

NGHIÊN CỨU CÔNG THỨC KHỬ TRÙNG MẪU VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY *IN VITRO* CÂY BÌNH VÔI HOA ĐÀU (*Stephania cepharantha* Hayata)

Phạm Thị Thanh Nhân*, Trần Thị Hồng, Hoàng Phú Hiệp,
Cao Thị Phương Thảo, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu

Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học 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 - tetrahydropalmatin (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 đa chồi *in vitro* của cây Bình vôi hoa đầu. 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 tỉ lệ mẫu sạch sống sót là 92,24%, tỉ lệ mẫu nhiễm nấm, khuẩn và chết là 7,76%. Môi trường MS cơ bản bổ sung sucrose 30 g/L + agar 8 g/L + nước dừa 100 mL/L + than hoạt tính 1 g/L + BAP 1,0 mg/L có số chồi/mẫu đạt 1,74; chiều cao chồi đạt 1,07 cm sau 7 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: BAP, *in vitro*, kinetin, *Stephania cepharantha* Hayata, tạo chồi.

MỞ ĐẦU

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 - tetrahydropalmatin (rotundin), roemerin, cycleanin (Manske R.H.F., 1973). Những hợp chất này được sử dụng để điều chế các loại thuốc, đặc biệt thuốc an thần (Dương Hữu Lợi, 1996). Hàm lượng alkaloid cũng như rotundin thay đổi tùy loài và vùng thu hái (Nguyễn Tiến Dũng, 2000). 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. kwangsinensis* H.S.Lo (thu ở Quảng Ninh), 0,72% ở loài *S. hainanensis* H.S.Lo et Y.TSoong (thu ở Thanh Hóa), 0,62% ở loài *S. cambodia* Gagnep (thu ở Lâm Đồng).

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 hóa bị giập, điều hòa và bổ tim, điều hòa hô hấp, có thể dùng chữa hen hay chữa nấc, tác dụng an thần, gây ngủ và chống co quắp, hạ huyết áp (Nguyễn Minh Chính, 2001; Nguyễn Tiến Dũng *et al.*, 1998). Trên súc vật bị chiếu xạ tia X, cepharanthin với liều 1 mg/kg được chiết tách từ *S. cepharantha* 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 (Deepak Kurmar Semwal *et al.*, 2010). 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 (Sách đỏ Việt Nam, 1996).

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, tỉ 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. Tỉ lệ nảy mầm của hạt Bình vôi cũng rất khác nhau ở các điều kiện, cao nhất đạt 85% khi hạt còn tươi (Viện Dược liệu, 2003). 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 hoa đầu (*Stephania cepharantha* Hayata), góp phần vào việc xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây này tại Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu và hóa chất nghiên cứu

Mẫu cây Bình vôi hoa đầu thu thập tại Quảng Ninh và được trồng tại Vườn thực nghiệm Sinh học Trường Đại học Sư phạm, Đại học 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 hoa đầu (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, kinetin với nồng độ khác nhau, pH 5,8.

Phương pháp: Đoạn cây Bình vôi hoa đầu *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 $\alpha = 0,05$).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu công thức khử trùng mẫu cây Bình vôi hoa đầu

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. Tỷ lệ bật chồi từ những chồi ngủ ở đoạn thân là 97,53%. Tuy nhiên, một số mẫu bật chồi bị nhiễm nấm hoặc khuẩn (7,76 %) ở thời gian khử trùng 5 phút.

Bảng 1. Kết quả khử trùng cây Bình vôi hoa đầu 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	60,5 ^b	39,5 ^c	52,43 ^c
5 phút	7,76 ^a	92,24 ^d	97,53 ^d
7 phút	68,62 ^c	31,37 ^b	32,33 ^b
9 phút	86,93 ^d	13,07 ^a	9,26 ^a



(A)

(B)

Hình 1. Mẫu cây Bình vôi hoa đầu tái sinh trong môi trường MS bổ sung nước dừa

(A: Sau 7 ngày nuôi cấy; B: Sau 28 ngày nuôi cấy)

Công thức khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút thu được tỉ lệ mẫu sạch sống sót là 92,24%; tỉ lệ mẫu nhiễm nấm, khuẩn và chết là 7,76%. Nguyên nhân làm cho các mẫu cấy bị nhiễm nấm có thể do thao tác khử trùng hoặc do mẫu cấy chưa đảm bảo. Khi xử lý mẫu cấy với HgCl₂ trong 7 phút, tỉ lệ bật chồi (32,33%), tỉ lệ mẫu sạch sống sót thấp (31,37%), tỉ lệ mẫu bị nhiễm nấm, nhiễm khuẩn là 68,62%. Khi xử lý mẫu bằng HgCl₂ trong 9 phút, tỉ lệ bật chồi và tỉ lệ mẫu sạch sống sót thấp nhất (9,26% và 13,07%). 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 Nguyễn Thị Tình và đồng tác giả (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 tỉ lệ mẫu sống cao không nhiễm đạt 68,89%. Mẫu sau khi khử trùng cho tỉ lệ tái sinh cao nhất trong môi trường MS cải tiến đạt tỉ lệ tái sinh 88,89% sau 4 tuần nuôi cấy (Nguyễn Thị Tình *et al.*, 2015). Như vậy, khả năng tái sinh không nhiễm khi sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút cao hơn thí nghiệm của Ngô Thị Tình và cộng sự là 23,33 % và tỉ lệ tái sinh cao hơn 8,7%, nhưng thời gian lại ngắn hơn và không sử dụng cồn 70%. Nguyên nhân dẫn đến sai khác này có thể do hóa chất và cách xử lý mẫu. Cồn 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.

Nghiên cứu ảnh hưởng của chất phụ gia đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây Bình vôi hoa đầu

Các mẫu Bình vôi sạch được cấy vào môi trường đối chứng (MS cơ bản có bổ sung BAP với nồng độ 0,5 g/L không có than hoạt tính, ĐC) và môi trường thực nghiệm (MS cơ bản có bổ sung BAP 0,5 mg/L và than hoạt tính 1 g/L, TN). Các chỉ tiêu theo dõi của môi trường đối chứng được ghi định kỳ vào tuần 3, tuần 5, tuần 7 (Bảng 2).

Kết quả Bảng 2 cho thấy, các chỉ tiêu ghi được ở công thức môi trường TN đều cao hơn ở công thức môi trường ĐC. Tỉ lệ chồi/mô ở môi trường có than (TN) lần lượt là: 1,16 ở tuần 3, 1,33 ở tuần 5, 1,44 ở tuần 7. Chiều dài chồi và chiều dài lá cao hơn và tăng đều qua các tuần ghi số liệu. Các mẫu cây Bình vôi hoa đầu trong môi trường TN có màu sắc thân, lá xanh tốt. Than hoạt tính không chỉ có tác dụng giữ lại các chất gây độc cho mô, hạn chế hiện tượng hóa nâu mẫu mà có ảnh hưởng tốt tới khả năng sinh trưởng và phát triển như đẩy mạnh sự phát sinh chồi, phát sinh rễ, tăng chiều cao cây, chiều dài rễ, trọng lượng tươi, trọng lượng khô.

Bảng 2. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây Bình vôi hoa đầu

Lượng than hoạt tính (g/L)	Tỉ lệ mô tạo chồi (%)	Số chồi/ mô	Chiều dài chồi (cm)	Chiều dài lá (cm)
Sau 3 tuần				
0 (ĐC)	100	1,03 ^a ± 0,03	0,36 ^a ± 0,04	0,64 ^a ± 0,07
1 (TN)	100	1,16 ^{ab} ± 0,07	0,43 ^{ab} ± 0,04	1,17 ^c ± 0,06
Sau 5 tuần				
0 (ĐC)	100	1,12 ^a ± 0,07	0,51 ^{bc} ± 0,05	0,92 ^b ± 0,07
1 (TN)	100	1,33 ^{bc} ± 0,14	0,55 ^c ± 0,04	1,41 ^c ± 0,06
Sau 7 tuần				
0 (ĐC)	100	1,18 ^{ab} ± 0,09	0,73 ^d ± 0,06	1,18 ^c ± 0,07
1 (TN)	100	1,44 ^c ± 0,15	0,84 ^e ± 0,04	2,0 ^d ± 0,29

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi cây Bình vôi hoa đầu

BAP (6-benzyl Amino Purin) là hoocmon 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 hoa đầu được thực hiện trên 3 công thức môi trường có nồng độ BAP khác nhau (0,5; 1,0; 1,5 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 3 và Hình 2.

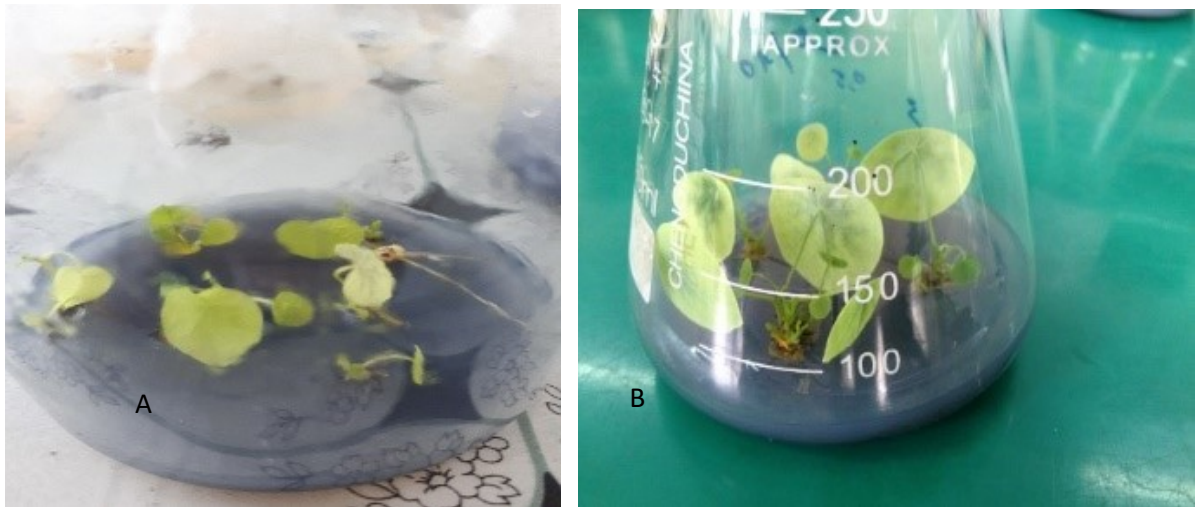
Kết quả Bảng 3 cho thấy, ở mỗi công thức nghiên cứu đều cho tỉ lệ mô tạo chồi là 100%. Tỉ lệ số chồi/mô ở các môi trường có bổ sung BAP đều cao hơn môi trường đối chứng (ĐC) cho thấy khả năng tạo chồi cao hơn khi có chất kích thích BAP. Trong đó, công thức môi trường có nồng độ BAP 1,0 mg/L cho tỉ lệ số chồi/mô cao nhất và liên tục trong 3 lần lấy số liệu: sau 3 tuần là 1,67; sau 5 tuần là 1,7; sau 7 tuần là 1,74. Các chỉ tiêu còn lại như: Chiều cao chồi, chiều dài cuống lá cho thấy mẫu cây sinh trưởng bình thường.

Qua quan sát thấy rằng, màu sắc lá của một số mẫu ở công thức BAP 1,5 mg/L chuyển sang màu vàng từ tuần 5, sinh trưởng của cây bị ức chế. Như vậy, trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, nồng độ BAP 1,0 mg/L là có hiệu quả cao nhất trong việc tạo đa chồi bằng BAP đối với cây Bình vôi hoa đầu.

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Tinh và đồng tác giả (2015), ở cây Bình vôi tím cho thấy nồng độ BAP 0,5 mg/L là tối ưu cho hệ số nhân chồi 3,9. Có thể sự khác nhau về sự phản ứng của kiểu gen (loài) nguồn gốc hóa chất, thao tác nuôi cấy dẫn đến sự khác biệt này.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi cây Bình vôi hoa đầu

Nồng độ BAP (mg/L)	Tỉ lệ mô tạo chồi (%)	Số chồi/mô	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài lá (cm)
Sau 3 tuần				
0	100	1,03 ^a ± 0,03	0,77 ^b ± 0,12	1,50 ^c ± 0,11
0,5	100	1,16 ^a ± 0,07	0,43 ^a ± 0,04	1,17 ^b ± 0,06
1,0	100	1,67^b ± 0,14	0,72^b ± 0,05	0,92^a ± 0,05
1,5	100	1,07 ^a ± 0,05	0,43 ^a ± 0,04	1,00 ^a ± 0,11
Sau 5 tuần				
0	100	1,18 ^a ± 0,08	0,89 ^b ± 0,11	1,75 ^c ± 0,13
0,5	100	1,33 ^a ± 0,14	0,55 ^a ± 0,04	1,41 ^b ± 0,06
1,0	100	1,70^b ± 0,14	0,95^b ± 0,05	1,19^a ± 0,05
1,5	100	1,21 ^a ± 0,12	0,60 ^a ± 0,06	1,16 ^a ± 0,1
Sau 7 tuần				
0	100	1,21 ^a ± 0,08	1,16 ^b ± 0,12	2,30 ^b ± 0,18
0,5	100	1,44 ^b ± 0,15	0,84 ^a ± 0,04	2,00 ^b ± 0,29
1,0	100	1,74^c ± 0,15	1,07^b ± 0,05	1,56^a ± 0,06
1,5	100	1,43 ^b ± 0,13	0,72 ^a ± 0,06	1,30 ^a ± 0,11



Hình 2. Chồi cây Bình vôi hoa đầu trên môi trường ĐC (A) và môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/L (B) sau 7 tuần nuôi cấy

Nghiên cứu ảnh hưởng của kinetin đến khả năng tạo chồi cây Bình vôi hoa đầu

Tương tự như với BAP, các mẫu đoạn thân cây Bình vôi được chúng tôi cấy vào các công thức môi trường có bổ sung kinetin với các nồng độ khác nhau và môi trường đối chứng như trong Bảng 3, mỗi công thức được nghiên cứu trên 30 mẫu Bình vôi hoa đầu. Các chỉ tiêu theo dõi được đo và ghi định kỳ vào tuần 2, tuần 4 và tuần 6. Kết quả theo dõi được khái quát trong Bảng 4.

Kết quả Bảng 4 cho thấy với các nồng độ kinetin được nghiên cứu đều cho tỉ lệ mô tạo chồi là 100%, tỉ lệ số chồi/mô đều cao hơn ở môi trường đối chứng. Trong đó, công thức môi trường với nồng độ kinetin là 0,5 mg/l cho tỉ lệ số chồi/mô cao nhất liên tục trong các lần theo dõi: 1,34 ở tuần 3; 1,41 ở tuần 5; 1,41 ở tuần 7. Chiều dài cuống lá, màu sắc lá và màu sắc thân ở công thức môi trường này cho thấy các mẫu mô sinh trưởng tốt. Một số

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

mẫu mô ở công thức môi trường bổ sung kinetin 1,0 mg/L, 1,5 mg/L có hiện tượng lá chuyển màu vàng, màu sắc chồi chuyển màu vàng ở tuần 7.

Bảng 4. Ảnh hưởng của kinetin đến khả năng tạo chồi cây Bình vôi hoa đầu

Nồng độ Kinetin (mg/L)	Tỉ lệ mô tạo chồi (%)	Số chồi/ mô	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài lá (cm)
Sau 3 tuần				
0	100	1,03 ^a ± 0,03	0,77 ^b ± 0,12	1,50 ^b ± 0,11
0,5	100	1,34^b ± 0,10	0,56^a ± 0,06	0,94^a ± 0,09
1,0	100	1,25 ^b ± 0,08	0,52 ^a ± 0,05	0,82 ^a ± 0,09
1,5	100	1,23 ^b ± 0,08	0,44 ^a ± 0,03	0,98 ^a ± 0,09
Sau 5 tuần				
0	100	1,18 ^a ± 0,08	0,89 ^b ± 0,11	1,75 ^b ± 0,13
0,5	100	1,41^b ± 0,11	0,60^a ± 0,05	1,30^a ± 0,13
1,0	100	1,28 ^{ab} ± 0,08	0,63 ^a ± 0,06	1,12 ^a ± 0,19
1,5	100	1,25 ^{ab} ± 0,09	0,51 ^a ± 0,04	1,10 ^a ± 0,12
Sau 7 tuần				
0	100	1,21 ^a ± 0,08	1,16 ^c ± 0,12	2,30 ^b ± 0,18
0,5	100	1,41^c ± 0,11	0,71^b ± 0,06	1,79^a ± 0,18
1,0	100	1,34 ^{ab} ± 0,10	0,74 ^b ± 0,05	1,57 ^a ± 0,23
1,5	100	1,33 ^{ab} ± 0,10	0,57 ^a ± 0,04	1,49 ^a ± 0,13



Hình 3. Chồi cây Bình vôi hoa đầu ở môi trường kinetin 0,5 mg/l sau 7 tuần

Từ kết quả Bảng 4 và Hình 3 cho thấy, trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, nồng độ kinetin 0,5 mg/l là có hiệu quả nhất trong việc tạo đa chồi cây Bình vôi hoa đầu.

KẾT LUẬN

Công thức khử trùng mẫu cây Bình vôi hoa đầu 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 tỉ lệ mẫu sạch sống sót là 92,24%, tỉ lệ mẫu nhiễm nấm, khuẩn và chết là 7,76%. Môi trường bổ sung than hoạt tính 1 g/L thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây Bình vôi *in vitro*.

Công thức môi trường có hiệu quả để tạo đa chồi cây Bình vôi hoa đầu là MS + agar 8 g/L + sucrose 30 g/L + than hoạt tính 1 g/L + nước dừa 100 mL/L + BAP 1 mg/L với 1,74 chồi/mẫu 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

Bùi Thị Bằng (2006). *Các phương pháp hóa lý ứng dụng trong phân tích và kiểm nghiệm dược liệu*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Bộ Khoa học công nghệ, Viện Khoa học công nghệ Việt Nam (1996), *Sách đỏ Việt Nam*, NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ Hà Nội: 258-264.

Nguyễn Minh Chính (2001). *Nghiên cứu chiết tách rotundin từ củ một số loài Bình vôi (thuộc chi Stephania Lour.), điều chế rotundin sulfate để bào chế thuốc tiêm*, NXB Đại học Cần Thơ: 3-4.

Semwal DK, Badoni R, Semwal R, Kothiyal SK, Singh GJP, Rawat U (2010). The genus *Stephania* (Menispermaceae): Chemical and pharmacological perspectives, *J Ethnopharmacol* 132: 369-383.

Dương Hữu Lợi (1996). Nghiên cứu hoạt chất từ củ Bình vôi, *Tạp chí y học Việt Nam* 1: 14-23.

Manske RHF (1973). *The alkaloid- chemistry and Physiology*, volume XIV, Academic Press- New York- London.

Viện Dược liệu (2003), *Kỹ thuật trồng cây thuốc*, NXB Y học: 3-7.

Nguyễn Thị Tình, Phạm Thị Thủy, Dương Mạnh Cường, Nguyễn Hữu Thọ, Nguyễn Văn Bảo, Ngô Xuân Bình (2015). Nhân giống cây Bình vôi tím (*Stephania rotunda* Lour) bằng kỹ thuật nuôi cấy đoạn thân, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 11: 242-248.

Nguyễn Tiến Vững (2000), *Nghiên cứu về thực vật, hóa học và tác dụng sinh học của một số loại thuộc chi Stephania Lour. ở Việt Nam*, Luận án tiến sĩ Dược học.

Nguyễn Tiến Vững, Phạm Thanh Kỳ, Bùi Kim Liên, Chu Đình Kính, Trịnh Văn Bảo (1998). Tác dụng của L-tetrahydropalmitin chiết suất từ củ loài bình vôi *Stephania glabra* (Roxb.) Miers lên điện tim và điện não thỏ, *Tạp chí Dược học* 269: 21-23.

STUDY ON STERILIZING PLANT MATERIALS AND THE *IN VITRO* CULTURE MEDIUM OF *Stephania cepharantha* Hayata

Pham Thi Thanh Nhan*, Tran Thi Hong, Hoang Phu Hiep, Cao Thi Phuong Thao, Tu Quang Tan, Chu Hoang Mau

School of Biology, Thai Nguyen University of Education

SUMMARY

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 study 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 92.24%, the rate of samples infected with fungi, bacteria and died was 7,76%. 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 100 mL/L water, active carbon 1 g/L and BAP 1.0 mg/L with 1.74 shoots/sample, 1.07 cm of the mean shoot height after 7 weeks of culture.

Keywords: BAP, *in vitro*, kinetin, *Stephania cepharantha* Hayata, shoot formation.

*Corresponding author: Tel: +84-989 516346; Email: ptnhanbio@tneue.edu.vn