

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Nghiên cứu hệ thống nuôi cấy rễ tơ và biểu hiện gen mã hóa enzyme columbamine O-methyltransferase nhằm tăng hàm lượng rotundin ở cây Bình vôi (*Stephania* spp).
- Mã số: B2019-TNA-09
- Chủ nhiệm đề tài: TS. Phạm Thị Thanh Nhân
- Tổ chức chủ trì: Đại học Thái Nguyên
- Thời gian thực hiện: 24 tháng, gia hạn đến tháng 6/2022.

2. Mục tiêu:

- Tạo được dòng rễ tơ cây Bình vôi bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* tế bào thực vật;
- Tạo được dòng cây Bình vôi chuyển gen có hàm lượng rotundin cao hơn cây không chuyển gen;
- Đánh giá được hàm lượng và chất lượng hoạt chất rotundin trong rễ, củ cây Bình vôi tự nhiên, cây *in vitro*, rễ tơ và cây chuyển gen.

3. Tính mới và sáng tạo:

- Định danh được mẫu cây Bình vôi Việt Nam có trong Sách đỏ bằng mã vạch DNA kết hợp phân tích các đặc điểm về hình thái và giải phẫu;
- Xây dựng được hệ thống tái sinh *in vitro* phục vụ chuyển gen ở cây Bình vôi và quy trình chuyển gen vào cây Bình vôi;
- Xác định được môi trường nuôi cấy *in vitro* tạo dòng rễ tơ cây Bình vôi.
- Lần đầu tiên được gen mã hóa enzyme columbamine O-methyltransferase được biểu hiện thành công ở cây chuyển gen.

4. Kết quả nghiên cứu

- Định danh một số mẫu cây Bình vôi Việt Nam bằng mã vạch DNA kết hợp phân tích các đặc điểm về hình thái và giải phẫu.
- Nghiên cứu hệ thống tái sinh *in vitro* phục vụ chuyển gen ở cây Bình vôi.
- Nghiên cứu tạo sinh khối rễ tơ cây Bình vôi bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* tế bào thực vật.
- Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa enzyme columbamine O-methyltransferase ở cây Bình vôi
- Xác định và so sánh hàm lượng hoạt chất rotundin trong rễ cây Bình vôi tự nhiên, cây *in vitro*.

5. Sản phẩm

5.1. Sản phẩm khoa học: 01 Bài báo SCIE (Q2), 01 Bài báo Scopus, 01 bài báo quốc tế khác, 02 Bài báo khoa học đăng trên tạp chí trong nước

- (1) Tan Quang Tu, Phat Tien Do, Doai Van Nguyen, Nhan Thi Thanh Pham, Tam Thi Nguyen, Mau Hoang Chu (2021), “The columbamine O-methyltransferase gene (*CoOMT*) is capable of increasing alkaloid content in transgenic tobacco plants”, *Molecular Biology Reports*, <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07074-6>
- (2) Nhan Thi Thanh Pham, Dung Phuong Le, Khanh Thi Ngoc Pham, Xaykham Thippavong, Mau Hoang Chu (10/2021), “DNA barcode of matK combined with ITS effectively distinguishes the medicinal plant *Stephania brachyandra* Diels collected in LaoCai, Vietnam”, *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 9(6): 63-70. DOI: 10.7324/JABB.2021.9608. ISSN: 2455-7005, 2347-212X. Scopus; Q3.
- (3) Hiep Hoang Phu, Thao Thi Phuong Cao, Danh Thuong Sy, Thi Thanh Nhan Pham (2021), “Identification of *Stephania* spp. Collected in Laocai province of Vietnam by morphology, anatomy and DNA barcode methods”, *CASEAN* 7, 222-232.
- (4) Tangmany SYSOMEPHONE, Ngô Diễm Quỳnh, PHANTHAHAK Santhana, Nongkhan MANISOK, Phạm Thị Thanh Nhân (2020), “Nghiên cứu công thức khử trùng mẫu và môi trường nuôi cấy in vitro cây Bình vôi vàng (*Stephania* spp.)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 225(08): 239 – 244, ISSN: 1859-2171.
- (5) Phạm Thị Thanh Nhân, Trần Thị Hồng, Hoàng Phú Hiệp, Cao Thị Phương Thảo, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu (2020), “Nghiên cứu công thức khử trùng mẫu và môi trường nuôi cấy in vitro cây Bình vôi hoa đầu (*Stephania cepharantha* Hayata)”, *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, 914-919

5.2. Sản phẩm đào tạo: 04 Luận văn thạc sỹ, hỗ trợ 02 Đề tài NCKH sinh viên, 03 KLTN, 01 đề tài NCKH của học sinh đạt giải 03 cấp thành phố.

- (1) ThS Thongkham LAPHASY (bảo vệ 2019), tên luận văn: “Nghiên cứu môi trường nuôi cấy in vitro cây Bình vôi (*Stephania* spp)”.
- (2) ThS Tangmany Sysomephone (bảo vệ 2020), tên luận văn: “Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa enzyme columbamine O- methyltransferase ở cây Bình vôi (*Stephania* spp.)”.
- (3) ThS Xaykham Thippavong (bảo vệ 8/2021), tên luận văn: “Nghiên cứu chuyển gen mã hóa enzyme CoOMT vào cây thuốc lá (*Nicotiana Tabacum* L.)” .
- (4) ThS Phạm Thị Ngọc Khánh (bảo vệ 8/2021), tên luận văn: “Định danh mẫu cây Bình vôi (*Stephania* spp.) thông qua đặc điểm hình thái, giải phẫu và DNA barcode”.

(5) HVCH. Ngô Diễm Quỳnh (dự kiến bảo vệ 10/2022), tên luận văn: Nghiên cứu chuyển gen *vidA* vào cây Bình vôi

(6) HVCH. Phanthahak Santhana (dự kiến 8/2022, đã làm thủ tục), tên luận văn: Nghiên cứu chuyển cấu trúc mang gen mã hoá enzyme columbamine O-methyltransferase vào cây Bình vôi (*Stephania brachyandra* Diels)

5.3. Sản phẩm ứng dụng: 03

- Quy trình nuôi cấy rễ tơ được sử dụng để thu nhận chất rotundin có hàm lượng cao;
- Quy trình nhân giống *in vitro* được sử dụng phục vụ công tác bảo tồn, khai thác, sản xuất.
- Quy trình chuyển gen mã hoá enzyme columbamine O-methyltransferase

5.4. Sản phẩm khác

Sản phẩm đăng kí sở hữu trí tuệ gồm: 01 Quy trình chuyển gen mã hoá enzyme columbamine O-methyltransferase được chấp nhận đơn.

6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu

6.1. Phương thức chuyển giao

Quy trình nhân giống *in vitro* được chuyển giao cho các Trung tâm giống cây được liệt kê để góp phần vào công tác bảo tồn, khai thác nguồn gen và sản xuất cây dược liệu này.

Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược có thể sử dụng quy trình tạo sinh khối rễ tơ để thu nhận dược chất rotundin có hàm lượng cao, an toàn sinh học.

Sau khi chuyển thành công cấu trúc mang gen chuyển vào cây Bình vôi nghiên cứu, vector chuyển gen được sử dụng để chuyển vào các mẫu cây Bình vôi khác, góp phần cải thiện hàm lượng rotundin của các loài cây Bình vôi, đáp ứng nhu cầu sử dụng dược chất rotundin trong y học.

6.2. Địa chỉ ứng dụng

- Các phòng thí nghiệm về Công nghệ sinh học, Sinh học phân tử, Di truyền học, Sinh học thực nghiệm của các trường đại học thuộc Đại học Thái Nguyên, Trung tâm giống cây thuốc có thể sử dụng quy trình nhân giống *in vitro* và tạo sinh khối rễ tơ phục vụ công tác bảo tồn, khai thác, và sản xuất.
- Tăng cường năng lực nghiên cứu, đào tạo của Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Đề tài góp phần tạo điều kiện cho các cán bộ trẻ, sinh viên, học viên cao học, nghiên cứu sinh tham gia nghiên cứu khoa học, tạo ra sản phẩm phục vụ phát triển kinh tế xã hội khu vực miền núi phía Bắc. Góp phần sử dụng hiệu quả hệ thống thiết bị nghiên cứu của trường Đại học Sư phạm –Đại học Thái Nguyên.

- Tạo điều kiện cho phát triển đào tạo ngành Công nghệ sinh học, Di truyền học, Sinh học thực nghiệm thuộc hệ đào tạo Đại học, Sau đại học (thạc sĩ, tiến sĩ) tại Trường Đại học Sư phạm- Đại học Thái Nguyên.

6.3. Tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu

6.3.1. Đối với lĩnh vực giáo dục và đào tạo

Kết quả nghiên cứu của đề tài là tài liệu phục vụ nghiên cứu, đào tạo sinh viên, học viên cao học ngành sinh học, công nghệ sinh học, góp phần nâng cao chất lượng, hiệu quả đào tạo và nghiên cứu khoa học của Trường Đại học Sư phạm- Đại học Thái Nguyên. Đồng thời, đề tài góp phần tăng cường năng lực, kỹ năng ứng dụng Công nghệ sinh học cho giảng viên các cơ sở đào tạo đại học liên quan đến Sinh học và Công nghệ sinh học.

NCS, học viên, sinh viên được tiếp cận với công nghệ mới, rèn luyện kỹ năng phục vụ cho thực tiễn chuyên môn sau này.

6.3.2. Đối với lĩnh vực khoa học và công nghệ có liên quan

Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ là cơ sở ứng dụng kỹ thuật chuyển gen vào việc nâng cao hàm lượng rotundin của cây Bình vôi.

6.3.3. Đối với phát triển kinh tế-xã hội

Kết quả nghiên cứu tạo vector chuyển gen và tạo được các dòng Bình vôi chuyển gen có hàm lượng rotundin cao sẽ được sử dụng để chuyển vào các mẫu cây Bình vôi khác ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu của đề tài mở ra triển vọng tạo cây trồng chuyển gen có hàm lượng rotundin cao, đáp ứng được nhu cầu về dược chất này.

6.3.4. Đối với tổ chức chủ trì và các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu

Đề tài góp phần bồi dưỡng khả năng nghiên cứu của các giảng viên trẻ, hình thành nhóm nghiên cứu mạnh về lĩnh vực ứng dụng công nghệ gen ở cây trồng. Đồng thời, kết quả nghiên cứu khẳng định khả năng làm chủ Công nghệ sinh học mới, ứng dụng được vào thực tiễn; Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật có thể được sử dụng trong khai thác và bảo tồn nguồn gen cây dược liệu quý hiếm.

Thỏi Nguyễn, ngày 15 tháng 01 năm 2022

Tổ chức chủ trì

(ký, họ và tên, đóng dấu)

Chủ nhiệm đề tài

(ký, họ và tên)

TS. Phạm Thị Thanh Nhân

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information

- Project title: Nghiên cứu hệ thống nuôi cấy rễ tơ và biểu hiện gen mã hóa enzyme columbamine O-methyltransferase nhằm tăng hàm lượng rotundin ở cây Bình vôi (*Stephania* spp).
- Code number: B2019-TNA-09
- Coordinator: Dr. Pham Thi Thanh Nhan
- Implementing institution: Thai Nguyen University
- Duration: 24 months, extension time: 6/2022

2. Objective(s)

- Created the *Stephania* root-hair line by the in vitro plant cell culture;
- Created the *Stephania* transgenic line with high rotundin content compared to WT;
- Evaluated the content and quality of active rotundin in the roots, tubers of natural, in vitro, hairy roots and transgenic *Stephania* plants.

3. Creativeness and innovativeness

- Identified samples of Vietnamese *Stephania* plants listed in the Red Book by DNA barcodes combined with morphological and anatomical features;
- Built an in vitro regeneration system for transformation and the transgene protocol in the *Stephania* plants.
- Determined the in vitro culture medium to create the hairy root line of the *Stephania* plants.
- For the first time, the gene encoding the enzyme columbamine O-methyltransferase was successfully expressed in transgenic plants.

4. Research results

- Identification of some samples of Vietnamese *Stephania* plants by DNA barcode combined with analysis of morphological and anatomical features.
- Study on in vitro regeneration system for transformation in the *Stephania* plants.
- Study on the production of hairy root biomass of the *Stephania* plants by in vitro culture techniques.
- Study on gene expression encoding columbamine O-methyltransferase enzyme in the *Stephania* plants
- Determination and comparison of active rotundin in the roots of natural, in vitro

Stephania plants

5. Products

5.1. Scientific products published: 01 SCI paper (Q2), 01 Scopus article, 01 international article, 02 papers published in the domestic magazines.

- (1) Tan Quang Tu, Phat Tien Do, Doai Van Nguyen, Nhan Thi Thanh Pham, Tam Thi Nguyen, Mau Hoang Chu (2021), “The columbamine O-methyltransferase gene (CoOMT) is capable of increasing alkaloid content in transgenic tobacco plants”, *Molecular Biology Reports*, <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07074-6>
- (2) Nhan Thi Thanh Pham, Dung Phuong Le, Khanh Thi Ngoc Pham, Xaykham Thipphavong, Mau Hoang Chu (10/2021), “DNA barcode of matK combined with ITS effectively distinguishes the medicinal plant *Stephania brachyandra* Diels collected in LaoCai, Vietnam”, *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 9(6): 63-70. DOI: 10.7324/JABB.2021.9608. ISSN: 2455-7005, 2347-212X. Scopus; Q3.
- (3) Hiep Hoang Phu, Thao Thi Phuong Cao, Danh Thuong Sy, Thi Thanh Nhan Pham (2021), “Identification of *Stephania* spp. Collected in Laocai province of Vietnam by morphology, anatomy and DNA barcode methods”, *CASEAN* 7, 222-232.
- (4) Tangmany SYSOMEPHONE, Ngo Diem Quynh, PHANTHAHAK Santhana, Nongkhan MANISOK, Pham Thi Thanh Nhan (2020), “Study of the sterilization formula and in vitro medium of yellow *Stephania* spp.” *Journal of Science and Technology*, 225(08): 239 – 244, ISSN: 1859-2171.
- (5) Pham Thi Thanh Nhan, Tran Thi Hong, Hoang Phu Hiep, Cao Thi Phuong Thao, Tu Quang Tan, Chu Hoang Mau (2020), “Study on sterilization and the in vitro culture medium of *Stephania cepharantha* Hayata”, *Scientific Report of the National Biotechnology Conference*, 914-919.

5.2. Training products:

04 Master thesis, 02 students’ scientific projects, 03 graduation thesis, 01 pupils’ scientific research project with the **3rd city prize**.

- (1) Master Thongkham LAPHASY (defended 2019), thesis title: “Study on the in vitro culture medium of *Stephania* spp.”.
- (2) Master Tangmany Sysomephone (defended 2020), thesis title: “Design the expression vector structure containing gene encoding enzyme columbamine O-methyltransferase in *Stephania* spp.”.
- (3) Master Xaykham Thipphavong (defended 8/2021), thesis title: “Study on transformation of gene encoding enzyme columbamine O- methyltransferase into *Nicotiana Tabacum* L.”.

- (4) Master Pham Thi Ngoc Khanh (defended 8/2021), thesis title: “Identification of some samples of *Stephania* spp. plants by morphological and anatomical features and DNA barcode”.
- (5) Master candidate Ngo Diem Quynh (defended 10/2022), thesis title: Study on transformation of gene *vidA* into *Stephania* spp.
- (6) Master candidate Phanthahak Santhana (defended 8/2022, waiting for the Decision), thesis title: Study on transformation of the transgenic structure containing gene encoding enzyme columbamine O- methyltransferase into *Stephania brachyandra* Diels plant.

5.3. Application products: 03

- Protocol of hairy root culture for obtaining high rotundin content;
- Protocol of the in vitro propagation for preservation, exploitation, and production.
- Transformation protocol of the gene encoding columbamine O-methyltransferase enzyme.

5.4. Other results

Products registered for intellectual property include: 01 Application of transformation protocol of the gene encoding columbamine O-methyltransferase enzyme was accepted.

6.1. *Transfer alternatives*

The in vitro propagation protocol will be transferred to the Centers of Medicinal Plants to contribute to the conservation, exploitation of genetic resources and production of this medicinal plant.

The Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, can use the protocol of creating hairy root biomass to obtain high-quality, bio-safe rotundin.

After successfully transferring the transgenic structure into the *Stephania* plant, the transgenic vector was used to transfer into other *Stephania* samples, contributing to improving the rotundin content, meeting demands for rotundin in medicine.

6.2. *Application institutions*

- Laboratories of Biotechnology, Molecular Biology, Genetics, Experimental Biology of universities belonging to Thai Nguyen University, Center of Medicinal Plants can use protocols of the in vitro propagation and hairy root biomass for conservation, exploitation, and production.
- Strengthening the research and training capacity of the University of Education-Thai Nguyen University. The project contributes to creating conditions for young officials, students, master candidates to participate in scientific research and create products for socio-economic development in the Northern mountainous region. Also, it contributes to the effective use of the research equipment system of the

University of Education- Thai Nguyen University.

- Create conditions for the training development of Biotechnology, Genetics, and Experimental Biology belonging to the Undergraduate and Postgraduate training system (Master, Doctor) at the University of Education - Thai University.

6.3. Impacts and benefits of research results

6.3.1. For education and training fields

The results are materials for researching and training students, master candidates in fields of Biology, Biotechnology. Particularly, this project contributes to fostering young lecturers' research capabilities, improving the quality, effectiveness of training and scientific research of Thai Nguyen University of Education. Contemporaneous, it is the cohesion between theory and practice and application of advances in modern biotechnology in reality.

PhD and Master candidates, trainees, students have opportunity to approach new technology, practice skills for future profession.

6.3.2. For related science and technology fields

The results of the project will be the basis for applying transgenic technique to improve the rotundin content in *Stephania* spp. plants.

6.3.3. For social- economic development

The research results of designing transgenic vector and creating transgenic lines with high rotundin content will be used to transfer into other samples of the *Stephania* spp. plant in Vietnam. Research results opened up the prospect of creating transgenic plants with high rotundin content to meet the demand for this drug.

6.3.4. For the implementing institution and the application organization

The project contributes to fostering the research capability of young lecturers, forming a strong research group in the field of gene technology application in plants. Contemporaneously, the research results confirm the ability to master new biotechnology, which can be applied in reality; Plant tissue culture technology can be used in exploiting and preserving genetic resources of rare medicinal plants.