1. Chủng vi khuẩn

Hai chủng *A. rhizogenes* C18 và C26 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm của Bộ môn Công nghệ sinh học (Trường Đại học KHTN – ĐHQG TPHCM). Các chủng vi khuẩn này được phân lập từ đất vùng rễ của nhiều loài thực vật khác nhau ở Việt Nam. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy và bảo quản trên môi trường thạch Yeast Mannitol Broth (YMB) [4]. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường YMB trong 48 giờ ở điều kiện 25°C và lắc 180 vòng/phút. Dịch vi khuẩn thu được sau khi nuôi cấy có OD_{600nm} khoảng 1,7-1,8 được pha loãng thành huyền phù có OD_{600nm} 1,0 và được bổ sung các hợp chất phenol riêng lẻ với nồng độ cuối cùng đạt được là 100µM để dùng làm huyền phù vi khuẩn gây nhiễm. Các hợp chất phenol được sử dụng gồm acetosyringone, syringic acid và sinapinic acid (do Sigma sản xuất), catechol, gallic acid, 4-hydroxybenzoic acid, pyrogallol, sinapinic acid, vanillin, ferulic acid, protocatechuic acid và resorcylic acid (do Merck sản xuất).

2.1.2. Mẫu thực vật *in vitro*

Bốn giống Dừa cạn khác nhau (VIN002, VIN005, VIN072 và VIN077) được cung cấp bởi Công ty FVN. Cây Dừa cạn *in vitro* được chuẩn bị bằng cách khử trùng bề mặt theo Mohsen Zargar *et al* (2010) [9]. Hạt Dừa cạn được rửa với xà phòng loãng trong 10 phút rồi được rửa lại dưới vòi nước máy trong 5 phút. Sau đó, hạt được xử lí với ethanol 80% trong 1 phút trước khi xử lí với dung dịch Javel:nước (4:1) trong 15 phút. Hạt được rửa lại với nước vô trùng 5 lần. Ủ hạt trên môi trường Murashige & Skoog bán đậm đặc (MS/2) ở điều kiện 25°C trong tối. Hạt nảy mầm sau 5 ngày ủ. Chuyển cây sang chế độ chiếu sáng 1500 lux (16 giờ/ngày). Cây được 8 tuần tuổi được

dùng làm nguyên liệu gây nhiễm. Ba giống VIN002, VIN005 và VIN072 được gây nhiễm với huyền phù chủng *A. rhizogenes* C18 trong khi giống VIN077 được gây nhiễm với huyền phù chủng *A. rhizogenes* C26.

2.2. Phương pháp

Mô lá từ cây Dừa cạn *in vitro* được tạo vết thương bằng dao mổ. Sau đó, mẫu được cho vào huyền phù vi khuẩn và ngâm trong 5 phút. Làm khô mẫu bằng giấy thấm rồi ủ cảm ứng trên môi trường MS/2 trong tối trong 7 ngày ở 25°C. Tiến hành loại vi khuẩn bằng cách chuyển mẫu sang môi trường MS/2 có bổ sung cefotaxime 500mg/lít và ủ trong tối trong 7 ngày ở 25°C. Sau 7 ngày thì chuyển mẫu sang môi trường MS/2 và tiếp tục ủ trong tối trong 7 ngày ở 25°C. Rễ tơ được hình thành sau 2-3 tuần gây nhiễm. Mỗi nghiệm thức gồm 100 mẫu lá và được lặp lại 3 lần. Đối chứng cũng được thực hiện tương tự nhưng thay chất cảm ứng bằng dung môi hòa tan chất cảm ứng. Mẫu trắng là mẫu không bổ sung dung môi và hợp chất phenol. Ghi nhận số rễ mẫu hình thành rễ sau 3 tuần gây nhiễm [6]. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (I) ở được tính theo công thức 1. Phần trăm ảnh hưởng của hợp chất phenol lên hiệu quả chuyển gene cảm ứng rễ được tính theo công thức 2. Với I_{Phenol} là tỷ lệ mẫu hình thành rễ ở lô thí nghiệm, $I_{\text{Đối chứng}}$ là tỷ lệ mẫu hình thành rễ ở lô đối chứng và $I_{\text{Trắng}}$ là tỷ lệ mẫu hình thành rễ ở mẫu trắng.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thu được từ kết quả các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2007, SAS 9.1 và được trình bày dưới dạng số trung bình.

$$I(\%) = \frac{\text{Số mẫu hình thành rễ}}{\text{Số mẫu gây nhiễm}} \times 100 \quad \text{Công thức 1}$$

$$\text{Phần trăm ảnh hưởng của hợp chất phenol (\%)} = \frac{I_{\text{Phenol}} - I_{\text{Đối chứng}}}{I_{\text{Trắng}}} \times 100 \quad \text{Công thức 2}$$

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của các hợp chất phenol khác nhau lên sự cảm ứng rễ của chủng *A. rhizogenes* C18 và C26

Nhiều báo cáo trước đây cho thấy khi mô bị tổn thương hoặc đang tăng trưởng sẽ tổng hợp và tiết ra nhiều hợp chất phenol [8]. Các hợp chất này đóng vai trò truyền tín hiệu trong tương tác giữa *A. rhizogenes* với tế bào thực vật, nó giúp thu hút tế bào vi khuẩn đến tiếp xúc bề mặt của tế bào thực vật. Ngoài ra, các hợp chất này cũng có vai trò hoạt hóa các gene trong tế bào vi khuẩn để bắt đầu quá trình chuyển gene. Sự bổ sung các hợp chất này vào huyền phù vi khuẩn để gây nhiễm hoặc vào môi trường trong giai đoạn đồng nuôi cấy hay cảm ứng có thể làm gia tăng tỷ lệ mẫu hình thành rễ

[3], [5]. Tuy nhiên, sự bổ sung những hợp chất khác nhau với những nồng độ thay đổi sẽ có ảnh hưởng không giống nhau lên hiệu quả cảm ứng tạo rễ chuyên gene [5].

Trong nghiên cứu này, các hợp chất phenol được bổ sung vào huyền phù *A. rhizogenes* với nồng độ 100 μ M. Sau khi gây nhiễm 3 tuần với chủng *A. rhizogenes* C18, tỉ lệ phân trăm mẫu lá hình thành rễ thay đổi khác nhau giữa các hợp chất phenol (Bảng 1). Nhìn chung, các hợp chất 4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, gallic acid, protocatechuic acid, pyrogalllic acid, syringic acid và vanillin có xu hướng làm giảm tỉ lệ mẫu hình thành rễ từ mô lá của 3 giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072. Ngược lại, các hợp chất acetosyringone, catechol, resorcylic acid và sinapinic acid có xu hướng làm tăng tỉ lệ mẫu hình thành rễ. Với chủng *A. rhizogenes* C26, khi gây nhiễm trên giống Dừa cạn VIN077, chỉ có acetosyringone, resorcylic acid và sinapinic acid có ảnh hưởng tích cực lên hiệu quả cảm ứng rễ (Bảng 2).

Bảng 1. Ảnh hưởng của các hợp chất phenol lên tỉ lệ mẫu hình thành rễ từ mô lá cây Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 bằng chủng *Agrobacterium rhizogenes* C18

Hợp chất phenol	Phần trăm ảnh hưởng (%)		
	VIN002	VIN005	VIN072
4-Hydroxybenzoic acid	0,4 efg	1,5 def	-40,5 fg
Acetosyringone	1,9 def	6,3 bc	8,5 b
Catechol	3,3 de	0,0 def	6,4 cd
Ferulic acid	-3,2 fg	-1,2 def	-100,0 ij
Gallic acid	-85,0 j	-55,8 k	-100,0 ij
Protocatechuic acid	-23,0 h	-46,2 j	0,7 e
Pyrogalllic acid	-100,0 k	-37,6 i	-41,4 fg
Resorcylic acid	14,8 a	15,1 a	14,9 a
Sinapinic acid	9,5 bc	7,7 bc	6,3 cd
Syringic acid	-36,0 i	-9,7 h	-73,6 h
Vanillin	8,4 bc	-4,5 g	-97,9 ij

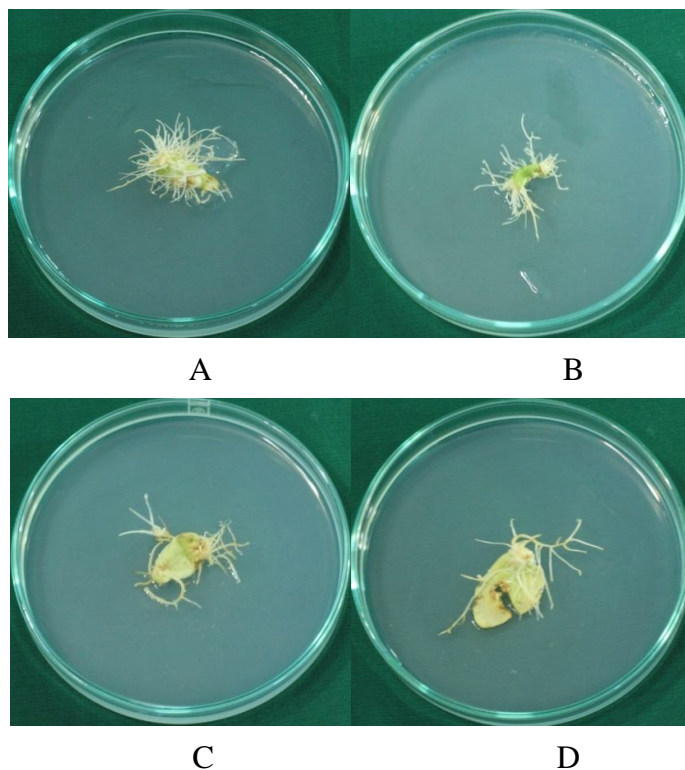
Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các hợp chất phenol lên khả năng cảm ứng tạo rễ chuyển gene từ mô lá cây Dừa cạn VIN077 bằng chủng *Agrobacterium rhizogenes* C26

Hợp chất phenol	Phần trăm ảnh hưởng (%)
4-Hydroxybenzoic acid	-24,3 f
Acetosyringone	9,1 a
Catechol	-3,2 cde
Ferulic acid	-70,3 g
Gallic acid	-87,5 hij
Protocatechuic acid	-4,6 cde
Pyrogalllic acid	-100,0 k
Resorcylic acid	6,8 b
Sinapinic acid	1,6 cde
Syringic acid	-82,9 hij
Vanillin	-85,8 hij

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Các kết quả thu được cho thấy mức độ ảnh hưởng của các hợp chất phenol lên hiệu quả cảm ứng rễ không giống nhau giữa hai chủng *A. rhizogenes* cũng như giữa các giống Dừa cạn khác nhau. Nhìn chung, ba hợp chất gallic acid, pyrogalllic acid và syringic acid có ảnh hưởng ức chế mạnh lên khả năng cảm ứng rễ của cả hai chủng vi khuẩn trên bốn giống Dừa cạn khác nhau (với mức giảm của tỉ lệ mẫu hình thành rễ tương ứng là 55,8-100%, 37,6-100% và 9,7-82,9%). Trong khi đó, mức độ ảnh hưởng của 4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, protocatechuic acid và vanillin thay đổi tùy theo giống Dừa cạn từ không thay đổi đáng kể đến ức chế hoàn toàn. Theo Stachel *et al* (1985), ở nồng độ 100 μ M, các hợp chất phenol không gây độc cho tế bào *A. rhizogenes* [6]. Tuy nhiên, ở nồng độ cao, hợp chất phenol cũng có thể gây ức chế như báo cáo của Sreeramanan *et al* [11] và Rajkumar và Murugesan [10]. Ảnh hưởng ức chế của hợp chất phenol lên khả năng cảm ứng tạo rễ chuyển gene cũng không giống nhau giữa các chủng *A. rhizogenes* [6]. Trong số các hợp chất phenol có xu hướng làm tăng hiệu quả chuyển gene của chủng *A. rhizogenes* C18, resorcylic acid là chất có ảnh hưởng làm tăng tỉ lệ mẫu hình thành rễ cao nhất trên ba giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 (tăng 14,8, 15,1 và 14,9% tương ứng). Đối với chủng *A. rhizogenes* C26, khi gây nhiễm trên giống Dừa cạn VIN077, acetosyringone là chất có ảnh hưởng tích cực nhất (làm tăng tỉ lệ mẫu hình thành rễ 9,1%), kế đến là resorcylic acid (6,8%) và sinapinic acid (1,6%).



Hình 1. Rễ chuyển gene thu được từ các giống Dừa cạn. A, B và C: rễ thu được từ giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* C18; D: rễ thu được từ giống Dừa cạn VIN077 được cảm ứng bằng chủng *A. rhizogenes* C26.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ hợp chất phenol lên sự cảm ứng rễ của *A. rhizogenes* C18 và C26

Khi thay đổi nồng độ resorcylic acid bổ sung vào huyền phù chủng *A. rhizogenes* C18 thì tỉ lệ mẫu hình thành rễ cũng thay đổi theo (Bảng 3). Nhìn chung, khi tăng nồng độ resorcylic acid lên thì tỉ lệ mẫu hình thành rễ cũng tăng theo. Tuy nhiên, tỉ lệ mẫu hình thành rễ đạt cực đại ở những nồng độ nhất định của resorcylic acid (tùy theo giống Dừa cạn). Tỉ lệ mẫu hình thành rễ có xu hướng giảm khi tiếp tục tăng nồng độ resorcylic acid cao hơn nồng độ nhất định này. Tuy nhiên, với mỗi giống Dừa cạn khác nhau thì sự ảnh hưởng của nồng độ resorcylic acid không giống nhau. Kết quả thu được tương tự khi thay đổi nồng độ acetosyringone bổ sung vào huyền phù chủng *A. rhizogenes* C26 khi gây nhiễm trên mô lá của giống Dừa cạn VIN077 (Bảng 4). Khi được bổ sung với nồng độ 50 μM thì tỉ lệ mẫu hình thành rễ cao nhất (31,8%) so với các nồng độ thấp hơn và khi không có bổ sung. Sự gia tăng nồng độ acetosyringone hơn 50 μM không làm tăng tỉ lệ mẫu hình thành rễ.

Bảng 3. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%) từ lá các giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN072 bằng chủng *Agrobacterium rhizogenes* C18 ở các nồng độ resorcylic acid khác nhau

Nồng độ resorcylic acid (μM)	Giống Dừa cạn		
	VIN002	VIN005	VIN072
0	58,2 cde	48,6 fg	39,4 c
25	58,4 cde	48,2 fg	42,9 b
50	59,6 cde	51,0 e	45,9 a
75	64,2 b	54,9 cd	32,0 d
100	68,6 a	57,0 ab	24,0 e
125	51,3 fg	56,3 abc	15,1 fg
150	49,5 fg	55,6 bcd	14,5 fg

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ acetosyringone lên khả năng chuyển gene cảm ứng tạo rễ từ mô lá cây Dừa cạn VIN077 bằng chủng *Agrobacterium rhizogenes* C26

Nồng độ acetosyringone (μM)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
0	10,6 g
25	27,4 bcd
50	31,8 a
75	25,9 bcd
100	27,1 bcd
125	19,8 ef
150	22,1 ef

Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng 1 cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Trước đây, Sreeramanan *et al* báo cáo khi nồng độ bổ sung từ 200 μM trở lên [11] hay Rajkumar và Murugesan báo cáo khi nồng độ từ 125 μM trở lên [10] thì acetosyringone có ảnh hưởng ức chế khả năng cảm ứng rễ của nhiều chủng *A. rhizogenes* trên nhiều loài thực vật khác nhau. Kết quả thu được ở Bảng 4 cho thấy khi bổ sung acetosyringone ở nồng độ cao hơn 50 μM sẽ gây ức chế khả năng cảm ứng tạo rễ trên mẫu lá Dừa cạn của chủng *A. rhizogenes* C26. Sự khác nhau này có thể do mỗi giống thực vật khác nhau có khả năng tiết ra một lượng nhất định các phenol khác nhau, trong đó có thể bao gồm hợp chất nghiên cứu. Nhìn chung, kết quả này đã một

lần nữa khẳng định sự bổ sung acetosyringone vào huyền phù có thể giúp tăng hiệu quả cảm ứng rễ, tuy nhiên, mỗi chủng *A. rhizogenes* có nồng độ acetosyringone thích hợp khác nhau. Kết quả này cũng đã cho thấy sự bổ sung acetosyringone ở nồng độ 50 μM vào huyền phù chủng *A. rhizogenes* C26 là thích hợp nhằm làm tăng hiệu quả chuyển gene cảm ứng rễ trên giống Dừa cạn VIN077.

Hầu hết các báo cáo cảm ứng tạo rễ từ các loài thực vật, kể cả cây Dừa cạn, trước đây đều sử dụng acetosyringone để nghiên cứu làm chất kích thích quá trình chuyển gene cảm ứng tạo rễ của *A. rhizogenes*. Tuy nhiên, kết quả trong nghiên cứu này đã cho thấy resorcylic acid có hiệu quả hơn acetosyringone khi cảm ứng tạo rễ trên ba giống Dừa cạn VIN002, VIN005 và VIN077 bằng chủng *A. rhizogenes* C18. Phân tích thống kê các số liệu trong Bảng 3 chứng tỏ có sự thay đổi đáng kể khả năng cảm ứng tạo rễ của chủng *A. rhizogenes* C18 khi thay đổi nồng độ của resorcylic acid. Trong đó cho thấy nồng độ resorcylic acid bổ sung thích hợp để cảm ứng tạo rễ trên hai giống Dừa cạn VIN002 và VIN005 là 100 μM và trên giống Dừa cạn VIN072 là 50 μM .

4. Kết luận

Sự bổ sung các hợp chất phenol vào huyền phù vi khuẩn có ảnh hưởng khác nhau lên khả năng cảm ứng rễ chuyển gene của các chủng *A. rhizogenes*. Bằng cách bổ sung các hợp chất phenol khác nhau vào huyền phù các chủng *A. rhizogenes* C18 và C26, kết quả đã cho thấy sự bổ sung hợp chất phenol phù hợp giúp làm tăng khả năng cảm ứng tạo rễ chuyển gene của *A. rhizogenes*. Nồng độ phenol thích hợp trong huyền phù thay đổi tùy theo giống Dừa cạn. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ từ các giống Dừa cạn VIN002 và VIN005 đạt được cao nhất khi gây nhiễm với huyền phù chủng *A. rhizogenes* C18 có resorcylic acid 100 μM trong khi với giống Dừa cạn VIN072 thì chỉ cần bổ sung resorcylic acid 50 μM vào huyền phù chủng vi khuẩn này. Khả năng cảm ứng rễ chuyển gene từ giống Dừa cạn VIN077 đạt cao nhất khi được gây nhiễm với huyền phù chủng *A. rhizogenes* C26 có acetosyringone 50 μM .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Binder B. Y., Peebles C. A., Shanks J. V., San K. Y. (2009), "The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots", *Biotechnol. Prog.*, 25(3), 861-865.
2. Chandra S., Lata H., Varma A. (2013), *Biotechnology for Medicinal Plants*, Springer, London.
3. Chandrasekaran T., Chellappan S. R., Kandhan V., Abubakker A., Appakan S. (2015), "Improved *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root culture system of *Withania somnifera* (L.) Dunal using sonication and heat treatment", *Biotech.*, 3, 297-302.
4. Danesh Y. R., Mohammadi Goltapeh E., Alizadeh A., Modarres Sanavy M. (2006), "Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran", *Journal of Biological Sciences*, 6(10), 87-91.

5. Donmez D., Simsek O., Izgu T., Mendi Y. Y., Kacar Y, Yesiloglu T. (2015), “Effects of different acetosyringone concentrations on transformation of *Rol*ABCD genes in some citrus rootstock through *Agrobacterium rhizogenes*”, *International Plant and Animal Genome Conference*, 23, Turkey.
6. Kan Wang (2006), *Agrobacterium protocols*, Humana Press, New Jersey.
7. Liu D. H., Ren W. W., Cui L. J., Zhang L. D., Sun X. F., Tang K. X. (2011), “Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2”, *African Journal of Biotechnology*, 10(17), 3260-3268.
8. Milen I. G., Atanas I. P., Thomas B. (2007), “Hairy root tipe plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 1175-1185.
9. Mohsen Zargar, Farah Farahani, Tahereh Nabavi (2010), “Hairy roots production of transgenic *Catharanthus roseus* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* under *in vitro* conditions”, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(21), 2199-2203.
10. Rajkumar D., Murugesan R. (2014), “Hairy root induction of *Psoralea corylifolia* for enhanced production of antifungal compound against red rots pathogen *Colletotrichum falcatum*”, *African Journal of Agricultural Research*, 9(8), 755-765.
11. Sreeramanan S., Maziah M., Abdullah M. P., Sariah M., Xavier R. (2006), “Transient expression of *gusA* and *gfp* gene in *Agrobacterium*-mediated banana transformation using single tiny meristematic bud”, *Asian Journal of Plant Sciences*, 5(3), 468-480.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 24-9-2015; ngày phản biện đánh giá: 01-10-2015;
ngày chấp nhận đăng: 22-12-2015)