

NGHIÊN CỨU CÔNG THỨC KHỬ TRÙNG MẪU VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY *IN VITRO* CÂY BÌNH VÔI VÀNG (*Stephania* spp.)

Tangmany SYSOMEPHONE¹, Ngô Diễm Quỳnh²,
PHANTHAHAK Santhana², Nongkhan MANISOK², Phạm Thị Thanh Nhân^{2*}

¹Viện nghiên cứu Khoa học giáo dục - Bộ Giáo dục và Thể thao, Lào,

²Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Cây Bình vôi (*Stephania* spp.) được sử dụng phổ biến trong y học. Củ Bình vôi chứa một lượng alkaloid như L - tetrahydropalmitin (rotundin), stepharin, roemerin, cycleanin. Những hợp chất này được sử dụng để điều chế thuốc an thần, điều hòa hoạt động tim và hô hấp, tăng khả năng miễn dịch, ức chế tế bào ung thư, trực khuẩn lao, quá trình sao chép của HIV. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu khử trùng mẫu và môi trường tạo chồi *in vitro* của cây Bình vôi vàng. Công thức khử trùng mẫu cây là đoạn thân non chứa chồi ngủ (dài 1,5 – 2 cm) được rửa sạch và ngâm trong dung dịch xà phòng loãng 30 phút, rửa sạch bằng nước cất khử trùng và lắc trong dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 5 phút, sau 3 -5 lần rửa bằng nước cất khử trùng, mẫu được cấy trên môi trường MS có tỷ lệ mẫu sạch sống sót là 93,33%. Môi trường MS cơ bản bổ sung sucrose 30 g/l+ agar 8 g/l+ nước dừa 100 ml/l + BAP 2,0 mg/l có số chồi/mẫu đạt 6,05; chiều cao chồi đạt 0,87 cm sau 7 tuần nuôi cấy. Môi trường MS cơ bản bổ sung sucrose 30 g/l+ agar 8 g/l+ nước dừa 100 ml/l + BAP 2,0 mg/l + NAA 0,6 mg/l phù hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của cây Bình vôi vàng hoàn chỉnh, số rễ/mẫu đạt 5,71, chiều dài rễ đạt 4,08 cm sau 7 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: BAP; NAA; *Stephania* spp; tạo chồi; tạo rễ.

Ngày nhận bài: 21/02/2020; Ngày hoàn thiện: 15/6/2020; Ngày đăng: 10/7/2020

STUDY ON STERILIZING PLANT MATERIALS AND THE *IN VITRO* CULTURE MEDIUM OF *Stephania* spp. WITH YELLOW TUBERS

Tangmany SYSOMEPHONE¹, Ngo Diem Quynh²,
PHANTHAHAK Santhana², MANISOK Nongkhan², Pham Thi Thanh Nhan^{2*}

¹Research Institute for Educational Sciences - Ministry of Education and Sports, Laos,

²TNU - University of Education

ABSTRACT

Stephania spp. are well-known for the popular medical plants. Their tubers contain a number of alkaloids such as L - tetrahydropalmitin (rotundin), stepharin, roemerin, cycleanin. These compounds are commonly used to produce drugs of tranquilizer, regulation cardiac and respiratory activities, increase immunity, inhibition the growth of cancer cells, tubercle bacilli and process of HIV replication. This paper presents the results of sterilizing plant materials and the *in vitro* medium for multi-shoot formation of *Stephania* spp. with yellow tubers. The suitably sterilizing protocol is to wash trunk segments (1.5 - 2 cm in length) by tap-water. After soaking samples in the weak soapy solution for 30 minutes, they were shaken in HgCl₂ 0.1% for 5 minutes and washed by sterilized water from 3 to 5 times. Samples were cultured in the MS medium with the survival rate of 93.33%. The optimum medium formula for rapid shoot organogenesis from segments of the trunk is the basal MS medium supplemented with sucrose 3%, agar 0.8%, coconut water 100 ml. L⁻¹ and BAP 2.0 mg. L⁻¹ with 6.05 shoots/sample, 0.87cm of the mean shoot height after 7 weeks of culture. The MS medium supplemented with sucrose 3%, agar 0.8%, coconut water 100 ml. L⁻¹ + BAP 2.0 mg. L⁻¹ + NAA 0.6 mg. L⁻¹ suitable for the growth and development of a complete *in vitro* plants, the number of roots/ samples reached 5.71, root length reached 4.08 cm after 7 weeks of culture.

Keywords: BAP; NAA; *Stephania* spp; shoot formation; root formation.

Received: 21/02/2020; Revised: 15/6/2020; Published: 10/7/2020

* Corresponding author. Email: ptnhanbio@tnue.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Cây Bình vôi có nhiều loài khác nhau, tên khoa học chung là *Stephania* spp., thuộc họ Tiết dê (*Menispermaceae*), được sử dụng phổ biến trong y học ở trong nước và trên thế giới. Củ Bình vôi chứa một lượng alkaloid stepharin, L - tetrahydropalmitin (rotundin), roemerin, cycleanin. Những hợp chất này được sử dụng để điều chế các loại thuốc, đặc biệt thuốc an thần [1]. Hàm lượng alkaloid cũng như rotundin thay đổi tùy loài và vùng thu hái [2]. Việc xác định các hợp chất hóa học đã được thực hiện ở các đối tượng *S. tetrandra* S. Moore, *S. cepharantha* Hayata, *S. glabra* (Roxb.) Miers, *S. japonica* (Thunb.), Miers and *S. venosa* (Blume) Spreng và hơn 70 alkaloid được báo cáo. Theo Bùi Thị Bằng (2006), hàm lượng rotundin đạt tới 3,55% ở loài *S.brachyandra* Diels (thu ở Hoàng Liên Sơn), 1,31% ở loài *S.sinica* Diels (thu ở Hà Nam), 1,3% ở loài *S.kwangsinesis* H.S.Lo (thu ở Quảng Ninh), 0,72% ở loài *S.hainanesis* H.S.Lo et Y.TSoong (thu ở Thanh Hóa), 0,62% ở loài *S.cambodia* Gagnep (thu ở Lâm Đồng) [3].

Tác dụng dược lý của rotundin đã được nghiên cứu ở Việt Nam, Liên Xô cũ và Trung Quốc như: rất ít độc, chữa tăng nhu động và ống tiêu hoá bị giập, điều hoà và bổ tim, điều hoà hô hấp, có thể dùng chữa hen hay chữa nấc, tác dụng an thần, gây ngủ và chống co quắp, hạ huyết áp [4], [5]. Trên súc vật bị chiếu xạ tia X, cepharanthin với liều 1 mg/kg được chiết tách từ *S. cepharanthu* và *S. pierrei* làm giảm nhẹ hiện tượng giảm bạch cầu máu ngoại vi và rút ngắn thời gian hồi phục về mức bình thường. Thí nghiệm *in vitro* cho thấy cepharanthin ức chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư Hela và Hela S3. Cepharanthin ức chế sự phát triển của trực khuẩn lao và ức chế mạnh quá trình sao chép của HIV-1 [6], [7]. Do vậy, nguồn nguyên liệu tự nhiên đã bị khai thác ngày một nhiều và ngày càng cạn kiệt, và đã được ghi trong Sách Đỏ Việt Nam (Bậc V) và Danh mục

Thực vật rừng, Động vật rừng nguy cấp, quý hiếm (nhóm 2) của Nghị định số 32/2006/NĐ - CP ngày 30/3/2006 của Chính phủ để hạn chế khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại [8].

Trong tự nhiên, đoạn thân, cành bánh tẻ và các mảnh củ (cắt từ phần gốc) được trồng vào mùa xuân. Nhưng tốc độ sinh trưởng, phát triển rất chậm, tỷ lệ sống sót đạt khoảng 33%. Cây Bình vôi trong tự nhiên chủ yếu sinh sản bằng hạt. Sau khoảng 4 tháng tuổi, củ dần dần được hình thành. Tỷ lệ nảy mầm của hạt Bình vôi cũng rất khác nhau ở các điều kiện, cao nhất đạt 85% khi hạt còn tươi [9]. Để vừa đáp ứng được nhu cầu sử dụng dược liệu, vừa bảo tồn và phát triển loài cây thuốc này ở Việt Nam, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật được ứng dụng trong nhân giống cây Bình vôi tím nhưng hệ số nhân chưa cao [10]. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu khử trùng mẫu và môi trường tạo đa chồi *in vitro* của cây Bình vôi vàng, góp phần vào việc xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây này tại Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu và hóa chất nghiên cứu

Mẫu cây Bình vôi vàng thu thập tại Lào Cai và được trồng tại Vườn thực nghiệm Sinh học Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên.

Các hóa chất như cồn, javen, axit benzoic, axit citric, thành phần môi trường MS, sucrose, agar, than hoạt tính, các hóa chất điều hòa sinh trưởng BAP, kinetin có nguồn gốc từ Việt Nam, Trung Quốc, Merk.

Phương pháp khử trùng mẫu

Đoạn thân cây Bình vôi vàng (1,5 - 2 cm) được rửa bằng nước máy, ngâm trong nước xà phòng loãng 30 phút. Sau đó, mẫu được ngâm trong HgCl₂ 5 phút, 7 phút, 9 phút. Mẫu được rửa lại bằng nước cất 3- 5 lần và cấy vào môi trường MS cơ bản. Các chỉ tiêu theo dõi sau 3, 5 và 7 tuần gồm: Tỷ lệ mẫu nhiễm và chết (%); tỷ lệ mẫu sạch (%); tỷ lệ mẫu bật chồi không bị nhiễm (%).

Phương pháp tái sinh chồi từ đoạn thân

Môi trường được sử dụng: MS + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l+ nước dừa 100 ml/l và bổ sung thêm chất kích thích sinh trưởng BAP, NAA với nồng độ khác nhau, pH 5,8.

Phương pháp: Đoạn cây Bình vôi vàng *in vitro* sau khử trùng 2 tuần được cấy vào môi trường đã chuẩn bị sẵn. Mỗi công thức cấy 30 mẫu vào 5 bình thí nghiệm, có lặp lại 3 lần. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ở 25-27°C, thời gian chiếu sáng 12/24h, cường độ chiếu sáng 2000 lux. Các chỉ tiêu theo dõi sau 3, 5 và 7 tuần: Tỷ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu, chiều dài chồi, hình thái chồi, tỷ lệ mẫu tạo rễ, số rễ/mẫu, chiều dài rễ, hình thái rễ.

Phương pháp xử lý kết quả: Các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm SPSS (với $\alpha=0,05$).

3. Kết quả và thảo luận**3.1. Nghiên cứu công thức khử trùng mẫu cây Bình vôi vàng**

Muốn có cây non vô trùng, sạch bệnh để tiến hành các thí nghiệm sau này, đoạn thân non mang chồi ngủ được vô trùng trước khi đưa vào bình nuôi cấy (Hình 1). Đề tài đã tiến hành khử trùng mẫu với thủy ngân ở các khoảng thời gian 3, 5, 7 và 9 phút. Bảng 1 cho thấy công thức khử trùng sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút là tối ưu nhất đối với đoạn thân non.

Công thức khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút thu được tỷ lệ mẫu sạch sống sót là 93,33%; mẫu nhiễm nấm, khuẩn là 6,67%. Tỷ lệ bật chồi từ những chồi ngủ ở đoạn thân là 97,59%. Khi xử lý mẫu cấy với HgCl₂ trong 7 phút, tỷ lệ bật chồi (32,14%), tỷ lệ mẫu sạch sống sót thấp (66,67%), tỷ lệ mẫu bị nhiễm nấm, nhiễm khuẩn là 33,33%. Khi xử lý mẫu bằng HgCl₂ trong 9 phút, tỷ lệ bật chồi và tỷ lệ mẫu sạch sống sót thấp nhất (9,09% và 30%). Nguyên nhân làm cho các mẫu cấy bị nhiễm nấm có thể do thao tác khử trùng hoặc do mẫu cấy chưa đảm bảo. Thời gian khử trùng kéo dài làm cho mẫu cấy bị thâm đen và chết, khả năng sống sót, tái sinh thấp và ảnh hưởng dẫn tới thời gian bật chồi kéo dài hơn.

Theo kết quả nghiên cứu của Ngô Thị Tình và cộng sự (2015), sử dụng đoạn thân non, bánh tẻ được cắt thành các khúc 2 - 3 cm, tiến hành ngâm trong dung dịch cồn 70% rồi khử trùng trong dung dịch HgCl₂ 0,1% trong thời gian 7 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao không nhiễm đạt 68,89%. Mẫu sau khi khử trùng cho tỷ lệ tái sinh cao nhất trong môi trường MS cải tiến đạt tỷ lệ tái sinh 88,89% sau 4 tuần nuôi cấy [10]. Nguyên nhân dẫn đến sai khác này có thể do hóa chất và cách xử lý mẫu. Còn thường là tác nhân gây tổn thương, phá hủy diệp lục trong các mô lá, thân non. Do vậy, các mẫu được xử lý bằng cồn thường bị thâm, đen và chết sau một tuần nuôi cấy.

Bảng 1. Kết quả khử trùng cây Bình vôi vàng từ đoạn thân non sau 4 tuần nuôi cấy

Thời gian xử lý	Tỷ lệ mẫu bị nhiễm nấm, khuẩn, chết (%)	Tỷ lệ mẫu sạch sống sót (%)	Tỷ lệ bật chồi (%)
3 phút	36,67 ^c	63,33 ^b	52,28 ^c
5 phút	6,67^a	93,33^c	97,59 ^d
7 phút	33,33 ^b	66,67 ^b	32,14 ^b
9 phút	70,00 ^d	30,00 ^a	9,09 ^a



(A)



(B)

Hình 1. Mẫu cây Bình vôi vàng sau khử trùng trên môi trường MS (A: Sau khi cấy; B: Sau 28 ngày nuôi cấy)

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi cây Bình vôi vàng

BAP (6-benzyl Amino Purin) là hormone thuộc nhóm cytokinin, có vai trò quan trọng trong tạo đa chồi của mẫu nuôi cấy, quyết định hệ số nhân nhanh giống. Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo đa chồi cây Bình vôi vàng được thực hiện trên 3 công thức môi trường có nồng độ BAP khác nhau (1,5; 2,0; 2,5 mg/l). Môi trường đối chứng là MS cơ bản bổ sung nước dừa 100 ml/l (kí hiệu ĐC). Các số liệu được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Kết quả bảng 2 cho thấy, ở mỗi công thức nghiên cứu ĐC và có bổ sung BAP ở các nồng độ đều cho tỷ lệ mẫu tạo chồi là 100%. Tỷ lệ số chồi/mẫu ở các môi trường có bổ sung BAP đều cao hơn môi trường ĐC. Trong đó, công thức môi trường BAP 2,0 mg/l cho

tỷ lệ số chồi/mẫu cao nhất và liên tục trong 3 lần lấy số liệu: sau 3 tuần là 1,71; sau 5 tuần là 3,28; sau 7 tuần là 6,05. Các chỉ tiêu còn lại như: Chiều cao chồi, hình thái chồi cho thấy mẫu cây sinh trưởng bình thường.

Như vậy, trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, nồng độ BAP 2,0 mg/l có hiệu quả cao nhất trong việc tạo đa chồi đối với cây Bình vôi vàng. Chồi sinh trưởng ở môi trường chứa BAP có lá mọc chậm và đường kính lá nhỏ hơn, khoảng cách giữa các đốt thân lớn hơn cây sinh trưởng ở môi trường ĐC, do tập trung dinh dưỡng để tạo đa chồi.

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Tình và cộng sự ở cây Bình vôi tím cho thấy nồng độ BAP 0,5 mg/l là tối ưu cho hệ số nhân chồi 3,9 [10]. Có thể sự khác nhau về nguồn gốc hóa chất, thao tác nuôi cấy dẫn đến sự khác biệt này.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến sự sinh trưởng cây Bình vôi vàng

Công thức	Nồng độ BAP (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều dài chồi (cm)	Hình thái chồi
Sau 3 tuần nuôi cấy					
ĐC	0	100	1,03 ^a ± 0,06	1,97 ^c ± 0,12	Xanh, nhỏ
NC1	1,5	100	1,53 ^c ± 0,06	1,56 ^b ± 0,11	Xanh đậm, khỏe
NC2	2,0	100	1,71^d ± 0,05	1,39^{a,b} ± 0,05	Xanh đậm, khỏe
NC3	2,5	100	1,37 ^b ± 0,02	1,33 ^a ± 0,07	Xanh nhạt, nhỏ
Sau 5 tuần nuôi cấy					
ĐC	0	100	1,11 ^a ± 0,13	3,07 ^c ± 0,17	Xanh, nhỏ
NC1	1,5	100	1,79 ^b ± 0,11	2,01 ^b ± 0,09	Xanh đậm, khỏe
NC2	2,0	100	3,28^c ± 0,27	1,96^b ± 0,17	Xanh đậm, khỏe
NC3	2,5	100	1,54 ^b ± 0,09	1,65 ^a ± 0,13	Xanh nhạt, nhỏ
Sau 7 tuần nuôi cấy					
ĐC	0	100	1,13 ^a ± 0,05	5,01 ^c ± 0,15	Xanh, nhỏ
NC1	1,5	100	2,68 ^b ± 0,11	2,44 ^b ± 0,17	Xanh đậm, khỏe
NC2	2,0	100	6,05^c ± 0,17	1,87^a ± 0,21	Xanh đậm, lá nhỏ, khỏe
NC3	2,5	100	2,74 ^b ± 0,09	1,97 ^a ± 0,15	Xanh nhạt, nhỏ, lá nhạt màu



ĐC

2,0 mg/l

2,5 mg/l

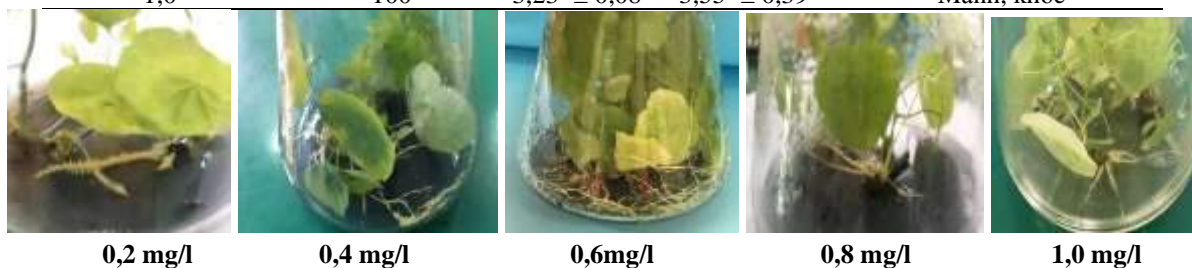
Hình 2. Ảnh hưởng của BAP đến sự tạo chồi cây Bình vôi vàng sau 7 tuần nuôi cấy

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP với nồng độ tối ưu và NAA đến sự sinh trưởng của cây Bình vôi vàng

NAA là hormone kích thích ra rễ trong nuôi cấy mô tế bào. NAA có thể được kết hợp với các chất cytokinin, gibberellin tạo môi trường có thành phần dinh dưỡng đầy đủ cung cấp cho cây. Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của cytokinin đến khả năng tạo đa chồi cây Bình vôi vàng cho thấy BAP thích hợp cho sự phát sinh chồi hơn kinentin. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của tổ hợp BAP nồng độ tối ưu và NAA đến khả năng tạo đa chồi cây Bình vôi vàng được quan tâm nghiên cứu. Môi trường nuôi cấy là môi trường MS cơ bản + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l + nước dừa 100 ml/l + BAP 2,0 mg/l + NAA (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l). Các số liệu trình bày trong bảng 3 và hình 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA đến sự sinh trưởng của cây Bình vôi vàng

Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Hình thái rễ
Sau 3 tuần nuôi cấy				
0,2	100	2,65 ^b ± 0,14	2,01 ^a ± 0,19	Mảnh, khỏe
0,4	100	3,15 ^{bc} ± 0,47	2,21 ^a ± 0,41	Mảnh, khỏe
0,6	100	3,61^c ± 0,18	1,73^a ± 0,57	Mảnh, nhiều nhánh, khỏe
0,8	100	3,44 ^c ± 0,39	2,23 ^a ± 0,62	Mảnh, khỏe
1,0	100	2,11 ^a ± 0,12	2,15 ^a ± 0,29	Mảnh, khỏe
Sau 5 tuần nuôi cấy				
0,2	100	3,55 ^b ± 0,19	2,31 ^a ± 0,76	Mảnh, khỏe
0,4	100	3,65 ^b ± 0,35	2,65 ^a ± 0,87	Mảnh, khỏe
0,6	100	5,12^c ± 0,26	2,08^a ± 0,71	Mảnh, nhiều nhánh, khỏe
0,8	100	3,83 ^b ± 0,19	2,69 ^a ± 0,61	Mảnh, khỏe
1,0	100	3,03 ^a ± 0,38	2,27 ^a ± 0,29	Mảnh, khỏe
Sau 7 tuần nuôi cấy				
0,2	100	3,65 ^a ± 0,33	3,45 ^a ± 0,34	Mảnh, khỏe
0,4	100	3,52 ^a ± 0,21	4,15 ^a ± 0,56	Mảnh, khỏe
0,6	100	5,74^b ± 0,68	4,08^a ± 0,88	Mảnh, nhiều nhánh, khỏe
0,8	100	3,92 ^a ± 0,14	3,88 ^a ± 0,71	Mảnh, khỏe
1,0	100	3,23 ^a ± 0,08	3,55 ^a ± 0,39	Mảnh, khỏe



Hình 3. Ảnh hưởng của NAA đến sự sinh trưởng của cây Bình vôi vàng sau 7 tuần nuôi cấy

Kết quả bảng 3 cho thấy, ở mỗi công thức bổ sung NAA ở các nồng độ đều cho tỷ lệ mẫu tạo rễ là 100%, số chồi/mẫu dao động từ 1 - 2 chồi. Tỷ lệ số rễ/mẫu ở các môi trường đều có sự khác nhau rõ rệt. Trong đó, công thức môi trường NAA 0,6 mg/l cho tỷ lệ số rễ/mẫu cao nhất: sau 3 tuần là 3,61; sau 5 tuần là 5,12; sau 7 tuần là 5,74. Rễ có hình thái phát triển bình thường, mảnh, các rễ nhiều tơ, nhiều nhánh rễ. Các tiêu chí hình thái chồi như: lá màu xanh đậm, đường kính lá lớn và cây sinh trưởng tốt hơn so với các môi trường có nồng

độ NAA thấp và cao hơn. Số lượng rễ và chiều dài rễ có sự khác biệt nhất định giữa các công thức. Hàm lượng NAA phù hợp sẽ kích thích sự phân chia tế bào của mô phân sinh thượng tầng để hình thành rễ mới. Nhưng nồng độ NAA thấp thì thời gian phát sinh rễ kéo dài, số lượng rễ phát sinh ít hơn và chiều dài hạn chế. Với nồng độ quá cao có thể ức chế phát sinh rễ, ảnh hưởng đến hình thái chồi như: đốt thân dài, còi cọc, lá nhỏ, màu xanh nhạt. Trong khi kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Tình và cộng sự cho thấy nồng độ IAA 1,5

mg là tối ưu cho số rễ/ mẫu đạt 2,6 sau 5 tuần nuôi cấy [10].

Như vậy, cây Bình vôi vàng *in vitro* sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường MS cơ bản có bổ sung NAA 0,6 mg/l + agar 8 g/l + sucrose 30 g/l + nước dừa 100 ml/l + BAP 2,0 mg/l, pH =5,8.

4. Kết luận

Công thức khử trùng mẫu cây Bình vôi vàng là đoạn thân non chứa chồi ngủ (dài 1,5 – 2 cm) được rửa sạch và ngâm trong dung dịch xà phòng loãng 30 phút, rửa sạch bằng nước cất khử trùng và lắc trong dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 5 phút, sau 3 -5 lần rửa bằng nước cất khử trùng, mẫu được cấy trên môi trường MS có tỷ lệ mẫu sạch sót là 93,33%.

Môi trường MS cơ bản bổ sung nước dừa 100 ml/l + BAP 2,0 mg/l có số chồi/mẫu đạt 6,05; chiều cao chồi đạt 0,87 cm sau 7 tuần nuôi cấy. Môi trường MS cơ bản bổ sung nước dừa 100 ml/l + BAP 2,0 mg/l + NAA 0,6 mg/l phù hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của cây Bình vôi vàng hoàn chỉnh, số rễ/mẫu đạt 5,71, chiều dài rễ đạt 4,08 cm sau 7 tuần nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của Đề tài cấp Bộ mã số B2019-TNA-09.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. H. L. Duong, "Study on active compounds from tubers of *Stephania*," *Vietnam Medical Journal*, no. 1, pp. 14-23, 1996.
- [2]. T. V. Nguyen, "Study on botany, chemistry and biological effects of some species of *Stephania* Lour. in Vietnam," Doctoral thesis of Pharmacology, HaNoi University of Pharmacy, 2000.
- [3]. T. B. Bui, *Physical-chemical methods applied in analysis and testing of pharmaceutical materials*. Science and Technology Publishing House, Hanoi, 2006.
- [4]. M. C. Nguyen, *Study on extraction of rotundin from tubers of some *Stephania* species (belonging to *Stephania* Lour.), preparation of rotundin sulfate for making injectable drug*. Can Tho University Publishing House, 2001.
- [5]. T. V. Nguyen, T. K. Pham, K. L. Bui, D. K. Chu, and V. B. Trinh, "The effects of L-tetrahydropalmitin extracted from *Stephania glabra* (Roxb.) Miers tubers on the ECG and EEG of rabbits," *Journal of Pharmacology*, vol. 269, pp. 21-23, 1998.
- [6]. D. K. Semwal, R. Badoni, R. Semwal, S. K. Kothiyal, G. J. P. Singh, and U. Rawat, "The genus *Stephania* (Menispermaceae): Chemical and pharmacological perspectives," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 132, pp. 369-383, 2010.
- [7]. R. H. F. Manske, *The alkaloid- chemistry and Physiology*. Academic Press- New York-London, 1973, vol. XIV.
- [8]. Ministry of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, *Vietnam's Red Data Book*. Hanoi Natural Science and Technology Publishing House, 1996, pp. 258-264.
- [9]. National Institute of Medicinal Materials, *Technology of growing medicinal plants*. Medicine Publishing House, 2003, pp. 3-7.
- [10]. T. T. Nguyen, T. T. Pham, M. C. Duong, H. T. Nguyen, V. B. Nguyen, and X. B. Ngo, "Multiplication of purple *Stepharia* (*Stepharia rotunda* Lour) by trunk segment culture technique," *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*, vol. 11, pp. 242-248, 2015.