

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TÁI SINH ĐA CHỒI CÂY DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus urinaria* L.)

Bùi Thị Hà^{1*}, Phạm Thị Hồng Loan², Nguyễn Thị Tâm²

¹Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên,

²Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Viêm gan B là một trong những bệnh truyền nhiễm gây tử vong nhiều nhất trên thế giới. Diệp hạ châu là cây thuốc có được tính sử dụng để chữa nhiều bệnh ở người, đặc biệt là điều trị viêm gan B. Trong cây Diệp hạ châu có chứa phyllanthin, hypophyllanthin, triacontanol có khả năng giải độc, khôi phục chức năng bình thường của gan, tốt trong các trường hợp suy giảm chức năng gan do sử dụng nhiều bia rượu. Các chất này làm gia tăng lượng glutathione - chất bảo vệ gan thường bị thiếu trầm trọng ở những người thường xuyên sử dụng bia rượu. Trong bài báo này chúng tôi trình bày về khả năng tái sinh đa chồi của cây diệp hạ châu nhằm tăng hiệu suất chuyển gen. Khử trùng hạt trong dung dịch javen 60% ở 10 phút, môi trường thích hợp cho sự phát sinh chồi và sinh trưởng chồi là môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP 1 mg/l; pH = 5,8. Môi trường thích hợp cho tạo cây hoàn chỉnh là môi trường MS cơ bản có bổ sung NAA 0,5 mg/l; pH = 5,8.

Từ khóa: *Diệp hạ châu, đa chồi, tái sinh, viêm gan B, in vitro.*

Ngày nhận bài: 04/11/2019; Ngày hoàn thiện: 15/01/2020; Ngày đăng: 31/01/2020

PROTOCOL FOR MULTI – SHOOT REGENERATION OF DIEP HA CHAU (*Phyllanthus urinaria* L.)

Bui Thi Ha^{1*}, Pham Thi Hong Loan², Nguyen Thi Tam²

¹TNU - University of Medicine and Pharmacy

²TNU - University of Education

ABSTRACT

Hepatitis B is one of the most deadly infectious diseases in the world. Diep Ha Chau is a medical plant used for treating many human's diseases, especially Hepatitis B. Diep Ha Chau contains phyllanthin, hypophyllanthin and triacontanol which are able to detoxify and recover normal function of the liver, even in cases of liver impairment due to alcohol abuse. These substances increase the amount of glutathione - a liver protecting agent that is severely lack in patients who regularly use alcohol. In this paper, we indicate "the multi-shoot regeneration capacity" of Diep Ha Chau to increase gene transferring efficiency. First, sterilize seeds in "javen" 60% in about 10 minutes, the suitable environment for shoot propagation and growth is basic MS added BAP 1 mg/l; pH = 5.8. The suitable environment for complete plant formation is basic MS added NAA 0.5 mg/l; pH = 5.8.

Keywords: *Diep Ha Chau, multi-shoot, regeneration, Hepatitis B, in vitro.*

Received: 04/11/2020; Revised: 15/01/2020; Published: 31/01/2020

* Corresponding author. Email: Buihayk@gmail.com

1. Mở đầu

Hiện nay, trên toàn cầu có ít nhất 2 tỷ người đang mang trên người virus viêm gan B, khoảng 400 triệu người đang bị viêm gan B mãn tính và sẽ có ít nhất 250 ngàn người thiệt mạng mỗi năm. Việt Nam thuộc các nước có tỷ lệ viêm gan B cao nhất thế giới.

Cứ 6 đến 7 người Việt Nam thì có 1 người đang bị nhiễm virus viêm gan B. Căn bệnh này nếu được phát hiện ở giai đoạn đầu điều trị khỏi bệnh là rất lớn. Hiện nay nhu cầu thuốc chữa viêm gan B và các loại bệnh khác rất cao đặc biệt các chế phẩm thuốc từ cây dược liệu [1].

Việt Nam là nước có nguồn thực vật phong phú, trong đó thuốc từ dược liệu chiếm 30%. Để thực hiện một trong các trọng điểm của định hướng chiến lược phát triển của ngành Y - Dược là đẩy mạnh công tác trồng trọt cây thuốc trên quy mô lớn, phát triển nguồn dược liệu hàng hoá phục vụ cho việc điều trị trong nước và xuất khẩu, mở ra cơ hội lớn cho việc giao thương, tham gia thị trường quốc tế về dược liệu và dược phẩm có nguồn gốc tự nhiên. Vì thế, việc trồng và bảo tồn cây dược liệu rất cần thiết. Đẩy mạnh nghiên cứu, ứng dụng các tiến bộ khoa học kỹ thuật để tạo ra các loại giống dược liệu có năng suất, chất lượng đáp ứng yêu cầu sản xuất [2].

Diệp hạ châu là cây thuốc có dược tính sử dụng để chữa nhiều bệnh ở người. Vùng phân bố của Diệp hạ châu khá rộng, cây mọc hoang tại Việt Nam và nhiều nước khác trên thế giới, như Ấn Độ, Trung Quốc, Cu Ba, Peru, Nigeria, Malaysia, Philippines, Guam, Brazil... [3], [4], [5].

Năm 1995, các nhà khoa học Brazil cũng phát hiện tác dụng giảm đau mạnh và bền vững của loài cây này. Tác dụng này là do gallic acid, có khả năng bảo vệ khi gan bị viêm, tổn thương gan do bia rượu. Theo y học cổ truyền, Diệp hạ châu vị đắng hơi ngọt, tính mát, quy kinh vào can, đờm nên có tác dụng kích thích tiêu hóa, tăng tiết mật, giải độc [6], [7]. Chirdchupunseree và Pramyothin (2010) chứng minh vai trò của phyllanthin trong việc bảo vệ tế bào gan do đối kháng với những ảnh hưởng gây độc gan của cồn ethanol [8], [9].

Hàm lượng các dược chất trong Diệp hạ châu tự nhiên rất thấp, lá khô chứa các chất đắng hypophyllanthin (0,05%), phyllanthin (0,35%) [10]. Một trong những biện pháp tăng lượng phyllanthin, hypophyllanthin, triacontanol trong diệp hạ châu là phương pháp chuyển gen tăng hoạt tính của enzyme xúc tác các phản ứng tạo dược chất. Tuy nhiên, để chuyển gen thành công điều kiện tiên quyết là phải xây dựng hệ thống tái sinh phù hợp.

2. Vật liệu và phương pháp

Sử dụng hạt giống cây Diệp hạ châu thu thập tại khu vực đồi thuộc huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên. Hạt nhỏ, có màu vàng đậm.

Hạt cây diệp hạ châu được khử trùng trong dung dịch javen 60%. (nồng độ NaOCl của dung dịch javen ban đầu là 8%, javen được sử dụng là của công ty cung cấp hóa chất Vietchem Việt Nam). Hạt được nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản có pH = 5,8. Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng như BAP, kinetin lên sự phát triển của đoạn thân mang mắt chồi bên. Các đoạn thân mang mắt tạo chồi bên được cấy lên môi trường MS cơ bản bổ sung BAP hoặc kinetin nồng độ từ 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l, pH = 5,8. Mỗi công thức nuôi cấy trên 30 mô, lặp lại 3 lần. Kết quả được đánh giá sau 4, 8 tuần nuôi cấy. Theo dõi các chỉ số sau: (1) Số chồi/mẫu, (2) Số lá/chồi, (3) Chiều cao của chồi (cm), (4) Chất lượng chồi: Chồi sinh trưởng tốt: Chồi mập, lá xanh; Chồi sinh trưởng trung bình: Chồi gầy, lá xanh; Chồi sinh trưởng kém: Chồi gầy, lá xanh nhạt hoặc xoắn, chồi bị dị dạng.

Sử dụng toán thống kê để xác định các chỉ số thống kê như: Trung bình mẫu, phương sai, độ lệch chuẩn và sai số trung bình mẫu với $n \geq 30$, $\alpha = 0,05$. Các số liệu được xử lý trên máy vi tính bằng chương trình Excel. Các phương pháp được sử dụng là phương pháp so sánh nhiều mẫu độc lập theo tiêu chuẩn phi tham số của Kruskal và Wallis, phương pháp phân tích phương sai một nhân tố.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả khử trùng hạt

Trong kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào trong ống nghiệm thì kỹ thuật vô trùng mẫu tạo vật liệu

cho nuôi cấy rất quan trọng. Việc lựa chọn loại hóa chất khử trùng, nồng độ và thời gian khử trùng sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả vô trùng. Diệp hạ châu được khử trùng bằng cồn 70⁰ trong 1 phút, dung dịch javen 60%, với các khoảng thời gian khử trùng khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khử trùng hạt (sau 10 ngày)

Thời gian khử trùng (phút)	Số hạt khử trùng (hạt)	Tỉ lệ hạt nảy mầm (%)	Tỉ lệ hạt không nhiễm (%)	Tỉ lệ hạt nảy mầm không nhiễm (%)	Hình thái mầm
5	120	69,17 ± 2,50	50,33 ± 2,04	47,34 ± 1,54	Mập, XBT
10	120	90,83 ± 2,85	77,50 ± 2,10	72,50 ± 3,15	Mập, XBT
15	120	66,67 ± 3,60	83,35 ± 2,35	54,50 ± 3,63	Mập, XBT
20	120	30,83 ± 0,83	95,00 ± 2,15	29,17 ± 0,83	Gầy, Vàng

Chú thích; XBT: Xanh bình thường

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng của chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

Nồng độ BAP (mg/l)	Sau 4 tuần				Sau 8 tuần			
	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi
0	1,07 ± 0,05	1,16 ± 0,04	3,10 ± 0,09	+	1,10 ± 0,06	3,52 ± 0,18	5,47 ± 0,13	+
0,5	2,00 ± 0,11	1,37 ± 0,03	3,30 ± 0,13	+++	2,07 ± 0,12	3,65 ± 0,11	5,80 ± 0,19	+++
1,0	2,73 ± 0,13	1,77 ± 0,05	3,50 ± 0,12	+++	3,00 ± 0,11	3,72 ± 0,18	6,47 ± 0,18	+++
1,5	1,53 ± 0,10	1,41 ± 0,03	3,13 ± 0,10	+++	1,57 ± 0,10	3,25 ± 0,13	5,53 ± 0,13	+++
2,0	1,13 ± 0,06	1,23 ± 0,02	2,80 ± 0,10	++	1,20 ± 0,07	2,79 ± 0,14	5,16 ± 0,11	++

Từ kết quả bảng 1 cho thấy, sử dụng javen 60% khử trùng hạt với thời gian tăng dần từ 5 - 10 phút thì tỉ lệ hạt nảy mầm tăng tương ứng 69,17%; 90,83%, mầm mập, xanh bình thường. Nếu hạt tiếp xúc với javen nhiều hơn 10 phút thì tỉ lệ hạt chết cao, chất lượng mầm giảm. Công thức khử trùng tối ưu nhất tại thời gian 10 phút, tỉ lệ hạt không bị nhiễm 90,83%, tỉ lệ hạt nảy mầm 77,50%, tỉ lệ hạt nảy mầm không bị nhiễm đạt 72,50%.

Từ kết quả khử trùng hạt Diệp hạ châu, chúng tôi so sánh với các nghiên cứu khác như nghiên cứu của Vũ Thị Như Trang (2018) khử trùng hạt thỏ nhàn sâm hay nghiên cứu của Bùi Thị Hà (2017) khử trùng hạt dừa cạn đều sử dụng dung dịch javen 60% với thời gian là 10 phút cho tỷ lệ nảy mầm cao [10], [11].

3.2. Kết quả ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh chồi và sinh trưởng của chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

BAP là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin. BAP ảnh hưởng rõ rệt và đặc

trung đến sự phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là phân hóa chồi. BAP được sử dụng rộng rãi cho quá trình cảm ứng chồi ở nhiều loại cây khác nhau.

Kết quả bảng 2 cho thấy, môi trường nuôi cấy bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau thì sự phát sinh và sinh trưởng chồi khác nhau. Ở môi trường đối chứng, sau 4 tuần và 8 tuần kết quả số chồi/mẫu đạt 1,07; 1,10 chồi, chiều cao chồi tương ứng 1,16; 3,52 cm, số lá/chồi đạt 3,10; 5,47 lá.

So với các nghiên cứu của Bùi Thị Hà và Vũ Thị Như Trang, nồng độ BAP sử dụng là 0,5 mg/l cho tỷ lệ chồi cao ở giai đoạn 4 tuần tuổi.

3.3. Kết quả ảnh hưởng của kinetin đến sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

Kinetin là chất điều hòa sinh trưởng được tổng hợp nhân tạo. Kinetin kích thích sự phát triển chồi của thực vật [12]. Dựa trên những đặc tính của kinetin chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của kinetin lên sự phát sinh chồi và sinh trưởng của Diệp hạ châu.



A. ĐC



B. BAP 1,0mg/l

Hình 1. Ảnh hưởng của BAP 1,0mg/l đến phát sinh chồi và sự sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên (sau 8 tuần)

Bảng 3. Ảnh hưởng của kinetin đến sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

Nồng độ Kinetin (mg/l)	Sau 4 tuần				Sau 8 tuần			
	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi
0	1,07 ± 0,05	1,16 ± 0,04	3,10 ± 0,09	+	1,10 ± 0,06	3,52 ± 0,12	5,47 ± 0,13	+
0,5	2,03 ± 0,11	1,34 ± 0,03	3,17 ± 0,14	+++	2,13 ± 0,14	3,57 ± 0,11	5,67 ± 0,17	+++
1,0	2,63 ± 0,11	1,73 ± 0,05	3,40 ± 0,13	+++	2,76 ± 0,09	3,66 ± 0,16	6,27 ± 0,19	+++
1,5	1,70 ± 0,14	1,40 ± 0,03	3,03 ± 0,09	++	1,80 ± 0,14	3,24 ± 0,13	5,43 ± 0,12	++
2,0	1,17 ± 0,07	1,21 ± 0,02	2,80 ± 0,09	++	1,20 ± 0,07	2,76 ± 0,13	5,07 ± 0,10	++

Chú thích: +++: chồi tốt; ++: chồi trung bình, +: Chồi kém.

Bảng 3 cho thấy, sự phát sinh chồi và sinh trưởng của chồi Diệp hạ châu đạt hiệu quả cao nhất khi bổ sung kinetin 1,0mg/l. Sau 4 tuần nghiên cứu tỉ lệ số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi đạt: 2,63 (chồi); 1,73 (cm); 3,40 (lá). Sau 8 tuần số chồi/mẫu đạt 2,76 chồi, chiều cao chồi đạt 3,66 cm, số lá/ chồi đạt 6,27. Sau 8 tuần, so sánh môi trường nuôi cấy bổ sung BAP 1,0 mg/l và môi trường bổ sung kinetin 1,0 mg/l số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi cây trên môi trường bổ sung BAP đều cao hơn môi trường bổ sung kinetin. Do đó, chúng tôi chọn môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l là phù hợp cho phát sinh chồi và sự sinh trưởng chồi của Diệp hạ châu.

3.4. Ảnh hưởng kết hợp giữa BAP và NAA đến phát sinh chồi và sự sinh trưởng của chồi tái sinh từ đoạn thân mang mắt chồi bên

NAA là chất điều hoà sinh trưởng nhân tạo, có tác dụng mạnh trong nuôi cấy mô thực vật. Tỉ lệ auxin/cytokinin rất quan trọng đối với việc hình thành hình thái của cây trong hệ thống

nuôi cấy *in vitro*. Tỉ lệ auxin/cytokinin nhỏ hơn 1 kích thích chồi phát triển [12]. Vì vậy, chúng tôi kết hợp nồng độ BAP 1,0mg/l với NAA lần lượt 0,2 mg/l; 0,4 mg/l; 0,6 mg/l; 0,8 mg/l. Sau 4, 8 tuần nuôi cấy thu được kết quả ở bảng 4. Như vậy, môi trường MS bổ sung BAP 1,0 mg/l + đường sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l, pH = 5,8 là thích hợp cho phát sinh chồi và sự sinh trưởng của chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên. Qua 2 thời điểm lấy kết quả cho thấy, công thức bổ sung BAP 1,0mg/l không bổ sung cho số chồi/mẫu tốt nhất. Khi bổ sung NAA thì tỉ lệ chồi/mẫu thấp hơn hẳn, chứng tỏ quá trình tạo chồi bị ức chế khi kết hợp với NAA. Như vậy, môi trường MS bổ sung BAP 1,0 mg/l + đường sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l, pH = 5,8 là thích hợp cho phát sinh chồi và sự sinh trưởng của chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên.

Kết quả này là phù hợp khi so sánh với các nghiên cứu trước đó.

Bảng 4. Ảnh hưởng kết hợp của BAP 1,0mg/l và NAA đến sự phát sinh chồi và sinh trưởng của chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

Nồng độ NAA (mg/l)	Sau 4 tuần				Sau 8 tuần			
	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi
0	2,73 ± 0,13	1,77 ± 0,05	3,50 ± 0,12	+++	3,00 ± 0,11	3,72 ± 0,18	6,47 ± 0,18	+++
0,2	2,63 ± 0,16	1,73 ± 0,08	3,40 ± 0,11	+++	2,93 ± 0,17	2,93 ± 0,18	6,33 ± 0,22	+++
0,4	2,43 ± 0,10	1,60 ± 0,06	3,23 ± 0,08	+++	2,63 ± 0,14	2,77 ± 0,17	6,03 ± 0,23	+++
0,6	2,03 ± 0,14	1,52 ± 0,08	3,20 ± 0,10	+++	2,20 ± 0,17	2,68 ± 0,17	5,76 ± 0,20	+++
0,8	1,53 ± 0,11	1,38 ± 0,05	3,10 ± 0,12	++	1,70 ± 0,14	2,13 ± 0,17	5,20 ± 0,18	++

Chú thích: +++: chồi tốt; ++: chồi trung bình



A. BAP 1,0mg/l



B. BAP 1,0mg/l, NAA 0,8mg/l

Hình 3. Ảnh hưởng kết hợp của BAP 1,0mg/l và NAA 0,8mg/l đến sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng của chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên (sau 8 tuần)**Bảng 5.** Ảnh hưởng kết hợp của BAP 1,0mg/l và IBA đến sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng của chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên

Nồng độ IBA (mg/l)	Sau 4 tuần				Sau 8 tuần			
	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi
0	2,73 ± 0,13	1,77 ± 0,05	3,50 ± 0,12	+++	3,00 ± 0,11	3,72 ± 0,18	6,47 ± 0,18	+++
0,2	2,60 ± 0,15	1,72 ± 0,05	3,40 ± 0,13	+++	2,70 ± 0,14	3,39 ± 0,19	6,23 ± 0,20	+++
0,4	2,40 ± 0,16	1,66 ± 0,06	3,27 ± 0,11	+++	2,53 ± 0,17	2,98 ± 0,18	5,90 ± 0,22	+++
0,6	2,27 ± 0,16	1,60 ± 0,05	3,13 ± 0,10	++	2,37 ± 0,19	2,81 ± 0,17	5,63 ± 0,23	++
0,8	1,97 ± 0,18	1,53 ± 0,05	3,07 ± 0,09	+	2,07 ± 0,17	2,71 ± 0,16	5,30 ± 0,24	+

Chú thích: +++: chồi tốt; ++: chồi trung bình; +: chồi kém

3.5. Ảnh hưởng kết hợp giữa BAP và IBA đến sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng của chồi tái sinh từ mắt chồi bên

IBA là loại auxin tổng hợp nhân tạo. IBA thích hợp trong nuôi mô tế bào thực vật, giai đoạn tạo chồi kết hợp IBA với nhóm cytokinin cho số chồi/mẫu đạt kết quả cao [13]. Tương tự như kết hợp BAP với NAA, chúng tôi thăm dò sự kết hợp giữa BAP 1,0 mg/l và IBA ở nồng độ 0,2 mg/l; 0,4 mg/l; 0,6 mg/l; 0,8 mg/l. Kết quả sau 4, 8 tuần nuôi cấy thu được ở bảng 5.

Kết quả bảng 5 cho thấy, kết hợp BAP và IBA đã làm giảm số chồi/mẫu so với đối chứng. Tỷ lệ số chồi chồi/mẫu khi môi trường bổ sung IBA nồng độ 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg/l cho kết quả sau 4, 8 tuần tương ứng đạt 2,60; 2,40; 2,27; 1,97 và 2,70; 2,53; 2,37; 2,07 chồi.

So sánh kết quả bảng 2, 4 và bảng 5 chúng tôi nhận thấy, công thức tối ưu cho sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng của chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên là môi trường MS + BAP 1,0 mg/l + đường sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l, pH = 5,8.

Bảng 6. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ (sau 8 tuần)

Nồng độ NAA(mg/l)	Tỉ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0	32,22 ± 1,11	1,60 ± 0,32	1,02 ± 0,18	RK
0,1	55,56 ± 1,11	2,70 ± 0,31	2.67 ± 0,26	RTB
0,3	70,00 ± 1,92	3,50 ± 0,33	3.06 ± 0,22	RT
0,5	86,67 ± 1,93	5,00 ± 0,37	3.91 ± 0,29	RT
0,7	61.11 ± 0,11	3,67 ± 0,32	2.46 ± 0,27	RTB

Chú thích: RK: Rễ Kém; RTB: Rễ trung bình.



A. NAA 0 mg/l



B. NAA 0,5mg/l

Hình 4. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ (sau 8 tuần)

3.6. Kết quả ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi Diệp hạ châu

NAA là chất kích sinh trưởng thuộc nhóm auxin. NAA được đưa vào trong môi trường nuôi cấy thúc đẩy sự sinh trưởng và giãn nở của tế bào, tăng cường quá trình sinh tổng hợp và trao đổi chất, kích thích sự hình thành rễ [13]. Đây là một trong những giai đoạn quan trọng, quyết định thành công của cả quá trình nuôi cấy *in vitro*. Chồi Diệp hạ châu phải có rễ mới có khả năng tự hút chất dinh dưỡng để sinh trưởng và phát triển ở môi trường tự nhiên.

Chất lượng rễ ở thí nghiệm được đánh giá từ mức kém đến mức tốt. Khi bổ sung NAA 0,3 mg/l; 0,5 mg/l chất lượng rễ tốt. Khi bổ sung NAA 0,7 mg/l chất lượng rễ xuống trung bình và kém ở công thức đối chứng. Kết hợp tỉ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ và chất lượng rễ có thể đi đến kết luận: Công thức có bổ sung NAA 0,5 mg/l vào môi trường nền MS : đường 30 mg/l+ agar 8,5 mg/l, pH = 5,8 là thích hợp trong thí nghiệm. Đối với nghiên cứu của Bùi Thị Hà (2017) và nghiên cứu của Vũ Thị Như Trang (2018) sử dụng BAP 0,5 mg/l cho tỷ lệ ra rễ cao hơn sử dụng NAA.

4. Kết luận

1. Khử trùng hạt Diệp hạ châu bằng dung dịch javen (60%) trong thời gian 10 phút cho hiệu quả cao.
2. Môi trường thích hợp cho sự phát sinh chồi và sinh trưởng chồi là môi trường MS có bổ sung sucrose 30 g/l; agar 8,5g/l; BAP 1 mg; pH = 5,8.
3. Môi trường thích hợp cho tạo cây hoàn chỉnh là môi trường MS có bổ sung sucrose 30 g/l; agar 8,5 g/l; NAA 0,5 mg/l; pH = 5,8.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. D. X. Bui, *Living with someone has hepatitis*. Young Publishing House, 2004
- [2]. T. Vu, "Arousing great potential from medicinal plants in Vietnam", May, 2012. [Online]. Available: <http://www.cpv.org.vn/cpv/Modules/News/NewsDetail.aspx>. [Accessed Nov. 07, 2018].
- [3]. C. V. Vo, *Dictionary of medicinal plants in Viet Nam*. Publishing Company of Medicine, 1997.
- [4]. C. V. Vo, *Common medicinal plants*. Publishing Company of Thanh Hoa, 2000.
- [5]. P. D. Nguyen "diep-ha-chau and healing used" Nov, 2015. [Online]. Available: <http://www.Medicine plant/diephachau/>

- healing used.f43.html. [Accessed Nov. 08, 2018].
- [6]. T. B. Huynh, P. H. Ho, T. C. Tran, and C. N. K. Nguyen, "Researching medicinal value chains – Diep Ha Chau tree," *Journal Development of Science and Technology*, 16, p. 37, 2013.
- [7]. D. Nguyen, "scientific evidence of Diep Ha Chau in preventing and treating liver disease" Nov, 2017. [Online]. Available: http://www.vienquany.com/scientific_evidence_of_Diep_Ha_Chau_in_preventing_and_treating_liver_disease.html. [Accessed Nov. 10, 2018].
- [8]. B. Shen, J. Ju, S. Wang, C. S. H Eagle, V. W. S. Wong, X. Zhou, G. Lin, S. Joseph, and C. Henry, "Phyllanthus urinaria ameliorates the severity of nutritional steatohepatitis both in vitro and in vivo," *Hepatology*, 47, pp. 473-483, 2008.
- [9]. C. C. Chang, Y. C. Lien, Karin C. S. C. Liu, and S. S. Lee, "Ligans from Phyllanthus urinaria," *Phytochemistry*, 63, pp. 825-833, 2003.
- [10]. T. H. Bui, "The study on the overexpression of DAT gene involved in alkaloid synthesis in periwinkle plants (Catharanthus roseus (L.) G. Don", PhD. dissertation of Biology, College of Education, Thai Nguyen University, 2017.
- [11]. T. N. T. Vu, *The study on the expression of GmCHI gene involved in flavonoid synthesis aninduction of hairy root in Talinum paniculatum*, Doctoral dissertation of Biology, College of Education, Thai Nguyen University, 2018
- [12]. L. T. Tran, P. T. T. Truong, and H. T. T. Tran, *Plant biotechnology curriculum*. Publishing company Ha Noi of Agriculture, 2008.
- [13]. V. N. Do, and B. X. Ngo, *Biotechnology curriculum*. Publishing company Ha Noi of Agriculture, 2008.