

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thu Hằng

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH VI NHÂN GIỐNG
CÂY XẠ ĐEN (*Ehretia asperula*) *in vitro*

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thu Hằng

**NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH VI NHÂN GIỐNG
CÂY XẠ ĐEN (*Ehretia asperula*) *in vitro***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Trần Trọng Tuấn

2. TS. Đỗ Đăng Giáp

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Thu Hằng

LỜI CẢM ƠN

Luận văn thạc sĩ này là kết quả của một quá trình học tập và nghiên cứu nghiêm túc, không thể không kể đến sự quan tâm, hướng dẫn tận tình của quý thầy cô, sự hỗ trợ nhiệt tình của các phòng ban và sự đồng hành của gia đình, bạn bè. Luận văn thạc sĩ này được hoàn thành là nhờ vào sự hướng dẫn, ủng hộ và chia sẻ từ Học viện và quý Thầy Cô. Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Thầy TS. Trần Trọng Tuấn và Thầy TS. Đỗ Đăng Giáp đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và quý thầy cô đã tận tình truyền đạt những kiến thức quý báu cũng như tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập nghiên cứu và cho đến khi thực hiện luận văn.

Tôi vô cùng biết ơn sự quan tâm, hỗ trợ và tạo điều kiện của Ban Lãnh đạo Viện Sinh học Nhiệt đới, phòng Công nghệ Tế bào Thực vật để tôi thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Em xin cảm ơn thầy Đỗ Đăng Giáp, thầy Trần Trọng Tuấn, chị Đặng Thị Kim Thúy, chị Nguyễn Thị Huyền Trang, chị Lê Quỳnh Loan, các anh chị và các bạn đồng nghiệp đã hết lòng quan tâm, giúp đỡ và hỗ trợ cho em trong suốt thời gian thực hiện đề tài và cũng như trong công việc.

Sau cùng, con cảm ơn sự yêu thương, ủng hộ về tinh thần và tài chính của ba mẹ và gia đình, sự giúp đỡ động viên của bạn bè trong suốt thời gian học tập và thực hiện khóa luận này.

Xin chân thành cảm ơn!



Nguyễn Thị Thu Hằng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC BẢNG	vi
DANH MỤC HÌNH	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. GIỚI THIỆU VỀ CÂY XẠ ĐEN	4
1.1.1. Đặc điểm hình thái.....	5
1.1.2. Thành phần hóa học.....	5
1.1.3. Tác dụng dược lý.....	6
1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU CÂY XẠ ĐEN TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM	7
1.3. TỔNG QUAN NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT	8
1.3.1 Tái sinh cơ quan trong nuôi cấy mô tế bào thực vật.....	8
1.3.2. Các hình thức tái sinh chồi.....	9
1.3.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phát sinh chồi và rễ ở thực vật.....	10
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	12
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	12
2.2.1. Vật liệu nghiên cứu	12
2.2.2. Môi trường nuôi cấy	12
2.2.3. Điều kiện nuôi cấy.....	12
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	13
2.2.1. Thí nghiệm 1. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian khử trùng lên mẫu cây	13
2.2.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của KIN đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen <i>in vitro</i>	14
2.2.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen <i>in vitro</i>	14
2.2.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát sự ảnh hưởng của 2-ip lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen <i>in vitro</i>	15
2.2.5. Thí nghiệm 5: Khảo sát sự ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen <i>in vitro</i>	15

2.2.6. Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen <i>in vitro</i>	15
2.2.7. Thí nghiệm 7: Định lượng rosmarinic acid trong mẫu cây xạ đen <i>in vitro</i>	16
2.2.8. Thí nghiệm 8: Đánh giá ổn định di truyền của cây xạ đen <i>in vitro</i>	17
2.3.9. Phương pháp xử lý số liệu.....	20
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	20
3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN KHỬ TRÙNG LÊN MẪU CÂY	21
3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA KIN ĐẾN QUÁ TRÌNH KHỞI TẠO CHỒI CÂY XẠ ĐEN <i>in vitro</i>	22
3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA BA LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CHỒI CÂY XẠ ĐEN <i>in vitro</i>.....	25
3.4. ẢNH HƯỞNG CỦA 2-ip LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CHỒI CÂY XẠ ĐEN <i>in vitro</i>.....	26
3.5. ẢNH HƯỞNG CỦA NAA ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO RỄ CHỒI CÂY XẠ ĐEN <i>in vitro</i>	29
3.6. ẢNH HƯỞNG CỦA IBA ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO RỄ CHỒI CÂY XẠ ĐEN <i>in vitro</i>	31
3.7. ĐỊNH LƯỢNG RA TRONG MẪU CÂY XẠ ĐEN <i>in vitro</i>.....	34
3.8. ĐÁNH GIÁ ỔN ĐỊNH DI TRUYỀN CỦA CÂY XẠ ĐEN	34
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	41
KẾT LUẬN	41
KIẾN NGHỊ.....	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	43
PHỤ LỤC.....	50

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

2-ip	: N6-(2-isopentenyl)adenine
AIDS	: Acquired Immuno Deficiency Syndrom (Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải)
BA	: 6-benzylaminopurine
CĐHSTTV	: Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
HIV	: Human Immuno-deficiency Virus (Virus gây suy giảm miễn dịch ở người)
HPLC	: Phương pháp sắc ký lỏng cao áp
IBA	: Indole-3-butyric acid
ID	: Identification (nhận dạng)
ITS	: Internal transcribed spacer DNA
KIN	: Kinetin
MS	: Murashige và Skoog
NAA	: α -naphthalene acetic acid
NCBI	: Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (Mỹ)
RA	: Rosmarinic acid
PCR	: Polymerase Chain Reaction
WHO	: World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần cho phản ứng PCR (cho mỗi 12,5 μ l phản ứng).....	19
Bảng 2.2. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR của cặp mồi ITS	19
Bảng 2.3. Vùng gen DNA barcode và primer được sử dụng để sàng lọc vùng gen thích hợp trong phân tích một số loài thuộc chi <i>Ehretia</i> [40].	20
Bảng 2.4. Danh sách loài và mã số ID của trình tự DNA trên GenBank	20
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu cây đốt thân của cây xạ đen ..	22
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của KIN đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy	22
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của BA lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy	25
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của 2-ip lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy	27
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy	29
Bảng 3.6. Hàm lượng RA trong các mẫu xạ đen	34
Bảng 3.7. Khoảng cách di truyền giữa 19 loài <i>Ehretia</i> dựa vào chỉ thị ITS	39

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình thái cây xạ đen 2 năm tuổi tại vườn ươm phòng Công nghệ tế bào thực vật.....	4
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu chung.....	13
Hình 3.1. Ảnh hưởng của KIN đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy	24
Hình 3.2. Hình giải phẫu của chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> dưới kính hiển vi.....	24
Hình 3.3. Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy.....	26
Hình 3.4. Ảnh hưởng của 2-ip lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy.....	28
Hình 3.5. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy.....	30
Hình 3.6. Ảnh hưởng của IBA đến tỷ lệ hình thành rễ của mẫu cấy chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy.....	32
Hình 3.7. Ảnh hưởng của IBA đến số rễ và chiều dài rễ của mẫu cấy chồi cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy.....	32
Hình 3.8. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy.....	33
Hình 3.9. Kết quả PCR của vùng DNA barcode ITS trên gel agarose 1,2%.....	35
Hình 3.10. Căn chỉnh đoạn trình tự DNA của <i>E. asperula in vitro</i> và <i>ex vitro</i> với các loài <i>Ehretia</i> khác và một loài thuộc nhóm ngoài của vùng ITS.....	36
Hình 3.11. Cây phát sinh loài của cây xạ đen <i>in vitro</i> và <i>ex vitro</i> dựa trên trình tự ITS của trình tự nghiên cứu và các trình tự tham chiếu trên NCBI.....	40

MỞ ĐẦU

❖ Lý do chọn đề tài

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), khoảng 80% dân số tại các quốc gia đang phát triển chăm sóc sức khỏe bằng các thuốc y học cổ truyền. Cây dược liệu có giá trị kinh tế lớn hơn so với cây lương thực và thực phẩm. Chính vì vậy, cây dược liệu đã và đang mang lại nguồn lợi lớn cho nền kinh tế ngoài việc cung cấp nguyên liệu cho sản xuất thuốc. Hiện nay, Việt Nam là một trong 10 trung tâm đa dạng sinh học phong phú nhất thế giới và được xếp hạng 16 trên thế giới về đa dạng nguồn gen. Trong đó, có rất nhiều nguồn gen được ứng dụng làm thuốc phòng và chữa bệnh. Ước tính có 3.830 loài cây dược liệu dùng làm thuốc, chiếm khoảng 36% trong số 10.500 loài thực vật bậc cao có mạch. So với 35.000 loài cây làm thuốc trên toàn thế giới, số loài cây thuốc Việt Nam được biết đến chiếm khoảng 11%.

Với mục tiêu quản lý, khai thác và sử dụng bền vững nguồn tài nguyên cây thuốc phục vụ công tác chăm sóc sức khỏe, góp phần phát triển kinh tế - xã hội và bảo tồn đa dạng sinh học, công tác bảo tồn nguồn gen cây thuốc đã được thực hiện thường xuyên trong nhiều năm qua. Chính vì vậy, kỹ thuật nuôi cấy mô đã mở ra hướng ứng dụng cho phép đưa các loài cây này vào điều kiện nuôi cấy *in vitro*, từ đó có những nghiên cứu sâu hơn nhằm kiểm soát và chủ động sản xuất với số lượng lớn sinh khối tế bào sẽ được sử dụng là nguyên liệu cho các sản phẩm dược phẩm.

Điều kiện khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa và địa hình đa dạng của Việt Nam, là một trong những quốc gia sở hữu nhiều loại dược liệu quý. Trong đó, có nhiều loài dược liệu chứa các hợp chất quý như sâm Ngọc Linh, cây bá bệnh, cây ba kích và đặc biệt là cây xạ đen, đã được ứng dụng trong y học cổ truyền để điều trị và phòng ngừa nhiều bệnh tật. Cây xạ đen (*E. asperula*) là một loại dược liệu quý chứa hợp chất alkloid, polyphenols, polysaccharide... và hợp chất chính rosmarinic acid. Cây xạ đen từ lâu đã được biết đến, nghiên cứu và sử dụng để ức chế sự phát triển của khối u ác tính, giảm quá trình oxy hóa, tăng cường sức đề kháng. Loài cây này còn được người dân ở Hòa Bình gọi là cây ung thư trong tiếng Mường. Các nghiên cứu trong và ngoài nước đã chứng minh xạ đen có tác dụng làm tăng cường hệ miễn dịch của cơ thể, ức chế sự phát triển của các khối u ác tính. Mặc dù được sử dụng rộng rãi nhưng việc sử dụng loại dược liệu này vẫn rất hạn chế do nguồn khai thác chủ yếu từ cây trồng hoặc cây hoang dại và chất lượng không đồng đều, trữ lượng có giới hạn. Do đó, việc tìm kiếm một phương pháp khác để có thể sử dụng hiệu quả loài cây thuốc này cũng được quan tâm. Phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật được sử dụng như là một phương pháp thay thế hiệu quả cho

các phương pháp trên. Bên cạnh đó, việc bảo tồn nguồn gen quý này cũng cần được thực hiện. Điều kiện *in vitro* là một trong những điều kiện thuận lợi cho việc bảo tồn các loài thực vật nói chung và loài xạ đen này.

Xuất phát từ những vấn đề trên, đề tài “**Nghiên cứu quy trình nhân giống cây xạ đen (*Ehretia asperula*) *in vitro***” đã được đề xuất với mong muốn tạo được **cây giống** xạ đen với số lượng lớn, đáp ứng yêu cầu cây giống phục vụ cho y học và tạo tiền đề thực hiện những nghiên cứu sau này.

❖ Mục đích nghiên cứu

Xây dựng quy trình vi nhân giống cây xạ đen (*Ehretia asperula*).

❖ Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát ảnh hưởng của thời gian khử trùng lên mẫu cây
- Khảo sát ảnh hưởng của KIN đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen *in vitro*
- Khảo sát sự ảnh hưởng của 2-ip lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen *in vitro*
- Khảo sát sự ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen *in vitro*
- Khảo sát sự ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen *in vitro*
- Định lượng rosmarinic acid trong mẫu cây xạ đen *in vitro*
- Đánh giá ổn định di truyền của cây xạ đen *in vitro*

❖ Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

Cây xạ đen (*Ehretia asperula*) là một loại dược liệu quý chứa hợp chất triterpen, polyphenols, polysaccharide... và đặc biệt là rosmarinic acid. Các nghiên cứu trong và ngoài nước đã nghiên cứu và chứng minh cây xạ đen có tác dụng làm tăng cường hệ miễn dịch của cơ thể, ức chế sự phát triển của các khối u ác tính. Do đó, nhu cầu về loài cây này trên thị trường là rất lớn trong khi số lượng cá thể trong tự nhiên đang bị giảm sút nghiêm trọng và khả năng tái sinh trong tự nhiên của chúng lại rất thấp. Chúng ta cần nghiên cứu giải pháp nhanh chóng và kịp thời nhằm đáp ứng tình hình thực tế.

Phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật được sử dụng như là một phương pháp thay thế hiệu quả cho các vấn đề trên. Bên cạnh đó, việc bảo tồn nguồn gen quý này cũng cần được thực hiện. Điều kiện *in vitro* là một trong những điều kiện thuận lợi cho việc bảo tồn loài xạ đen này. Vì vậy đề tài “**Nghiên cứu quy trình nhân giống cây xạ đen (*Ehretia asperula*) *in vitro***” có ý nghĩa khoa học, thực tiễn và là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

❖ Những đóng góp của luận văn

Đề tài được đề xuất với mong muốn hoàn thiện quy trình nhân giống cây xạ đen để tạo được cây giống xạ đen với số lượng lớn, đáp ứng yêu cầu cây giống phục vụ cho y học và tạo tiền đề thực hiện những nghiên cứu sau này.

Xác định được nồng độ KIN thích hợp cho khả năng khởi tạo chồi cây xạ đen trong *in vitro*.

Xác định được nồng độ BA và 2-ip thích hợp cho khả năng nhân chồi của cây xạ đen *in vitro*.

Xác định nồng độ NAA và IBA thích hợp ảnh hưởng đến quá trình tạo rễ của cây xạ đen *in vitro* nhằm chuẩn bị cây con khoẻ mạnh để đưa ra vườn ươm.

Định lượng acid rosmarinic có trong mẫu cây xạ đen *in vitro*.

Đánh giá ổn định di truyền của cây xạ đen *in vitro*.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ CÂY XẠ ĐEN

Giới thiệu về cây xạ đen (Ehretia asperula)

Giới	:	Thực vật
Ngành	:	Magnoliophyta
Lớp	:	Magnoliopsida
Bộ	:	Solanales
Họ	:	Boraginaceae
Chi	:	Ehretia
Loài	:	<i>Ehretia asperula</i> Zoll. & Mor.



Hình 1.1. Hình thái cây xạ đen 2 năm tuổi tại vườn ươm phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới; a) Cây xạ đen; b) Hoa xạ đen; c) Lá xạ đen; d) Trái xạ đen.

Trước đây, cây xạ đen được phân loại khoa học với tên gọi *Celastrus hindsii*, thuộc họ *Celastraceae*. Tuy nhiên, trong nghiên cứu năm 2009 của Hoa và cộng sự đã xác định lại danh pháp khoa học chính xác của xạ đen là *Ehretia asperula* Zoll. & Moll., thuộc họ *Boraginaceae* [1].

Cây xạ đen phân bố ở các nước châu Á như Trung Quốc, Việt Nam, Myanmar, Thái Lan. Ở Trung Quốc, cây thường mọc ở vùng núi cao từ 1000 - 1500 m. Tại Việt Nam, xạ đen phân bố tự nhiên ở nhiều tỉnh như Hòa Bình, Vĩnh Phúc, Ninh Bình, đặc biệt là các vườn quốc gia như Cúc Phương, Ba Vì... loài cây này mọc tự nhiên trong rừng nhờ khả năng thích nghi tốt.

1.1.1. Đặc điểm hình thái

Cây xạ đen là một trong những cây dược liệu nổi tiếng với nhiều công dụng chữa bệnh. Đây là loài cây mọc tự nhiên trong các khu rừng của nước ta như Hòa Bình, Vĩnh Phúc, Ninh Bình, Quảng Bình... Cây xạ đen có thân bụi trườn, cao 3 - 5 m; cành màu nâu xám, cứng cáp, không có lông; cành non màu nâu hoặc nâu nhạt. Lá đơn, mọc so le; cuống lá dài 0,6 - 1,5 cm; phiến lá hình ê-líp đến thuôn, kích thước 3 - 12 x 2 - 6 cm, gốc lá tròn, mép thường nguyên. Cụm hoa dạng xim nổi bật, ở đỉnh nhánh, đỉnh cụm hoa phẳng, rộng khoảng 4 - 6 cm, có lông tơ; lá bắc có kích thước 3 - 10 mm, đôi khi dạng cong, dai. Cuống hoa dài 1,5 - 3,0 mm. Đài hoa màu nâu, kích thước 1,5 - 2,5 mm, có lông tơ. Tràng hoa màu trắng, dạng phễu, kích thước 3,5 - 4,0 mm. Chỉ nhị dài 3,5 - 4,0 mm; bao phấn dài. Vòi nhụy dài 3 - 4 mm. Ra hoa từ tháng 3 - 5, ra quả tháng 8 - 12. Quả hạch màu đỏ hoặc cam khi chín, đường kính 3 - 4 mm. Cây ưa sáng, ưa đất ẩm. Mùa hoa vào tháng 7 - 11, mùa quả vào tháng 1 - 2 năm sau.

1.1.2. Thành phần hóa học

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng cây xạ đen chứa nhiều hợp chất như sesquiterpenes, alkaloids, flavonoids, terpenoids, triterpenes, các polyphenol, tannin, acid amin, đường khử và cyanoglycosid. Hai hợp chất chính trong lá xạ đen là rosmarinic acid và lithospermic acid B [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Thành phần cụ thể có thể thay đổi tùy thuộc vào thời điểm thu hái và phương pháp chiết xuất [8].

Trong cây xạ đen, hàm lượng lớn các hợp chất phenolic và đặc biệt là RA [9], [10]. Các nghiên cứu cho thấy RA trong lá xạ đen có khả năng chống oxy hóa mạnh hơn cả vitamin E (α -tocopherol) [9]. Năm 2016, Ly đã thành công trong việc chiết xuất RA từ lá xạ đen khô [11]. Thêm vào đó, nghiên cứu gần đây của Lê và cộng sự (2021) đã chỉ ra rằng RA và hợp chất methyl rosmarinate, có khả năng bảo vệ tế bào võng mạc khỏi tổn thương do stress oxy hóa và các tác nhân gây hại khác [12]. RA

là một hợp chất phenolic phổ biến trong các loài thực vật thuộc họ *Boraginaceae* và *Lamiaceae* [13].

1.1.3. Tác dụng dược lý

Cây xạ đen có vị đắng chát, tính hàn, có tác dụng giảm tiết dịch trong xơ gan cổ chướng, điều trị mụn nhọt, tiêu viêm, giải độc và đặc biệt là trong việc chữa trị ung thư, tăng cường sức đề kháng cho cơ thể. Ngoài ra, cây còn có tác dụng thông kinh, lợi niệu, và được sử dụng trong điều trị kinh nguyệt không đều, bế kinh, viêm gan, và bệnh lậu.

Ngày nay, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng cây xạ đen chứa các hoạt chất chống ung thư rất hiệu quả và được xem là mạnh nhất trong các loại dược liệu có hoạt chất chống ung thư. Một số công dụng đáng chú ý của cây xạ đen bao gồm: điều trị, ức chế và ngăn ngừa sự phát triển của tế bào ung thư, tiêu hạch, giải độc, thanh nhiệt, mát gan, điều hòa lưu thông huyết, giảm đau, an thần và tăng cường sức đề kháng cho cơ thể [7].

Các nghiên cứu khoa học đã chứng minh rằng cây xạ đen có nhiều hoạt tính sinh học. Dịch chiết từ cây xạ đen đã được chứng minh có khả năng kháng tế bào ung thư, tăng cường hệ miễn dịch, chống oxy hóa và chống lại virus HIV [7].

Các nghiên cứu của Giáo sư Lê Thế Trung và cộng sự tại Học viện Quân y đã chỉ ra rằng chiết xuất từ cây xạ đen có khả năng kìm hãm sự phát triển của khối u ác tính. Thậm chí, khi kết hợp với chất phylamine, hợp chất chiết xuất từ xạ đen còn giúp kéo dài tuổi thọ của động vật mô hình ung thư đáng kể so với các loại thuốc điều trị khác.

Nghiên cứu của Kuo và Yang (1997) đã chứng minh dịch chiết từ cây xạ đen chứa các hợp chất triterpen có khả năng kháng tế bào ung thư. Các hợp chất này, bao gồm celasdin A, celasdin C, anti-AIDS celasdin và cytotoxic maytenfolone A, có khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư gan, ung thư mũi họng và ung thư đại tràng trong các thí nghiệm. Ngoài ra, hợp chất anti-AIDS celasdin B còn có tác dụng ức chế sự lây lan của virus HIV [7].

Rosmarinic acid là một hợp chất trong cây xạ đen có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong nhiều lĩnh vực. Với loạt hoạt tính sinh học đa dạng, RA không chỉ được biết đến với khả năng làm se lỗ chân lông, chống oxy hóa và chống viêm mà còn có tác dụng kháng khuẩn, kháng virus và hỗ trợ hệ tiêu hóa [13]. Ngoài ra, RA còn được ứng dụng làm chất phụ gia thức ăn tạo ra các tác động có lợi cho sức khỏe. RA còn được chứng minh có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer, chống dị ứng

hoặc phòng ngừa bệnh tiểu đường [14]. Ozturk và cộng sự (2014) đã báo cáo sự giảm nồng độ creatinine trong tuần hoàn, giảm nitơ urê máu, giảm hoại tử cầu thận khu trú, giảm giãn bao Bowman, giảm giãn biểu mô ống và giãn ống ở những con chuột bị thận hư được điều trị bằng RA [15].

1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU CÂY XẠ ĐEN TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước về cây xạ đen được công bố, các nghiên cứu này chủ yếu tập trung vào nghiên cứu cấu trúc phân tử của các hợp chất được tách chiết từ cây xạ đen và tác dụng dược lý của dịch chiết xạ đen.

Bên cạnh các nghiên cứu về hợp chất có hoạt tính sinh học của loài này, một số nghiên cứu về nhân giống cũng như những nghiên cứu về nuôi cấy mô tế bào thực vật cũng được thực hiện. Nghiên cứu của Trần Thị Mỹ Trâm và cộng sự (2018) đánh giá ảnh hưởng của đèn LED đến sự sinh trưởng, khả năng kháng oxy hóa và hàm lượng phenolic của cây xạ đen (*E. asperula*) *in vitro* cho thấy rằng các mẫu chồi xạ đen *ex vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung KIN với nồng độ 3,0 mg/l đạt tỷ lệ hình thành chồi 100%, với số chồi hình thành đạt 1,57 chồi/mẫu. Kết quả ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy, cây xạ đen *in vitro* nuôi cấy dưới ánh sáng của đèn growth light cho thấy sự phát triển về chiều cao, khối lượng và số lượng lá, đồng thời tích lũy hàm lượng phenolic cao và có khả năng chống oxy hóa tốt hơn so với các thí nghiệm khác. Bên cạnh đó, mẫu cao chiết xạ đen còn chứa các nhóm hợp chất thứ cấp khác như carbohydrate, protein, amino acid và chất béo. Ngoài phenolic, mẫu cao chiết còn chứa các hợp chất thứ cấp khác như carbohydrate, protein, amino acid [16].

Lê Thị Tâm Hồng và cộng sự (2019) tiến hành nuôi cấy *in vitro* đọt thân cây xạ đen, kết quả chỉ ra rằng, môi trường khoáng thích hợp cho quá trình nuôi cấy tạo chồi từ mẫu đoạn thân là $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung BA (0,1 mg/l) và quá trình tạo rễ thích hợp ở môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung IBA (0,25 mg/l) [17]. Cùng năm 2019, Lê Thị Tâm Hồng và Trần Văn Minh cũng đã nghiên cứu sự tích lũy saponin trong nuôi cấy huyền phù tế bào của *E. asperula*. Các thí nghiệm nuôi cấy tế bào đã nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ lắng, tỷ lệ giữa tế bào ban đầu và trung bình, và việc bổ sung methyl jasmonate/phenylalanine đối với sự tăng sinh tế bào và sự tích tụ saponin.

Phạm Thị Mỹ Trâm và cộng sự (2020) khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường và nguồn cung cấp carbon lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ mẫu

cây lá của cây xạ đen *in vitro* [18].

1.3. TỔNG QUAN NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Nuôi cây mô thực vật (Nuôi cây *in vitro*) là kỹ thuật nhân giống cây trồng bằng cách nuôi cấy các mô, tế bào hoặc cơ quan của cây trong môi trường dinh dưỡng ở điều kiện vô trùng. Môi trường này cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết như muối khoáng, vitamin và các chất điều hòa sinh trưởng để tế bào thực vật phát triển và tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Nhân giống *in vitro* có thể sản xuất số lượng lớn cây giống sạch bệnh, đồng đều và nhanh chóng, không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên [19].

1.3.1 Tái sinh cơ quan trong nuôi cấy mô tế bào thực vật

Phát sinh cơ quan bất định là quá trình hình thành các cơ quan mới như chồi hoặc rễ từ các mô khác của cây. Quá trình này bắt đầu từ một hoặc một nhóm tế bào, dưới tác động của môi trường, các tế bào này sẽ phân chia mạnh mẽ để tạo thành mô phân sinh mới. Từ mô phân sinh này, các cơ quan mới sẽ phát triển [19].

Khả năng tái sinh đã được nghiên cứu trên nhiều loại cây trồng bằng kỹ thuật nuôi cấy mô *in vitro* nhưng khả năng tái sinh còn tùy thuộc vào từng loài cây. Nhiều loài cây trồng khó tái sinh, nghĩa là chúng không thể dễ dàng tạo ra cây mới từ các mô nuôi cấy. Ngay cả trong cùng một giống cây, sự khác biệt về khả năng đáp ứng cũng rất lớn. Thêm vào đó, quá trình chuyển gen đôi khi có thể làm giảm hoặc mất khả năng tái sinh của cây trồng [19].

Khi một tế bào thực vật có khả năng tái sinh, nó sẽ trải qua quá trình phân hóa. Quá trình này giúp tế bào có thể phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau. Sau đó, phát triển thành một cơ quan mới, chẳng hạn như chồi hoặc rễ. Cơ quan hình thành từ quá trình này được gọi là cơ quan bất định [20].

Một số giả thuyết được đề xuất bởi Christianson và Warnick (1984) giải thích một chuỗi các quá trình của sự phát sinh cơ quan theo thời gian [21]. Theo đó thì sự phát sinh cơ quan phải trải qua hai giai đoạn cơ bản sau:

- Giai đoạn một: Để cho các mô hình thành cơ quan, tế bào của mô đó phải có tiềm năng bao gồm khả năng cảm ứng được với môi trường và có những phản ứng biến đổi trong bản thân nó.

- Giai đoạn hai: Quá trình xác định hướng phát triển của tế bào tiềm năng để sau đó tế bào bước vào giai đoạn biệt hóa.

Các giai đoạn này đều cần đến sự tác động của chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV). Chỉ có khi bước vào giai đoạn biệt hóa thì tế bào không cần đến tác động của CĐHSTTV nữa.

1.3.2. Các hình thức tái sinh chồi

Tái sinh trực tiếp

Mô phân sinh chồi hình thành trực tiếp từ mẫu cây thường được khởi tạo bằng sự phân bào sơ cấp sau 48 giờ nuôi cấy. Kế tiếp mỗi quá trình phân bào sơ cấp là một quá trình phân bào dài và phức tạp hơn, kết quả hình thành nên các mầm chồi bất định, mỗi mầm chồi bao gồm nhiều tế bào. Sự hình thành trực tiếp này thường bắt nguồn từ một hay một nhóm các tế bào sinh dưỡng chưa phân hoá .

Nghiên cứu của Broertjes và cộng sự (1976) đã chỉ ra rằng quá trình hình thành mầm chồi bất định có thể bắt đầu từ một tế bào đơn lẻ. Theo đó, không phải lúc nào mầm chồi mới cũng bắt nguồn từ nhiều tế bào. Trong một số trường hợp, chỉ cần một tế bào biểu bì duy nhất cũng có thể phát triển thành một vùng mô phân sinh trung tâm, từ đó tạo ra từ 1 đến 22 mầm chồi giống nhau. Các nghiên cứu sau này trên nhiều loài cây khác cũng đã ủng hộ giả thuyết này [22]. Nghiên cứu cho thấy quá trình phát sinh chồi bất định thường bắt đầu từ các tế bào nhu mô nằm bên dưới lớp biểu bì [22]. Ví dụ, nghiên cứu về cây tử linh lan của Norris và cộng sự (1983) chỉ ra rằng sự hình thành mô phân sinh mới liên quan đến sự kết hợp của các tế bào ở lớp dưới biểu bì [23]. Ngoài ra, trên lá cây thuốc lá, các chồi mới thường xuất hiện từ các tế bào mô giậu, đặc biệt là ở phần rìa lá [24].

Theo Attfield và Evans (1991), quá trình hình thành rễ bất định ở cây thuốc lá thường bắt nguồn từ các bó mạch và các tế bào xung quanh. Điều này tương tự như quá trình tạo rễ ở cây đậu Hà Lan. Các nhà khoa học cho rằng các chất kích thích sinh trưởng như auxin (IAA) có thể đã được khuếch tán ra từ các tế bào mạch và kích hoạt quá trình phân chia tế bào, dẫn đến sự hình thành rễ mới [24].

Tái sinh gián tiếp

Sự hình thành các khối mô sẹo từ mẫu cấy ban đầu sau khoảng thời gian nuôi cấy nhất định để hình thành các chồi bất định. Các chồi này phát triển từ ngoại vi mô sẹo và không có quan hệ ban đầu với các mô có mạch dẫn của mẫu cấy. Sự hình thành cơ quan như thế được gọi là quá trình tái sinh gián tiếp.

Sự phát sinh gián tiếp các cơ quan bất định cũng giống như quá trình phát sinh trực tiếp, đều bắt đầu bằng giai đoạn phân chia tế bào mạnh mẽ để hình thành vùng mô phân sinh. Sau đó, các mầm chồi sẽ xuất hiện và phát triển thành chồi hoàn chỉnh. Do đó, đôi khi rất khó để phân biệt hai hình thức này. Để kích thích sự phát

sinh cơ quan gián tiếp, các mô sẹo thường được chuyển sang môi trường nuôi cấy chứa các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thích hợp, giúp thúc đẩy quá trình biệt hóa mô sẹo thành các cơ quan mới.

Trong nhân giống *in vitro*, việc cấy tái sinh trực tiếp từ mẫu cấy ban đầu mang lại nhiều ưu điểm. Không chỉ rút ngắn thời gian thu được cây con, mà các cây này còn có tính đồng nhất về mặt di truyền cao. Ngược lại, tế bào mô sẹo sau nhiều lần cấy chuyển thường xảy ra biến đổi di truyền. Do đó, để đảm bảo tính đồng nhất của cây tái sinh, người ta thường sử dụng mô sẹo sơ cấp, tức là mô sẹo mới hình thành, để tiến hành quá trình tái sinh.

1.3.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phát sinh chồi và rễ ở thực vật

Tương tác giữa auxin và cytokinin trong quá trình phát sinh hình thái ở thực vật

Các auxin và cytokinin đóng vai trò thiết yếu trong sự tăng trưởng và phát triển của thực vật. Mô phân sinh chóp rễ và chồi đỉnh là những cấu trúc quan trọng trong quá trình này, vì vậy các tương tác giữa auxin và cytokinin đã được nghiên cứu sâu về sự hình thành và chức năng của mô phân sinh ngọn. Cùng với đó, mối quan hệ giữa auxin và cytokinin trong sự phát triển của các cơ quan vẫn chưa đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Trong nghiên cứu của Jasmina và cộng sự (2019) đã chỉ ra rằng auxin với nồng độ thấp sẽ hạn chế tác dụng của cytokinin, trong khi sự gia tăng nồng độ cytokinin có thể làm giảm tác dụng ức chế này và dẫn đến sự ức chế hoạt động của auxin. Khi nồng độ của cả hai hormone tăng lên, các tương tác đối kháng giữa cytokinin và auxin không còn rõ rệt nữa. Do đó, kết quả cho thấy sự tương tác hai chiều và không đối xứng giữa auxin và cytokinin vượt ra ngoài ranh giới của mô phân sinh đỉnh [25].

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự phát triển của thực vật chủ yếu được điều chỉnh bởi các tương tác giữa auxin và cytokinin [26]. Những tương tác này rất quan trọng trong sự phát triển của mô phân sinh chóp rễ và chồi đỉnh. Auxin và cytokinin tương tác theo cả hai cách đối kháng và hỗ trợ trong quá trình phát triển mô phân sinh đỉnh rễ và chồi, liên quan đến sự phối hợp của các con đường truyền tín hiệu, sinh tổng hợp và vận chuyển tác động đến sự phát triển của mô phân sinh, sự hình thành cấu trúc mạch và khởi đầu sự hình thành cơ quan của chồi đỉnh [27, 28, 29, 30, 31].

Mặc dù đã có những tiến bộ trong việc nghiên cứu các tương tác auxin–cytokinin trong mô phân sinh đỉnh. Tuy nhiên, vai trò và mức độ của các tương tác này trong sự phát triển của các cơ quan sau khi chúng được khởi tạo bởi mô phân

sinh đỉnh còn chưa được nghiên cứu rộng rãi. Jasmina và cộng sự (2019) đã chỉ ra sự khác biệt giữa các cơ chế tác động đến sự hình thành các cơ quan rễ và thân [25]. Ở thân, lá được khởi tạo tại mô phân sinh đỉnh của thân và sau đó tham gia vào quá trình phân chia tế bào và biệt hóa để đạt kích thước và hình dạng cuối cùng của lá [32]. Ngược lại, rễ bên không được hình thành từ mô phân sinh đỉnh của rễ mà phát triển từ các mô phân sinh mới có nguồn gốc từ các tế bào xung quanh (pericycle cells). Các tế bào này cần kích hoạt từ mô phân sinh rễ để phát triển thành mô phân sinh rễ bên [33].

Sự phát triển và hình thành cấu trúc của rễ ở thực vật được điều chỉnh chủ yếu bởi các CDHSTTV, đặc biệt là cytokinin và auxin. Cytokinin, được tổng hợp chủ yếu trong chóp rễ, thúc đẩy quá trình phân chia tế bào, tăng cường độ nhạy của tầng sinh mạch, điều chỉnh sự biệt hóa mạch và kiểm soát phát sinh cơ quan ở chóp rễ (root Apical dominance). Auxin, được sản xuất trong các cơ quan của chồi non, thúc đẩy sự phát triển của rễ và tạo điều kiện cho sự phân hóa mạch. Auxin và cytokinin đều điều chỉnh tính hướng trọng lực của rễ (root gravitropism) [34].

Theo Aloni và cộng sự (2006), cytokinin là chất điều hoà sinh trưởng thực vật, đóng vai trò phân tử tín hiệu thiết yếu trong việc điều hoà quá trình phân chia tế bào, sinh trưởng và phát triển ở thực vật [34]. Cytokinin và auxin đều được sản xuất ở rễ và chồi, tuy nhiên việc sản xuất các CDHSTTV này không diễn ra ngẫu nhiên mà phụ thuộc vào vị trí của các tế bào tổng hợp trong cơ thể thực vật, các giai đoạn phát triển, và các điều kiện môi trường nuôi cấy [34]. Từ các cơ quan ban đầu sản xuất cytokinin và auxin, như là chóp rễ hay chồi non, các tín hiệu sẽ di chuyển theo các con đường vận chuyển cụ thể với những cơ chế khác nhau để điều hoà sự phát triển và biệt hóa tế bào ở thực vật [35, 36].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là cây xạ đen (*E. asperula*) 3 năm tuổi được trồng tại vườn ươm phòng Công nghệ tế bào thực vật – Viện Sinh học nhiệt đới.

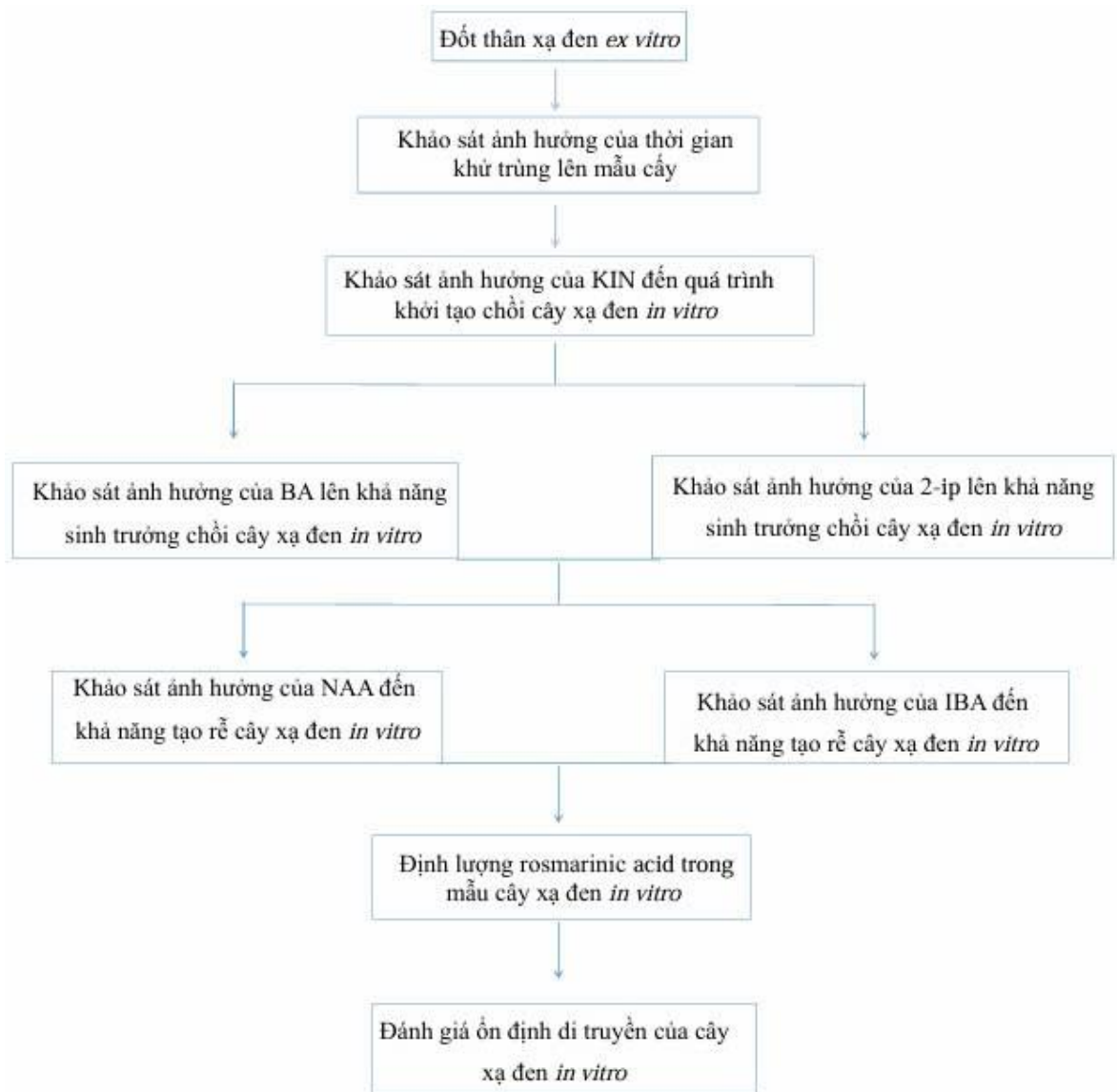
2.2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường khoáng cơ bản Murashige và Skoog (MS) [37] bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar bổ sung các CĐHSTTV (KIN, BA, 2-ip, NAA, và IBA) với các nồng độ khác nhau (đối với từng thí nghiệm). Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8 và được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong 20 phút.

2.2.3. Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các bình nuôi cấy được chiếu sáng với thời gian 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (đèn huỳnh quang). Nhiệt độ trung bình trong phòng nuôi cấy 25 ± 2 °C, độ ẩm tương đối trung bình 55 - 60%.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu chung.

2.2.1. Thí nghiệm 1. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian khử trùng lên mẫu cây

Mục đích: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu đến tỷ lệ sống, tỷ lệ nhiễm của mẫu cây xạ đen.

Cách tiến hành: Các đốt thân có chứa chồi ngủ được cắt từ cây xạ đen 3 năm tuổi ngoài vườn ươm với kích thước 2,0 - 3,0 cm. Các mẫu này được khử trùng sơ bộ bằng xà phòng loãng để rửa sạch bụi bám bên ngoài bề mặt. Sau đó, mẫu được lắc bằng nước xà phòng loãng trong 5 phút, tiếp theo rửa lại bằng nước cho sạch và để mẫu dưới vòi nước chảy nhẹ từ 30 - 60 phút.

Mẫu cây sau khi khử trùng bên ngoài được mang vào tủ cấy để tiếp tục khử trùng. Các mẫu cây được khử trùng bằng cồn 70° trong 30 giây rồi rửa lại bằng

nước hấp vô trùng. Sau đó lắc nhẹ trong dung dịch HgCl_2 1% với thời gian khác nhau (12, 16, 20 phút) rồi lắc lại 4 lần bằng nước hấp vô trùng để rửa sạch dung dịch khử trùng. Tiếp theo, các mẫu cấy được loại bỏ phần bị hoại tử và cắt thành những đốt thân có kích thước 1,0 - 1,5 cm, mang chồi ngủ, cấy vào môi trường MS cơ bản không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

Thí nghiệm này được lặp lại 3 lần, mỗi lần 10 bình, mỗi bình 1 mẫu, mỗi bình chứa 20 ml môi trường MS.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 2 tuần nuôi cấy, tiến hành lấy số liệu các chỉ tiêu sau: Tỷ lệ mẫu sống (%), tỷ lệ mẫu nhiễm (%).

$$\text{Tỷ lệ mẫu sống (\%)} = \frac{\Sigma \text{số mẫu sống}}{\Sigma \text{số mẫu}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ mẫu nhiễm (\%)} = \frac{\Sigma \text{số mẫu nhiễm}}{\Sigma \text{số mẫu}} \times 100$$

2.2.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của KIN đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen *in vitro*

Mục đích: Xác định được nồng độ KIN thích hợp cho khả năng khởi tạo chồi cây xạ đen trong *in vitro*.

Cách tiến hành: Các mẫu cấy đốt thân sống và không nhiễm ở thí nghiệm 1 được cấy vào môi trường MS có bổ sung kinetin (KIN) với các nồng độ lần lượt là 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 mg/l. Nghiệm thức không bổ sung KIN được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức 10 bình (Mỗi bình 1 mẫu) được lặp lại 3 lần.

Sau 4 tuần nuôi cấy, tiến hành thu nhận số liệu các chỉ tiêu sau: Tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%), số chồi phát sinh/mẫu, chiều cao chồi (cm).

2.2.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen *in vitro*

Mục đích: Xác định được nồng độ BA thích hợp cho khả năng nhân chồi của cây xạ đen *in vitro*.

Cách tiến hành: Các đốt thân cây xạ đen *in vitro* mang chồi ngủ có chiều cao 1,0 cm được cấy vào bình nuôi cấy dung tích 500 ml chứa 50 ml môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, và BA với các nồng độ khác nhau lần lượt là 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 mg/l. Môi trường MS không bổ sung BA được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 bình, mỗi bình 3 mẫu.

Sau 4 tuần nuôi cấy, tiến hành thu nhận số liệu các chỉ tiêu sau: Tỷ lệ hình thành chồi (%), số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi.

2.2.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát sự ảnh hưởng của 2-ip lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen *in vitro*

Mục đích: Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ 2-ip đến khả năng nhân chồi của cây xạ đen.

Cách tiến hành: Các đốt thân cây xạ đen *in vitro* mang chồi ngủ có chiều cao 1,0 cm được cấy vào môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, và 2-ip với các nồng độ khác nhau lần lượt là 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 mg/l. Môi trường MS không bổ sung 2-ip được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 bình, mỗi bình 3 mẫu, bình nuôi cấy dung tích 500 ml chứa 50 ml môi trường.

Sau 4 tuần nuôi cấy, tiến hành thu nhận số liệu các chỉ tiêu sau: Tỷ lệ hình thành chồi (%), số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi.

2.2.5. Thí nghiệm 5: Khảo sát sự ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen *in vitro*

Mục đích: Xác định nồng độ NAA thích hợp ảnh hưởng đến quá trình tạo rễ của cây xạ đen *in vitro* nhằm chuẩn bị cây con khoẻ mạnh để đưa ra vườn ươm.

Cách tiến hành: Các chồi đỉnh *in vitro* được cắt khoảng 1,5 cm có chứa 1 cặp lá mở, được nuôi cấy vào bình thuỷ tinh 500 ml chứa 50 ml môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, và NAA với các nồng độ lần lượt là 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg/l. Môi trường MS không bổ sung NAA được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 3 bình, mỗi bình 3 mẫu.

Sau 4 tuần nuôi cấy, tiến hành thu nhận số liệu với các chỉ tiêu sau: Tỷ lệ hình thành rễ, số rễ/mẫu, chiều dài của rễ (cm).

2.2.6. Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen *in vitro*

Mục đích: Xác định nồng độ IBA thích hợp cho khả năng tạo rễ của cây xạ đen *in vitro*.

Cách tiến hành: Các chồi đỉnh *in vitro* được cắt khoảng 1,5 cm có chứa 1 cặp lá mở, được cấy vào môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, và IBA với các nồng độ lần lượt là 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg/l. Môi trường MS không bổ sung IBA được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 3 bình, mỗi bình 3 mẫu, bình nuôi cấy có dung tích 500 ml chứa 50 ml môi trường.

Sau 4 tuần nuôi cấy, tiến hành thu nhận số liệu các chỉ tiêu sau: Tỷ lệ hình thành rễ, số rễ/mẫu, chiều dài của rễ (cm).

2.2.7. Thí nghiệm 7: Định lượng rosmarinic acid trong mẫu cây xạ đen *in vitro*

Dụng cụ, hoá chất

Chất đối chiếu: rosmarinic acid > 98% (HPLC) của Merck Sigma, CAS: 20283-92-5

- Dung môi, hoá chất: Các hoá chất và dung môi dùng trong nghiên cứu đề tài đạt tiêu chuẩn tinh khiết (PA) và loại tinh khiết dùng trong HPLC
- Ethanol tuyệt đối
- Acetic acid 0,5%
- Nước cất hai lần và dung dịch phosphoric acid 0,1% được lọc qua màng lọc 0,45 μm
- Methanol dùng cho HPLC (Merk Đức)
- Nước cất hai lần đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam

Máy móc, thiết bị

- Phân tích HPLC được thực hiện trên hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Prominence-i LC-2030, đầu dò PDA, Shimadzu –Nhật.
- Máy quang phổ UV-VIS Shimadzu UV1800.
- Cân phân tích, bể siêu âm
- Phễu lọc Buchner, bộ lọc dung môi, lọc mẫu với màng lọc 0,45 μm , vial.
- Các dụng cụ thủy tinh khác: Bình định mức, pipet, ống đong,...

Điều kiện sắc ký

Từ các kết quả khảo sát, xác định được điều kiện tối ưu cho quá trình phân tích RA trong loài *E. asperula* như sau:

- Cột: Shimadzu GIST C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)
- Nhiệt độ cột: 30 °C
- Pha động: MeOH: dung dịch H₃PO₄ 0,1% (60:40)
- Bước sóng phát hiện: 330 nm.
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Thể tích tiêm: 20 μl
- Thời gian phân tích: 10 phút.

Xử lý mẫu

Định lượng RA trong mẫu xạ đen bằng phương pháp HPLC - PDA, phương pháp của Couto và cộng sự (2011) có chỉnh sửa [38], quy trình xử lý mẫu được tiến hành như sau:

Lá *E. asperula* sau khi sấy khô, nghiền thành bột mịn (0,5 g), sau đó cân 100 mg bột dược liệu chiết với ethanol: nước theo tỷ lệ 3 : 7 (3 lần x 10 ml) bằng thiết bị siêu âm (nhiệt độ thường, mỗi lần 10 phút). Các dịch chiết gom lại, lọc qua bông và định mức vào bình định mức 50 ml, thêm dung môi ethanol: 0,5% acetic acid tỷ lệ 3 : 7 đến vạch, lọc qua màng 0,45 µm tiến hành tiêm vào hệ thống HPLC.

2.2.8. Thí nghiệm 8: Đánh giá mức độ ổn định di truyền của cây xạ đen *in vitro*

Mục đích: Đánh giá mức độ ổn định di truyền của cây xạ đen *in vitro*.

Phương pháp tách chiết DNA

Mẫu lá của cây xạ đen *in vitro* và mẫu lá *ex vitro* được thu thập tại tỉnh Hòa Bình (đã được xác định hoặc chưa xác định loài) để tiến hành phân tích. DNA tổng số của các mẫu được ly trích dựa trên quy trình CTAB cơ bản có điều chỉnh phù hợp với quá trình tách chiết DNA mẫu lá xạ đen [39].

➤ Đệm CTAB 200 ml gồm:

Tris HCl 1 M, pH 8,0 : 20 ml

EDTA 0,5 M : 16 ml

NaCl 5 M : 56 ml

CTAB 2 % : 4 g

PVP 2% : 4g

β - mercaptoethanol : 400 µl 0,4

➤ RNase (10 mg/ml) RNase

➤ Hỗn hợp Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (P:C:I) (25: 24: 1 v/v)

➤ Hỗn hợp Chloroform/ isoamyl alcohol (25: 24 v/v)

➤ Cồn tuyệt đối, cồn 70 %

➤ Nước (nuclease free) 50 µl

Các bước tách chiết ADN từ lá cây xạ đen bằng phương pháp CTAB

Bước 1: Nghiền mẫu lá xạ đen trong Nitor lỏng bằng cối chày. Bột đã nghiền cho vào ống eppendorf 1,5 ml, thêm 1 ml nước cất vô trùng vào, mang đi ly tâm 10.000 rpm/15 phút.

Bước 2: Sau khi ly tâm thu tủa bỏ dịch, thêm 800 μ l CTAB buffer, vortex mạnh. Ủ ở 60°C trong 1 giờ.

Bước 3: Ly tâm 13.000 rpm/15 phút, thu dịch 600 μ l vào eppendorf mới, bỏ tủa.

Bước 4: Thêm 600 μ l Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (P:C:I) (25:24:1) vào, ly tâm lạnh 14.000 rpm trong 10 phút ở 4°C.

Bước 5: Sau khi ly tâm thì hỗn hợp tách thành 3 lớp, nhẹ nhàng hút phân lớp nước (lớp trên cùng) cho vào eppendorf mới.

Bước 6: Thêm 1 μ l RNase (DNase-free) và ủ ở 37°C trong 30 phút.

Bước 7: Tủa DNA bằng ethanol tỷ lệ 1:2,5. Sau đó ủ ở -20°C khoảng 30 phút.

Bước 8: Tiếp theo, ly tâm 14.000 rpm trong 15 phút ở 4°C, loại bỏ dịch thu tủa.

Bước 9: Thêm 1 ml Ethanol 70% vào, trộn nhẹ nhàng và ly tâm 14.000 rpm trong 15 phút ở 4°C. Loại hết dịch nổi và làm bay hơi hết ethanol trong eppendorf.

Bước 10: Thêm khoảng 50 μ l nước (nuclease free) trộn đều DNA, bảo quản mẫu ở -20°C.

Đo nồng độ DNA

Các mẫu lá của cây xạ đen sau khi ly trích DNA sẽ được đo nồng độ trên máy quang phổ định lượng DNA SpectraMax Quickdrop. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 và 280 nm được tính theo tỉ lệ $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$. Những mẫu DNA tổng có giá trị $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ nằm trong khoảng 1,8 - 2,0 được xem là sạch (không tạp nhiễm protein) sẽ được dùng để chuẩn bị chạy PCR với môi ITS.

Phương pháp chạy PCR với môi ITS

Kỹ thuật chạy PCR của ADN hệ gen với các môi ITS được thực hiện trên máy PCR Gradient Mastercycler nexus (Molecular Devices, Mỹ).

Tổng thể tích của mỗi phản ứng PCR là 25 μ l. Hỗn hợp của các phản ứng được trộn đều trong ống Eppendorf 0,5 ml sau đó nhanh chóng chuyển vào máy PCR.

Thành phần của một phản ứng PCR

Bảng 2.1. Thành phần cho phản ứng PCR (cho mỗi 12,5 μ l phản ứng)

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Myfi DNA Polymerase	2,5
2	Forward Primer	1
3	Reverse Primer	1
4	Myfi Reaction Buffer	0,5
5	DNA mẫu	1
6	Milli Q	6,5
	Tổng	12,5

Bảng 2.2. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR của cặp mồi ITS

Chu kì	Giai đoạn	Nhiệt độ ($^{\circ}$ C)	Thời gian
1	Tiền biến tính	95	1 phút
	Biến tính	95	15 giây
30	Bắt cặp	69	15 giây
	Kéo dài	72	30 giây
1	Kéo dài cuối cùng	72	5 phút
1	Ủ, giữ mẫu	4	∞

Các phản ứng PCR được thực hiện nhằm khuếch đại vùng ITS với cặp mồi tương ứng (Bảng 2.3). Kết quả PCR được phân tích đánh giá trên gel agarose 1,2%, hiệu điện thế 100 V, thời gian 30 phút và chụp hình trên máy chụp gel (Analytik Jena™ UVP ChemStudio PLUS). Sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Ngoài ra, các mã số ID của trình tự DNA trên GenBank đã được tải xuống để hoàn thành bộ dữ liệu cho nghiên cứu, bao gồm 19 trình tự của các loài *Ehretia* và 1 trình tự của các đại diện nhóm ngoài (Bảng 2.4). Các trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm MEGA 11 và kiểm tra các sai lệch. Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 11 (The Molecular Evolution Genetics Analysis) với hệ số bootstrap 1000.

Bảng 2.3. Vùng gen DNA barcode và primer được sử dụng để sàng lọc vùng gen thích hợp trong phân tích một số loài thuộc chi *Ehretia* [40].

Mồi	Vùng DNA	Trình tự mồi (5'- 3')	T _a (°C)
ITS-AB-101	ITS	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G	70.1
ITS-AB-102		TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C	73

Bảng 2.4. Danh sách loài và mã số ID của trình tự DNA trên GenBank

STT	Loài	Kí hiệu	Mã số ID
1	<i>Ehretia asperula in vitro</i>	E1	PQ237098
2	<i>Ehretia asperula ex vitro</i>	E2	PQ237099
3	<i>Ehretia asperula</i>	E3	KY320205
4	<i>Ehretia acuminata</i>	E4	AF385799
5	<i>Ehretia anacua</i>	E5	AF385796
6	<i>Ehretia aquatica</i>	E6	AF385791
7	<i>Ehretia cortesia</i>	E7, E8	AY463159
8	<i>Ehretia coerulea</i>	E9	KF673249
9	<i>Ehretia cymosa</i>	E10	AF385790
10	<i>Ehretia laevis</i>	E11	AF385787
11	<i>Ehretia latifolia</i>	E12	AF385797
12	<i>Ehretia longiflora</i>	E13	AY331400
13	<i>Ehretia obtusifolia</i>	E14	AY331401
14	<i>Ehretia macrophylla</i>	E15	AY463160
15	<i>Ehretia microphylla</i>	E16	AY463160
16	<i>Ehretia monopyrena</i>	E17	AF385792
17	<i>Ehretia resinosa</i>	E18	AY463161
18	<i>Ehretia rigida</i>	E19	AF385789
19	<i>Ehretia saligna</i>	E20	AF385786
20	<i>Ehretia tinifolia</i>	E21	AF385793
21	<i>Ehretia wallichiana</i>	E22	AY331402
22	<i>Borago officinalis</i>	B1	MZ190955

2.3.9. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử bằng phần mềm Microsoft Excel 2016, phần mềm Minitab 16.0 theo kiểu bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên RCD (random complete design), 1 yếu tố, 3 lần lặp lại, mỗi lần 5 bình, mỗi bình 3 mẫu. Các trình tự DNA được căn chỉnh bằng phần mềm Mega 11. Số liệu được biểu hiện dưới dạng mean \pm SD (độ lệch chuẩn standard deviation).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN KHỬ TRÙNG LÊN MẪU CÂY

Khử trùng mẫu là một trong những bước quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật, đảm bảo nguồn mẫu nuôi cấy hoàn toàn vô trùng [41]. Mục tiêu chính của quá trình này là loại bỏ hoàn toàn các vi sinh vật bám trên bề mặt mẫu, đảm bảo môi trường vô trùng để các tế bào thực vật phát triển khỏe mạnh. Trong quá trình nuôi cấy mẫu cây bị nhiễm có thể xảy ra từ nhiều nguồn khác nhau và nguyên nhân chính gây nhiễm khuẩn trong nuôi cấy mô thường bắt nguồn từ chính mẫu cây. Các vi sinh vật như nấm, vi khuẩn thường bám trên bề mặt thực vật, đặc biệt là ở các vết thương, khí khổng hoặc lỗ vỏ [42]. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy chứa nhiều thành phần dinh dưỡng là điều kiện thích hợp cho các vi sinh vật phát triển. Trong môi trường giàu dinh dưỡng, vi sinh vật có thể phát triển nhanh hơn mô thực vật, các vi sinh vật này cũng có thể tiết ra chất độc vào môi trường, ức chế sự phát triển của các mô nuôi cấy [43]. Vì vậy, các mẫu cây cần phải được khử trùng bằng các chất khử trùng hóa học. Những chất này ức chế hoặc tiêu diệt sự tăng trưởng của vi sinh vật, nồng độ sử dụng phải phù hợp và có độc tính thấp đối với mô cây [43]. Để khử trùng mẫu, thường sử dụng các dung dịch có tính sát khuẩn cao như hypochlorite calcium ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), hypochlorite sodium (NaOCl) và clorua thủy ngân (HgCl_2). Cơ chế hoạt động của các chất này chủ yếu là phá hủy màng tế bào của vi sinh vật, ức chế quá trình trao đổi chất và gây biến tính protein [44]. Tỷ lệ vô trùng thành công phụ thuộc vào thời gian khử trùng và nồng độ các chất khử trùng.

Trong thí nghiệm này, HgCl_2 được sử dụng để khử trùng đối với đọt thân cây xạ đen, đây là một chất khử trùng mạnh, rất độc đối với sinh vật, có khả năng tiêu diệt vi khuẩn và các bào tử nấm tác dụng phá hủy liên kết – SH trong các phân tử protein làm cho các tế bào vi sinh vật bị phá hủy nhanh chóng [44] khi sử dụng với nồng độ và thời gian khử trùng thích hợp. Mẫu cây được khử trùng với các thời gian khác nhau và ghi nhận kết quả sau 2 tuần nuôi cấy để đánh giá hiệu quả khử trùng và trình bày ở bảng 3.1. Ở tất cả các nghiệm thức khảo sát đều ghi nhận có mẫu sống vô trùng với tỷ lệ cao nhất ở thời gian 16 phút với tỷ lệ sống đạt 56,67%, tỷ lệ nhiễm 43,33%. Ở thời gian khử trùng thấp hơn 12 phút có tỷ lệ nhiễm cao hơn 66,67% và tỷ lệ sống thấp hơn 33,33%. Khi tăng thời gian khử trùng lên 20 phút thì tỷ lệ nhiễm thấp 23,33% nhưng tỷ lệ mẫu sống chỉ 43,33%. Điều này xảy ra là do với thời gian khử trùng dài làm cho mẫu cây bị tổn thương và chết.

Như vậy, trong các điều kiện được khảo sát, điều kiện khử trùng bằng dung dịch 0,1% HgCl_2 với thời gian khử trùng 16 phút cho thấy hiệu quả khử trùng tốt nhất đối với mẫu cây xạ đen.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu cây đốt thân của cây xạ đen

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)
12	66,67 ± 0,47 ^a	33,33 ± 0,47
16	43,33 ± 0,50 ^{ab}	56,67 ± 0,50
20	23,33 ± 0,43 ^b	43,33 ± 0,50
P	*	ns

*Các chữ cái trong cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê, ns: sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phương pháp Tukey với $p < 0.05$.

3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA KIN ĐẾN QUÁ TRÌNH KHỞI TẠO CHỒI CÂY XẠ ĐEN *in vitro*.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của KIN đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

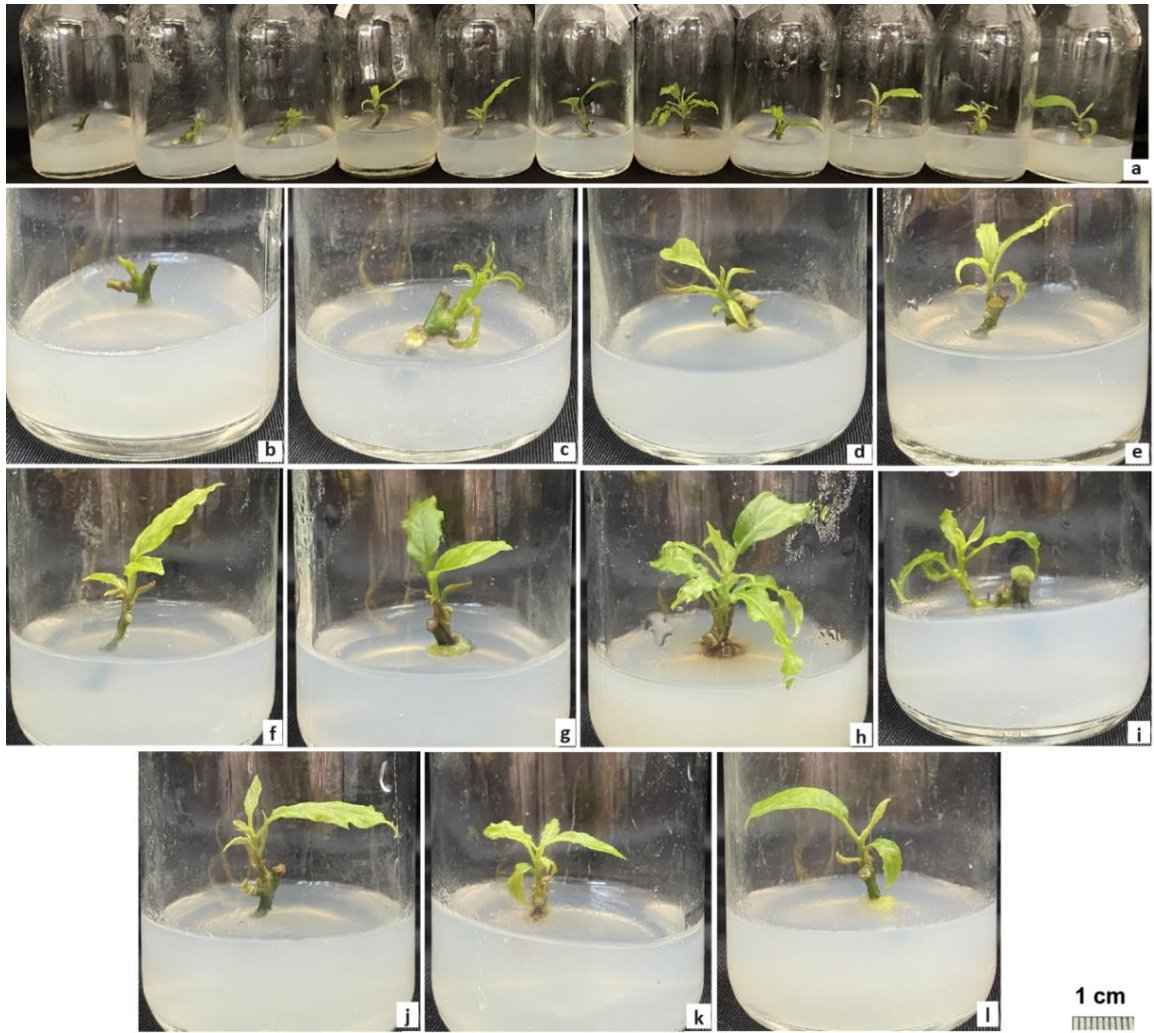
KIN (mg/l)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/ chồi
0,0	10,33 ^b	1,00 ± 0,00 ^d	0,71 ± 0,82 ^d	0,93 ± 0,20 ^e
0,5	100,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^d	1,00 ± 0,81 ^{cd}	1,57 ± 0,30 ^{de}
1,0	100,00 ^a	1,10 ± 0,30 ^{cd}	1,05 ± 0,92 ^c	1,63 ± 0,29 ^{cde}
1,5	100,00 ^a	1,23 ± 0,43 ^{bcd}	1,13 ± 1,09 ^c	1,67 ± 0,21 ^{cde}
2,0	100,00 ^a	1,32 ± 0,47 ^{bc}	1,22 ± 0,98 ^{bc}	1,71 ± 0,36 ^{bcd}
2,5	100,00 ^a	1,40 ± 0,49 ^{ab}	1,45 ± 0,91 ^b	2,30 ± 0,60 ^{bcd}
3,0	100,00 ^a	1,67 ± 0,47 ^a	2,10 ± 1,31 ^a	5,30 ± 0,54 ^a
3,5	100,00 ^a	1,43 ± 0,50 ^{ab}	2,08 ± 1,50 ^a	2,53 ± 0,53 ^b
4,0	100,00 ^a	1,23 ± 0,43 ^{bcd}	1,54 ± 0,90 ^b	2,47 ± 0,27 ^{bc}
4,5	100,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^d	1,13 ± 1,09 ^c	2,33 ± 0,30 ^{bcd}
5,0	100,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^d	1,09 ± 0,89 ^c	2,03 ± 0,33 ^{bcd}
P	*	*	*	*

*Các chữ cái trong cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê theo phương pháp Tukey với $p < 0.05$.

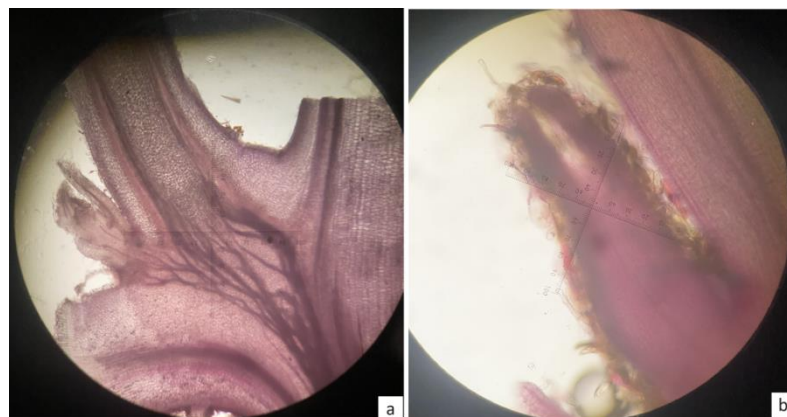
Cytokinin thường được sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật để bắt đầu quá trình tăng trưởng tế bào và thúc đẩy sự hình thành chồi, qua đó chúng tham gia tích

cực vào nhiều quá trình sinh lý thực vật khác nhau [45]. Trong đó, kinetin là một hợp chất cytokinin được Miller và các cộng sự phát hiện vào năm 1955, nó đóng vai trò thúc đẩy sự phân chia tế bào trong các mô thực vật, vì vậy kinetin thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* để tăng tỉ lệ phát sinh chồi [46]. Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu đánh giá ảnh hưởng của KIN lên khả năng nhân nhanh chồi cây xạ đen nuôi cấy *in vitro* được trình bày ở bảng 3.2. Các số liệu ghi nhận thể hiện KIN có tác động tích cực lên sự hình thành chồi của cây xạ đen nuôi cấy *in vitro*. Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy tỉ lệ hình thành chồi mới của mẫu cây xạ đen trên môi trường MS bổ sung KIN đều đạt 100%, cao hơn so với đối chứng (10,33%). Số chồi hình thành (1,0 - 1,67 chồi/mẫu), chiều cao chồi (1,0 - 2,10 cm) và số lá (1,57 - 5,30 lá/chồi) có sự gia tăng tỉ lệ thuận với nồng độ KIN (0,5 - 3,0 mg/l) bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Mẫu cây trên môi trường MS có bổ sung KIN ở nồng độ 3,0 mg/l có số chồi hình thành đạt giá trị cao nhất (1,67 chồi/mẫu) và có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại. Sự phát triển của chồi hình thành ở nghiệm thức này cũng đạt giá trị tốt nhất với chiều cao chồi và số lá/chồi lần lượt là 2,10 cm và 5,30 lá/mẫu. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong báo cáo của Trâm và cộng sự (2018), ở nồng độ KIN là 3,0 mg/l cho kết quả hình thành chồi tốt nhất khi nuôi cấy đọt thân cây xạ đen (1,57 chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình đạt 1,37 cm). Tuy nhiên, khi bổ sung KIN với nồng độ cao hơn (3,5 - 5,0 mg/l), các chỉ tiêu theo dõi này có xu hướng giảm dần. Miller cộng sự cho rằng cytokinin tác động đến quá trình hình thành chồi thông qua sự kiểm soát các quá trình tổng hợp một số loại protein [47]. Khi thêm cytokinin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy sẽ làm thay đổi nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh có trong cây, đồng thời thiết lập một khuynh độ nồng độ chất điều hòa sinh trưởng nội sinh mới. Điều này giúp phá vỡ trạng thái ngủ và kích thích sự phát triển chồi

Qua quan sát hình giải phẫu (Hình 3.2a), mẫu đọt thân xạ đen có mang chồi ngủ khi nuôi cấy trong môi trường bổ sung KIN đã kích thích mô phân sinh chồi bên tạo thành sơ khởi chồi sau đó các chồi sơ khởi phát triển và kéo dài, cuối cùng tạo ra thành chồi hoàn chỉnh.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của KIN đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy; **a.** Các nghiệm thức; **b.** Đối chứng MS; **c.** 0,5 mg/l KIN; **d.** 1,0 mg/l KIN; **e.** 1,5 mg/l KIN; **f.** 2,0 mg/l KIN; **g.** 2,5 mg/l KIN; **h.** 3,0mg/l KIN; **i.** 3,5 mg/l KIN; **j.** 4,0 mg/l KIN; **k.** 4,5 mg/l KIN; **l.** 5,0 mg/l KIN.



Hình 3.2. Hình giải phẫu của chồi cây xạ đen *in vitro* dưới kính hiển vi; **a.** Chồi nách hình thành từ đốt thân cây xạ đen được nuôi cấy trong môi trường bổ sung KIN; **b.** Đỉnh sinh trưởng.

3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA BA LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CHỒI CÂY XẠ ĐEN *in vitro*

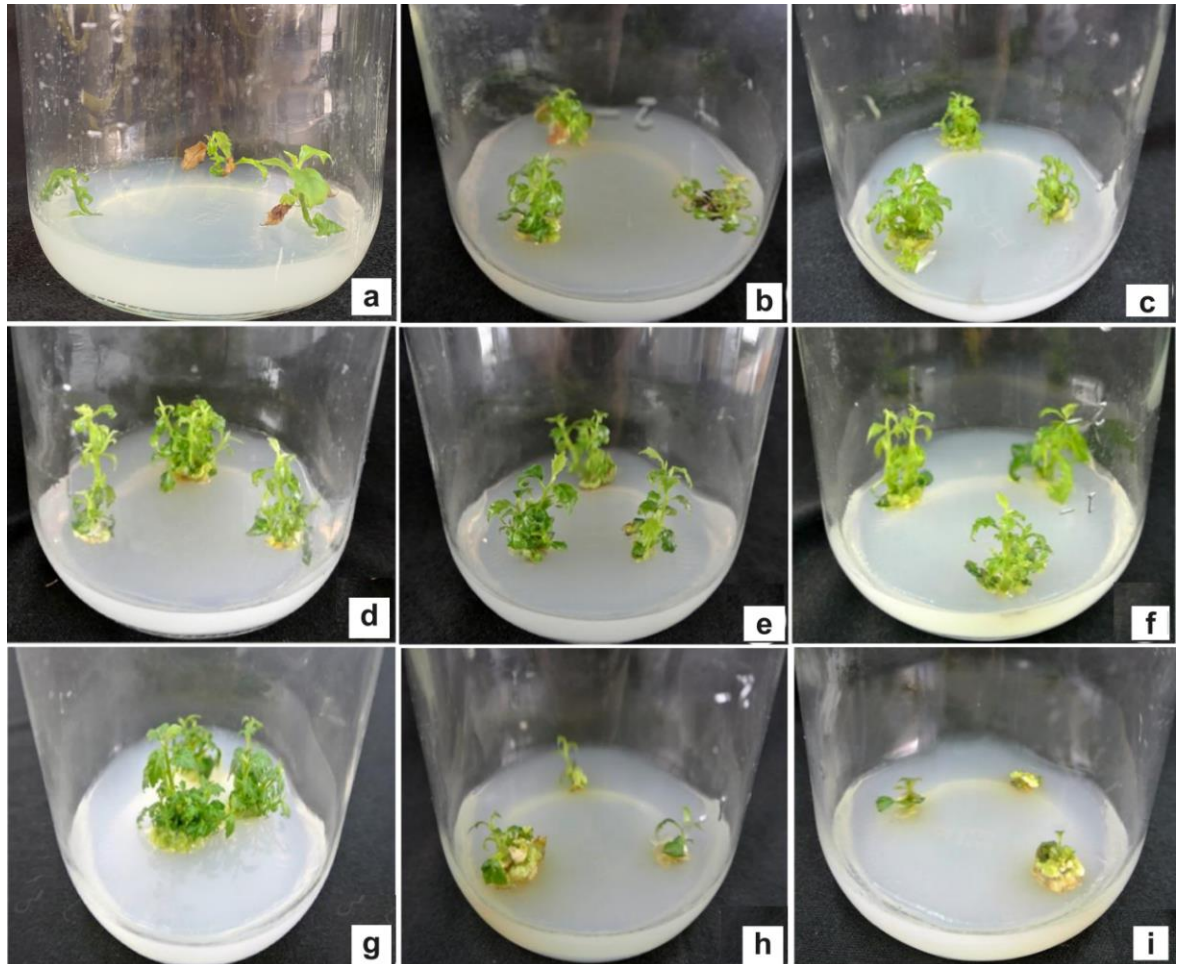
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của BA lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

BA (mg/l)	Số chồi/ mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/ chồi
0	1,20 ± 0,41 ^f	1,43 ± 0,19 ^e	2,86 ± 0,83 ^d
0,5	1,67 ± 0,61 ^{ef}	1,48 ± 0,25 ^{de}	5,40 ± 0,73 ^c
1,0	2,07 ± 0,79 ^e	1,54 ± 0,16 ^{cde}	5,87 ± 0,83 ^{bc}
1,5	3,47 ± 0,91 ^d	1,68 ± 0,17 ^{bcd}	6,13 ± 0,83 ^{bc}
2,0	3,93 ± 0,70 ^{cd}	1,74 ± 0,21 ^{abc}	6,47 ± 0,74 ^{ab}
2,5	4,40 ± 0,91 ^{bc}	1,78 ± 0,15 ^{ab}	6,53 ± 0,83 ^{ab}
3,0	6,27 ± 0,70 ^a	1,89 ± 0,13 ^a	7,40 ± 0,73 ^a
3,5	5,07 ± 0,59 ^b	1,77 ± 0,13 ^{ab}	6,53 ± 0,64 ^{ab}
4,0	3,87 ± 0,74 ^{cd}	1,72 ± 0,13 ^{abc}	6,20 ± 0,77 ^{bc}
P	*	*	*

*Các chữ cái trong cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê theo phương pháp Tukey với $p < 0.05$.

Cytokinin có vai trò trong việc thúc đẩy giải phóng trạng thái ngủ đông và nảy chồi đã được nghiên cứu rộng rãi [48]. Trong vi nhân giống thực vật, BA là cytokinin được sử dụng phổ biến ở giai đoạn hình thành chồi và nhân nhanh chồi [49]. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả được thể hiện ở bảng 3.3 cho thấy mẫu cấy trên các môi trường có bổ sung BA đều có số chồi hình thành (1,67 - 6,27 chồi/mẫu) cao hơn so với mẫu cấy trên môi trường không bổ sung BA (1,20 chồi/mẫu). Ở các nghiệm thức sử dụng BA với nồng độ thấp (1,0 - 3,0 mg/l BA), số chồi hình thành gia tăng cùng với nồng độ BA bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, số chồi hình thành có xu hướng giảm dần trên môi trường có bổ sung BA ở nồng độ cao (3,5 - 4,0 mg/l). Kết quả ghi nhận ở bảng 3.3 cho thấy, số chồi hình thành cao nhất trong nghiệm thức sử dụng 3,0 mg/l BA, với số chồi hình thành đạt 6,27 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình 1,89 cm/chồi và 7,40 lá/mẫu. Posada và cộng sự (1999) cho rằng nồng độ BA từ 3,0 mg/l là nồng độ đáp ứng nhân nhanh chồi tốt nhất các cây vi nhân giống [50]. Trong thí nghiệm này, ở nồng độ 3,0 mg/l BA cho hiệu quả

nhân nhanh chồi tốt nhất. Tương tự, nghiên cứu của Behera và cộng sự (2015) cũng ghi nhận chồi cây *Bacopa monnieri* (L.) *in vitro* sinh trưởng tốt nhất trong môi trường bổ sung 3,0 mg/l BA. Trong số các nồng độ BA khác nhau được thử nghiệm, 3,0 mg/l BA cho kết quả 6,5 chồi/mẫu với chiều dài chồi trung bình là 3,69 cm đã được ghi nhận [51].



Hình 3.3. Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân chồi cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy; **a.** 0 mg/l BA; **b.** 0,5 mg/l BA; **c.** 1,0 mg/l BA; **d.** 1,5 mg/l BA; **e.** 2,0 mg/l BA; **f.** 2,5 mg/l BA; **g.** 3,0 mg/l BA; **h.** 3,5 mg/l BA; **i.** 4,0 mg/l BA.

3.4. ẢNH HƯỞNG CỦA 2-ip LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CHỒI CÂY XẠ ĐEN *in vitro*

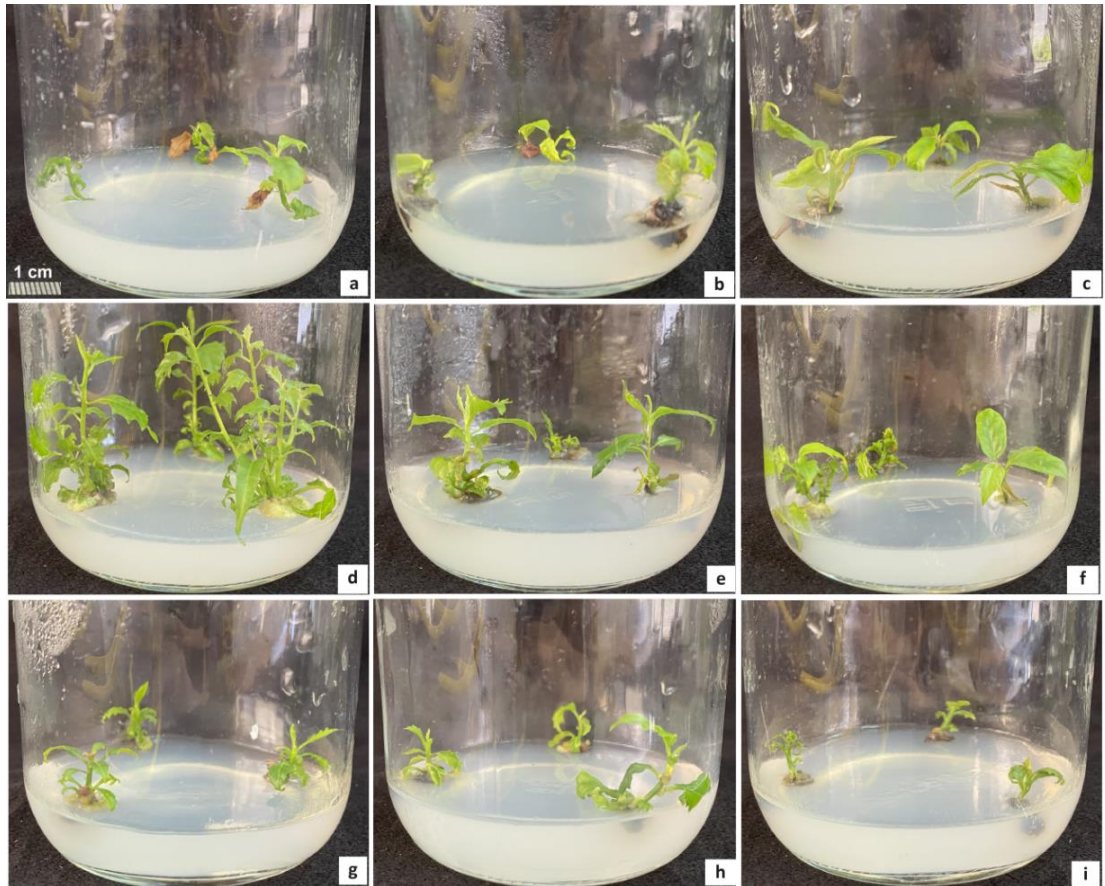
Chất điều hòa sinh trưởng thực vật là thành phần quan trọng của môi trường trong việc xác định con đường phát triển của tế bào thực vật. Cytokinin là một trong những hormone thực vật quan trọng đối với sự tăng trưởng và phát triển của thực vật và được biết đến với tác dụng thúc đẩy sự phân chia và biệt hóa tế bào [52]. Trong số các cytokinin, 2-ip một trong số các loại cytokinin tự nhiên được sử dụng phổ biến có khả năng thúc đẩy sự phân chia tế bào, ảnh hưởng đến sự hình thành và

phân hóa cơ quan, đặc biệt là phân hóa chồi [53]. Nhiều loại cytokinin khác nhau cũng có thể kích thích sự phát triển của chồi bên và từ đó có thể thúc đẩy sự hình thành nhiều chồi bằng cách phá vỡ ưu thế ngọn [54]. Trong thí nghiệm này, mẫu cây chồi cây xạ đen *in vitro* được cấy lên môi trường MS có bổ sung 2-ip với các nồng độ khác nhau nhằm đánh giá ảnh hưởng của nó đối với sự sinh trưởng của chồi cây xạ đen. Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận và trình bày ở bảng 3.4. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt về mặt thống kê ở các chỉ tiêu theo dõi giữa các nghiệm thức sử dụng 2-ip và nghiệm thức đối chứng ($p < 0.5$). Trong đó, mẫu cây trên môi trường có bổ sung 2-ip ở nồng độ 1,5 mg/l có số chồi hình thành (3,20 chồi/mẫu), chiều cao chồi (3,56 cm) và số lá/chồi (4,33 lá/chồi) đều cao hơn so với các nghiệm thức còn lại, tiếp theo là ở nghiệm thức bổ sung 2,0 mg/l 2-ip với số chồi hình thành (3,20 chồi/mẫu), chiều cao chồi (3,56 cm) và số lá/chồi (4,33 lá/chồi). Ở nồng độ 2-ip thấp (0,5 -1,0 mg/l) và nồng độ 2-ip cao (2,5 - 4,0 mg/l), số chồi hình thành và chiều cao chồi ở những nghiệm thức này không có sự khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của 2-ip lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

2-ip (mg/l)	Số chồi/ mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/ chồi
0,0	1,20 ± 0,41 ^c	1,80 ± 0,30 ^b	2,87 ± 0,83 ^b
0,5	1,27 ± 0,45 ^c	1,98 ± 0,36 ^b	3,07 ± 1,10 ^b
1,0	1,27 ± 0,45 ^c	1,92 ± 0,64 ^b	3,40 ± 0,98 ^{ab}
1,5	3,20 ± 0,86 ^a	3,56 ± 0,84 ^a	4,33 ± 0,97 ^a
2,0	2,10 ± 0,91 ^b	1,98 ± 0,45 ^b	3,67 ± 1,04 ^{ab}
2,5	1,80 ± 0,86 ^{bc}	1,92 ± 0,43 ^b	3,27 ± 1,28 ^{ab}
3,0	1,67 ± 0,72 ^{bc}	1,65 ± 0,32 ^b	3,20 ± 1,01 ^{ab}
3,5	1,47 ± 0,83 ^b	1,61 ± 0,56 ^b	3,13 ± 1,06 ^b
4,0	1,20 ± 0,41 ^c	1,55 ± 0,25 ^b	2,60 ± 0,98 ^b
P	*	*	*

*Các chữ cái trong cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê theo phương pháp Tukey với $p < 0.05$.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của 2-ip lên khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy; **a.** 0,0 mg/l 2-ip; **b.** 0,5 mg/l 2-ip; **c.** 1,0 mg/l 2-ip; **d.** 1,5 mg/l 2-ip; **e.** 2,0 mg/l 2-ip; **f.** 2,5 mg/l 2-ip; **g.** 3,0 mg/l 2-ip; **h.** 3,5 mg/l 2-ip; **i.** 4,0 mg/l 2-ip.

2-ip là cytokinin thuộc nhóm base hữu cơ có trọng lượng phân tử lớn. Ở nồng độ thấp, 2-ip có khả năng kích thích quá trình phân chia, biệt hóa tế bào, và đồng thời ức chế hiện tượng ưu thế ngọn và thúc đẩy sự hình thành chồi bên [55]. Với các nồng độ 2-ip khác nhau, có sự thay đổi đáng kể về số chồi, chiều cao chồi và số lượng lá.

Loại và nồng độ của cytokinin ảnh hưởng đáng kể đến quá trình phát triển của chồi (Bảng 3.5). Trong nghiên cứu hiện tại, 1,5 mg/l 2-ip là nồng độ cytokinin có hiệu quả đến khả năng sinh trưởng chồi cây xạ đen *in vitro*.

Quan sát hình thái mẫu nhận thấy, mặc dù BA có tác dụng trong việc kích thích tạo chồi của mẫu cây nhưng không có tác dụng trong việc kéo dài chồi (Hình 3.2). Tất cả các mẫu nuôi cấy trong môi trường bổ sung 3,0 mg/l BA có chiều cao trung bình thấp hơn so với môi trường bổ sung 1,5 mg/l 2-ip ở nghiệm thức tốt nhất (Hình 3.3 và Hình 3.4). Điều này có thể lý giải do sự có mặt của BA đã ức chế hiện tượng ưu thế ngọn, BA chỉ cảm ứng sự hình thành các chồi mới. Trong khi BA chủ

yếu kích thích sự hình thành chồi mới và có thể ức chế sự phát triển của chồi đỉnh, thì 2-ip lại có tác dụng rõ rệt trong việc thúc đẩy sự tăng trưởng về chiều cao của chồi hình thành [56]. Guang-jie và cộng sự đã chỉ ra rằng 2-ip ảnh hưởng đến chiều cao chồi khi nồng độ 2-ip tăng dần [57]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự tương đồng với các nghiên cứu trước đây trên cây *Sterculia urens* Roxb và *Hymenocallis littoralis*, khẳng định rằng 2-ip là một loại cytokinin hiệu quả hơn BA trong việc kích thích kéo dài chồi [58, 54]. Jana và cộng sự (2013) cũng báo cáo rằng, bốn loại cytokinin được nghiên cứu trên *Sophora tonkinensis*, 2-ip cho thấy phản ứng tốt nhất đối với quá trình nhân chồi trong môi trường MS bổ sung 2,0 μmol 2-ip, quá trình tạo đạt chồi tối đa (75%). So với các cytokinin khác đã thử nghiệm, 2-ip cũng cho thấy sự kéo dài chồi cao nhất với chiều dài chồi trung bình là 4,8 cm [59].

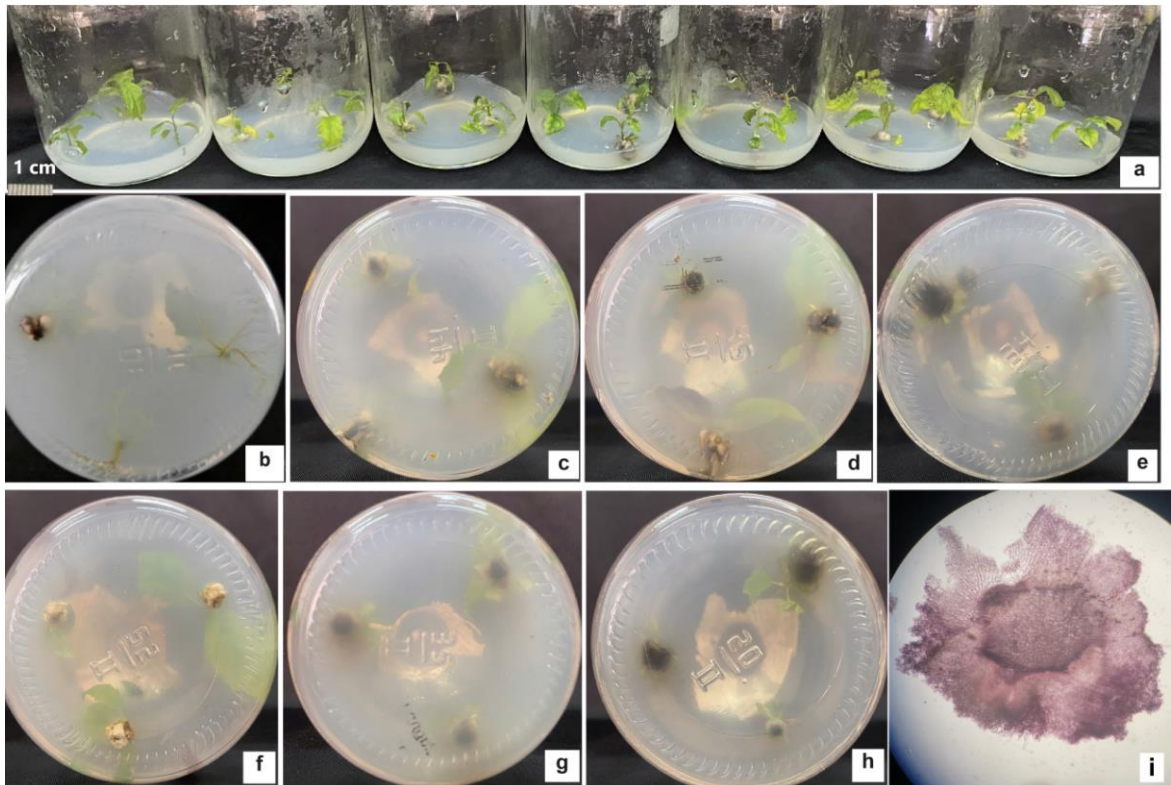
3.5. ẢNH HƯỞNG CỦA NAA ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO RỄ CHỒI CÂY XẠ ĐEN *in vitro*

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

NAA (mg/l)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)	Hình thái mô sẹo
0,0	44,44	55,56	Mô sẹo xộp có màu trắng
0,5	-	100,00	Mô sẹo xộp bờ có màu trắng
1,0	-	100,00	Mô sẹo rắn chắc có màu trắng, màu vàng nâu
1,5	-	100,00	Mô sẹo rắn chắc có màu trắng, màu vàng nâu
2,0	-	100,00	Mô sẹo rắn chắc có màu trắng
2,5	-	100,00	Mô sẹo rắn chắc có màu vàng nâu
3,0	-	100,00	Mô sẹo rắn chắc có màu vàng nâu

Quá trình ra rễ *in vitro* chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như thành phần môi trường nuôi cấy đặc biệt là loại và nồng độ của các CĐHSTTV [60, 61, 62]. Auxin đóng vai trò quan trọng đối với việc cảm ứng và kéo dài rễ, bao gồm quá trình hình thành rễ bất định, vì nó thúc đẩy sự phân chia tế bào và có khả năng kiểm soát sự kéo dài rễ [63]. Trong một số nghiên cứu trước đây cho thấy auxin, bao gồm IAA, IBA và NAA, đã thúc đẩy sự hình thành và phát triển của rễ bất định của cây *Chrysanthemum morifolium* và *Mentha piperita* L. [64, 65]; tuy nhiên, tác động cụ thể ở các loài thực vật là khác nhau do sự khác biệt về ái lực của các thụ thể auxin liên quan đến sự hình thành rễ [66]. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu này, quá

trình cảm ứng và phát triển rễ của chồi xạ đen *in vitro* có sự khác biệt giữa nghiệm thức sử dụng NAA và IBA.



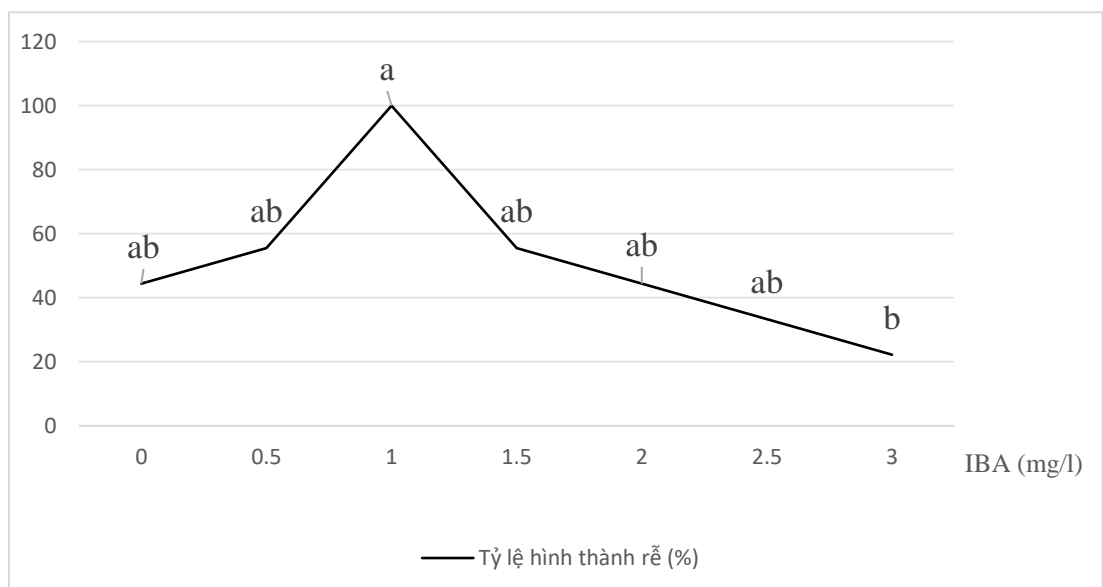
Hình 3.5. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy; **a.** Các nghiệm thức; **b.** Đối chứng MS; **c.** 0,5 mg/l NAA; **d.** 1,0 mg/l NAA; **e.** 1,5 mg/l NAA; **f.** 2,0 mg/l NAA; **g.** 2,5 mg/l NAA; **h.** 3,0 mg/l NAA; **i.** Hình thái giải phẫu của mẫu mô sẹo cảm ứng trong môi trường bổ sung NAA dưới kính hiển vi.

Đối với nghiệm thức sử dụng NAA, kết quả thu được sau 4 tuần cho thấy ở tất cả các nghiệm thức sử dụng NAA, hầu hết các mẫu chồi đều không có sự hình thành rễ. Ngoài ra, các chồi nuôi cấy ở môi trường này đều có sự hình thành mô sẹo ở phần vết cắt của chồi. Sự hình thành mô sẹo ở phần gốc đã ức chế quá trình tạo rễ của chồi xạ đen ở môi trường bổ sung NAA. Theo Thimann (1937), auxin chỉ có tác dụng kích thích khi nồng độ của nó đạt mức tối ưu trong mẫu thực vật, trong khi ở nồng độ cao, nó lại ức chế sự hình thành rễ [67]. Ở thực vật, chồi và lá non là những cơ quan chủ yếu tổng hợp auxin [68]. Trong nghiên cứu này, đoạn chồi đỉnh của *E. asperula* mang các cặp lá non, do đó chồi vẫn có khả năng tự tổng hợp auxin nội sinh. Việc bổ sung thêm auxin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy giúp tăng cường khả năng hình thành rễ cho mẫu nuôi cấy, nhưng ở nồng độ cao lại kích thích sự hình thành mô sẹo. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Shahriyar và cộng sự (2015), việc bổ sung NAA đã làm giảm tỷ lệ ra rễ, chiều dài rễ [69].

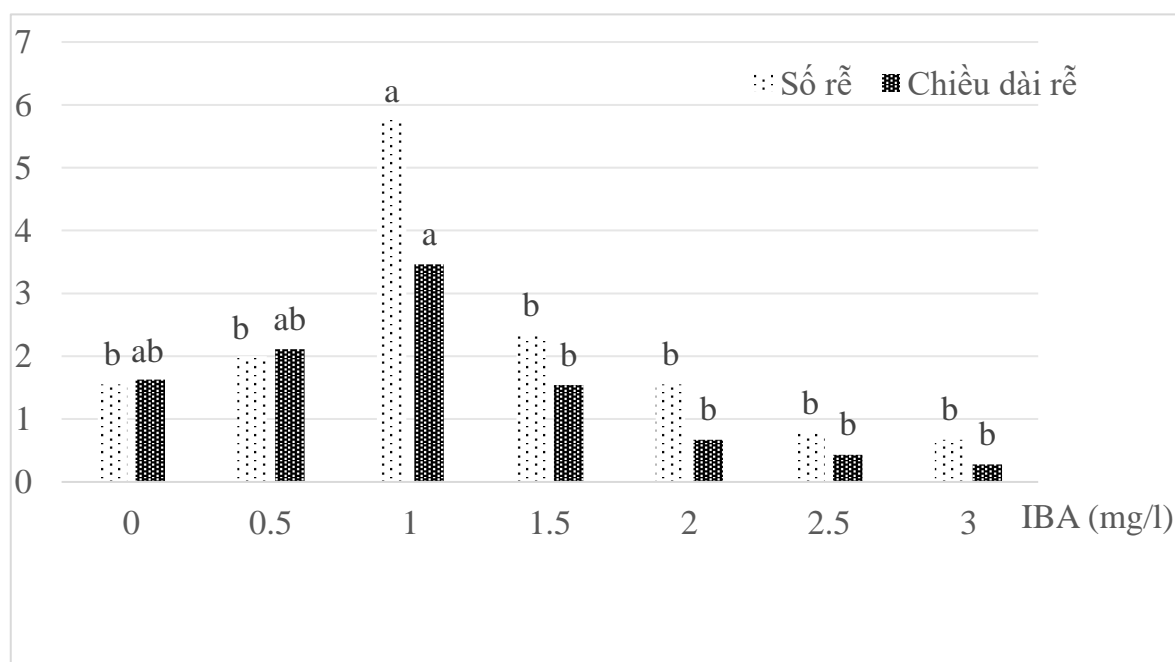
Qua quan sát hình 3.5 mẫu chồi xạ đen nuôi cấy trong môi trường bổ sung NAA, có hình thành mô sẹo ở phần gốc chồi là mô sẹo cứng ức chế quá trình hình thành rễ ở chồi cây xạ đen *in vitro*. Quan sát hình giải phẫu mô sẹo ở phần gốc của chồi không quan sát được sự hình thành rễ sơ khởi (Hình 3.5i).

3.6. ẢNH HƯỞNG CỦA IBA ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO RỄ CHỒI CÂY XẠ ĐEN *in vitro*

Trong các nghiệm thức sử dụng IBA, các mẫu chồi xạ đen nuôi cấy trong môi trường bổ sung IBA đều có sự hình thành rễ sau 4 tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu sinh trưởng của rễ thay đổi phụ thuộc vào sự thay đổi của nồng độ IBA ($p < 0.05$, Hình 3.6 và 3.7). Tỷ lệ hình thành rễ (100%), số rễ hình thành (5,77 rễ/mẫu) chiều dài rễ trung bình (3,47 cm) ở mẫu cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l IBA cao hơn so với các nghiệm thức sử dụng IBA còn lại và nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, khi nồng độ IBA tăng lên, từ 1,5 – 3,0 mg/l, đã ức chế quá trình hình thành rễ, tỉ lệ mẫu tạo rễ giảm xuống (22,22 – 55,56%) và số rễ tạo thành giảm từ 2,33 – 0,67 rễ/mẫu. Alsemaan (2013) báo cáo rằng tỷ lệ mẫu ra rễ đạt 83% khi các chồi được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,0 mg/l IBA, ở nồng độ IBA cao hơn, chất lượng rễ thấp hơn và số lượng rễ hình thành ít hơn [70]. Việc sử dụng các auxin ngoại sinh trong nuôi cấy mô tế bào thực vật đã làm thay đổi hàm lượng các auxin nội sinh trong thực vật, dẫn đến sự thay đổi trong quá trình cảm ứng và phát triển rễ [71]. Theo Justamante và cộng sự (2019), auxin là một trong những hormone nội sinh chính tham gia vào quá trình ra rễ bất định và các giai đoạn sinh lý của quá trình ra rễ có tương quan với những thay đổi về nồng độ auxin nội sinh [72]. Một số nghiên cứu trước đó đã cho IBA hiệu quả trong việc tái sinh rễ ở một số loài cây như *Prunus dulcis* Mill, *Bougainvillea glabra* 'New River', *M. officinalis*. [73, 74,75].



Hình 3.6. Ảnh hưởng của IBA đến tỷ lệ hình thành rễ của mẫu cây chồi cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

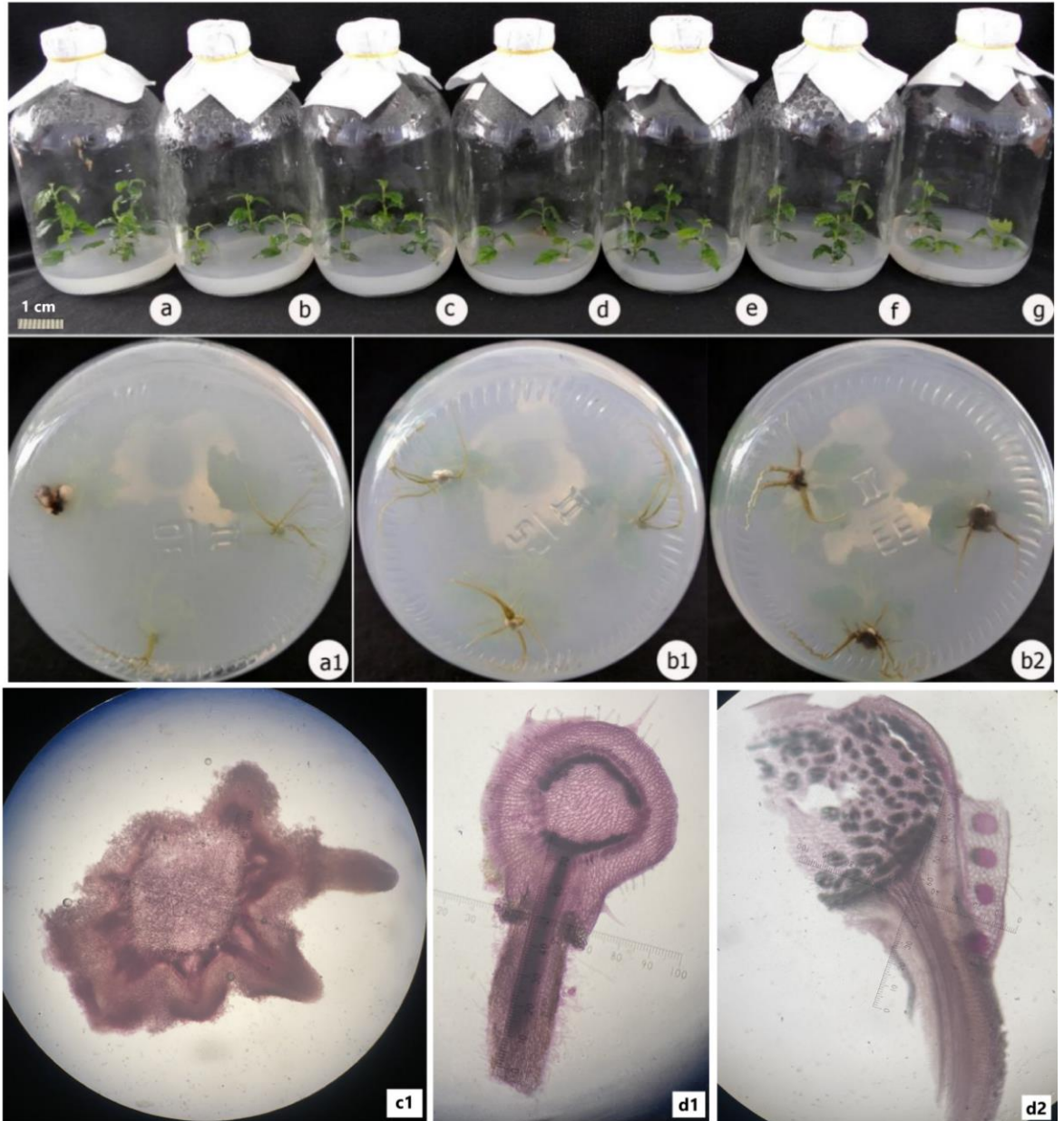


Hình 3.7. Ảnh hưởng của IBA đến số rễ và chiều dài rễ của mẫu cây chồi cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

Khi so sánh hiệu quả tạo rễ của hai loại auxin NAA và IBA trên cây xạ đen *in vitro*, kết quả cho thấy IBA có hiệu quả rõ rệt trong việc tạo rễ. Tương tự với kết quả của nghiên cứu này, Karhu (1997) thực hiện nghiên cứu tạo rễ trên *Lonicera carerulea*, kết quả cũng cho thấy NAA kém hiệu quả hơn IBA trong suốt giai đoạn ra rễ [76]. Deng và cộng sự (2015) cũng chỉ ra rằng, trong số ba loại auxin được sử dụng, IBA cho thấy phản ứng tích cực hơn về sự ra rễ của chồi cây *M. officinalis* so với NAA. Đặc biệt trong trường hợp IBA, 100% chồi ra rễ mà không hình thành mô sẹo trung gian [77]. Khan và cộng sự (2004) đã báo cáo rằng môi trường bổ sung IBA cho kết quả cảm ứng hình thành rễ tốt nhất với số lượng rễ tối đa trên mỗi cây dứa *Ananas comosus in vitro* [78]. Sự hình thành rễ từ các chồi nuôi cấy *in vitro* đóng vai trò quan trọng trong quá trình nhân giống. Giai đoạn này quyết định đến tỷ lệ sống sót của cây con ngoài vườn ươm. Do đó, việc xác định loại và nồng độ auxin đóng một vai trò quan trọng trong nghiên cứu về nhân giống cây xạ đen này.

Khi quan sát hình 3.8, môi trường bổ sung IBA kích thích quá trình hình thành mô sẹo ở gốc chồi xạ đen. Tuy nhiên, mô sẹo này có đặc điểm xốp, bở và phát triển

từ thân cây do đó không ảnh hưởng đến quá trình ra rễ. Quan sát hình giải phẫu, mẫu mô sẹo được hình thành trong môi trường bổ sung IBA có hình thành rễ sơ khởi (Hình 3.8 c1) sau đó phát triển kéo dài rễ và hình thành bộ rễ hoàn chỉnh.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ cây xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy; a. Đối chứng MS; b. 0,5 mg/l IBA; c. 1,0 mg/l IBA; d. 1,5 mg/l IBA; e. 2,0 mg/l IBA; f. 2,5 mg/l IBA; g. 3,0 mg/l IBA; a1. rễ mẫu đối chứng; b1. rễ mẫu cảm ứng IBA; b2. rễ mẫu hình thành thông qua mô sẹo; Hình thái giải phẫu của mẫu rễ cây xạ đen *in vitro* dưới kính hiển vi; c1. Mẫu rễ hình thành từ mô sẹo trong môi trường bổ sung IBA; d1, d2. Mẫu rễ hình thành từ thân trong môi trường bổ sung IBA.

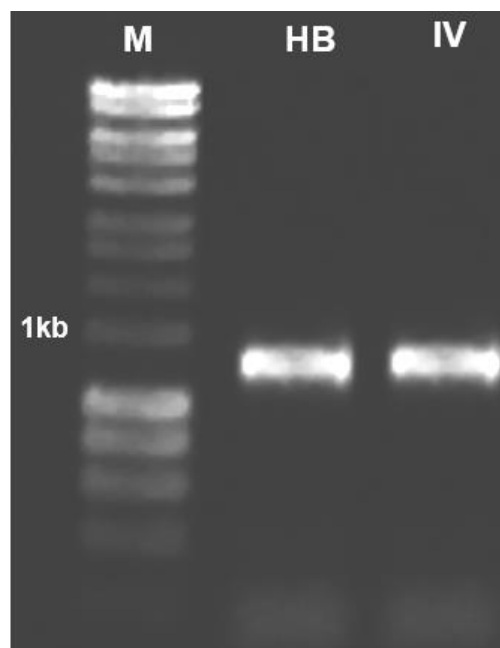
3.7. ĐỊNH LƯỢNG RA TRONG MẪU CÂY XẠ ĐEN *in vitro*

Kết quả thu được ở bảng 3.6 cho thấy mẫu *in vitro* có tích lũy RA. Hàm lượng RA trong mẫu lá *in vitro* được lấy mẫu vào cuối giai đoạn nhân giống, có nồng độ RA 5,186 mcg/ml và hàm lượng RA ở mức 0,019%. Tuy nhiên, nồng độ RA trong mẫu lá *ex vitro* cao hơn đáng kể (14.126 mcg/ml) và hàm lượng RA chiếm tỷ lệ cao hơn (0.700%). Điều này có thể được giải thích, mẫu *in vitro* được hình thành và nuôi cấy trong thời gian ngắn, nên hàm lượng RA tích lũy thấp hơn so với mẫu bên ngoài tự nhiên được nuôi trồng với thời gian dài. Trong nghiên cứu của Dreger và cộng sự (2020), kết quả cho thấy hàm lượng RA của cây liễu gai (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub) tích lũy trong chồi *in vitro* (0,63 mg 100 g⁻¹ DW) thấp hơn so với hàm lượng trong cây con tái sinh (0.77 mg 100 g⁻¹ DW) [79].

Bảng 3.6. Hàm lượng RA trong các mẫu xạ đen

Tên mẫu	Nồng độ (mcg/ml)	Hàm lượng RA (%)
Lá xạ đen <i>ex vitro</i>	14,126 ± 1,393 ^a	0,700 ± 0,067 ^a
Lá xạ đen <i>in vitro</i>	5,186 ± 0,145 ^b	0,019 ± 0,000 ^b

3.8. ĐÁNH GIÁ ỔN ĐỊNH DI TRUYỀN CỦA CÂY XẠ ĐEN



Hình 3.9. Kết quả PCR của vùng DNA barcode ITS trên gel agarose 1,2%; M: 1 kb marker; IV: sản phẩm PCR của mẫu xạ đen Hòa Bình *in vitro*; HB1: sản phẩm PCR của mẫu xạ đen Hòa Bình *ex vitro*.

Kết quả PCR - ITS tiến hành giải trình tự theo phương pháp Sanger, dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Mega 11 để tính toán khoảng cách di truyền giữa các loài *Ehretia* và được thể hiện ở bảng 3.8.

Khoảng cách di truyền phản ánh mối quan hệ di truyền giữa các đối tượng nghiên cứu: khoảng cách di truyền càng thấp thì cặp đối tượng càng gần gũi về mặt tiến hóa và ngược lại. Kết quả ở bảng 3.8 cho thấy E1 và E2 có hệ số khoảng cách di truyền thấp nhất: 0,00; tiếp theo đó khoảng cách di truyền của E2 và E3 là 0,00; E1 và E3 là 0,00. Từ đó có thể thấy, E1 và E2 gần gũi về mặt tiến hóa và mối quan hệ di truyền với E3.

Với chỉ thị ITS đã cho thấy sự sai khác giữa các loài *Ehretia* ở mức độ phân tử ADN, từ đó đã xây dựng được cây phân loài (Hình 3.11) bằng phần mềm Mega 11.

Vùng DNA ITS được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi tương ứng (Bảng 2.3) và các sản phẩm thu được có chiều dài là 848 bp (Hình 3.8). ITS là trình tự trong nhân từ đầu 3' của 18S đến đầu 5' của 26S. Trong nghiên cứu này đã sử dụng một phần ITS-ITS1 để tính toán phát sinh loài của các loài *Ehretia*. Trình tự DNA của vùng DNA- ITS đã được gửi trên GenBank với số ID lần lượt là PQ237098 và PQ237099.

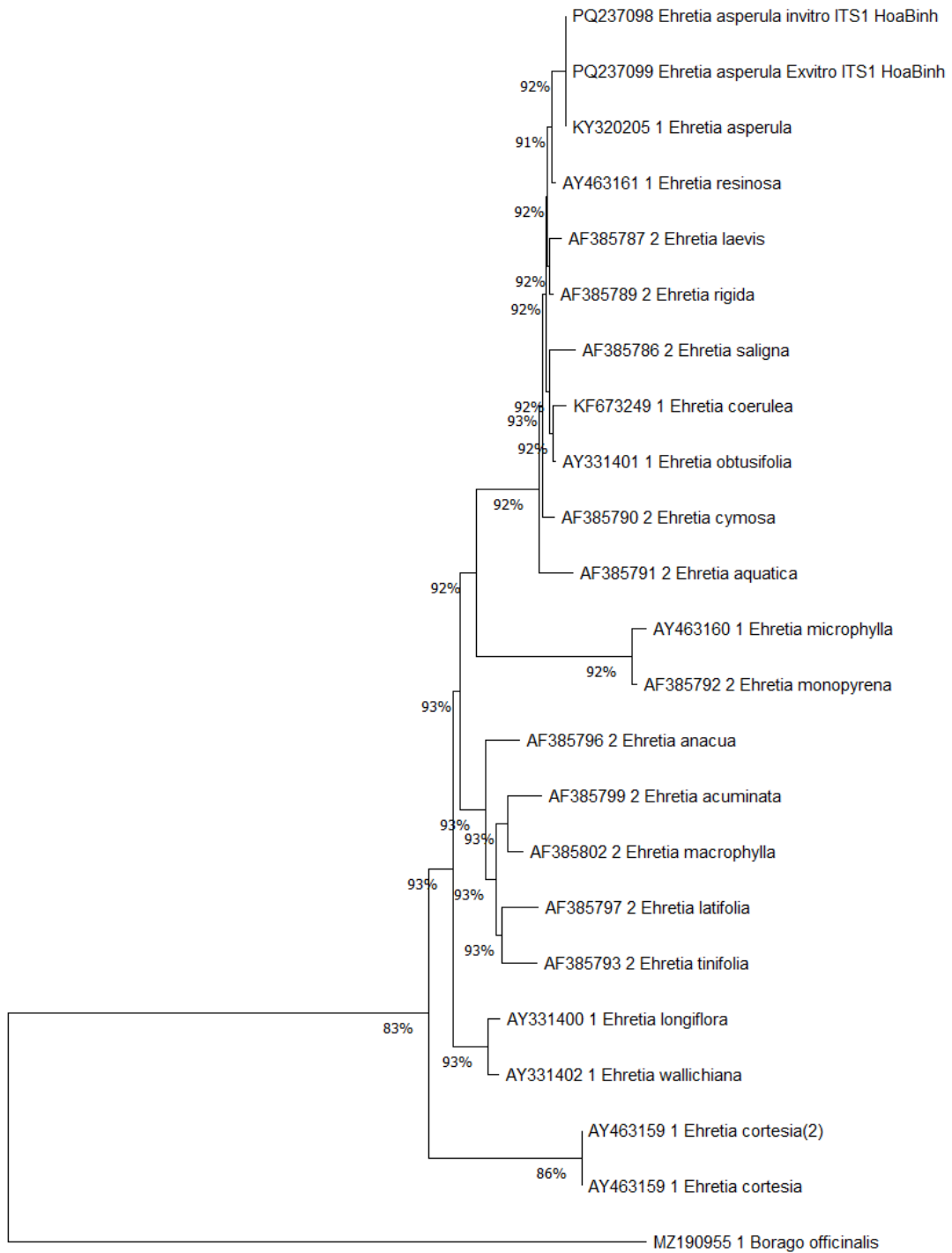
Cây phát sinh loài với các giá trị hỗ trợ bootstrap của DNA marker ITS được biểu thị trong hình 3.10. Dựa trên hình 3.10 và hình 3.11, mẫu xạ đen *in vitro* và *ex vitro* đều có sự đồng nhất về khoảng cách di truyền và gần như tương đồng với nhau về mặt di truyền. So sánh với các trình tự tham chiếu vùng ITS của các loài *Ehretia* trên NCBI, nhận thấy các mẫu nghiên cứu có trình tự vùng ITS tương đồng với *E. asperula* với tỷ lệ bootstrap 100% cho thấy kết quả này có độ tin cậy cao. Kết quả từ cây phát sinh loài và khoảng cách di truyền có thể kết luận rằng các mẫu nghiên cứu có cùng nguồn gốc với *E. asperula*.

Dựa trên vùng ITS (Hình 3.11), mối quan hệ phát sinh loài của chi *Ehretia* có khác biệt so với nghiên cứu trước đây [40], trong đó được chia thành 4 nhóm chính. Các loài thuộc cùng 1 nhánh có sự khác biệt so với nghiên cứu của Nguyen và cộng sự (2017) [40]. Tuy nhiên, chỉ số bootstrap ở các nhánh khá cao và *E. resionsa* là họ hàng gần của các mẫu trong nghiên cứu và *E. asperula* với chỉ số bootstrap cao 92%. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyen và cộng sự (2017), *E. resionsa* là họ hàng gần của *E. asperula* [40]. Theo nghiên cứu của Moudi và Go (2015), vùng gen ITS có khả năng phân loại các loài có quan hệ gần một cách cụ thể và rõ nét với các vùng gen khác [80]. Qua đó có thể kết luận, các mẫu trong nghiên cứu này là cây xạ đen *in vitro* và *ex vitro* có cùng nguồn gốc

với *E. asperula*. Cây xạ đen trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, trình tự vùng ITS không làm biến đổi nhiều so với trình tự ban đầu và tương đồng với cây ngoài tự nhiên và loài *E. asperula*.

Bảng 3.7. Khoảng cách di truyền giữa 19 loài *Ehretia* dựa vào chỉ thị ITS

	B1	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E2 1	E 2 2
B1																							
E1	1.27																						
E2	1.27	0.00																					
E3	1.27	0.00	0.00																				
E4	1.30	0.21	0.21	0.20																			
E5	1.20	0.18	0.18	0.19	0.09																		
E6	1.28	0.07	0.07	0.07	0.19	0.19																	
E7	1.29	0.31	0.31	0.30	0.26	0.25	0.33																
E8	1.29	0.31	0.31	0.30	0.26	0.25	0.33	0.00															
E9	1.28	0.05	0.05	0.05	0.21	0.18	0.07	0.32	0.32														
E10	1.27	0.04	0.04	0.04	0.18	0.16	0.05	0.30	0.30	0.04													
E11	1.23	0.04	0.04	0.04	0.19	0.17	0.06	0.31	0.31	0.03	0.04												
E12	1.24	0.21	0.21	0.20	0.08	0.09	0.20	0.30	0.30	0.21	0.18	0.19											
E13	1.19	0.17	0.17	0.17	0.16	0.13	0.18	0.24	0.24	0.17	0.16	0.16	0.13										
E14	1.26	0.03	0.03	0.03	0.20	0.18	0.07	0.31	0.31	0.02	0.02	0.03	0.20	0.17									
E15	1.23	0.19	0.19	0.18	0.05	0.08	0.18	0.26	0.26	0.19	0.16	0.17	0.07	0.14	0.18								
E16	1.39	0.27	0.27	0.26	0.29	0.25	0.29	0.35	0.35	0.30	0.27	0.28	0.29	0.28	0.27	0.26							
E17	1.40	0.27	0.27	0.26	0.28	0.24	0.28	0.33	0.33	0.28	0.26	0.26	0.28	0.27	0.26	0.24	0.02						
E18	1.25	0.02	0.02	0.02	0.18	0.16	0.05	0.31	0.31	0.04	0.03	0.03	0.19	0.15	0.03	0.16	0.26	0.26					
E19	1.26	0.03	0.03	0.03	0.19	0.17	0.05	0.31	0.31	0.03	0.03	0.02	0.19	0.16	0.02	0.17	0.27	0.26	0.02				
E20	1.29	0.05	0.05	0.05	0.21	0.19	0.08	0.32	0.32	0.05	0.05	0.05	0.21	0.19	0.04	0.19	0.28	0.27	0.04	0.04			
E21	1.20	0.20	0.20	0.20	0.09	0.11	0.19	0.28	0.28	0.21	0.18	0.19	0.08	0.15	0.20	0.09	0.28	0.27	0.19	0.19	0.21		
E22	1.19	0.16	0.16	0.16	0.17	0.14	0.17	0.26	0.26	0.16	0.16	0.15	0.13	0.03	0.16	0.14	0.28	0.27	0.15	0.16	0.18	0.	



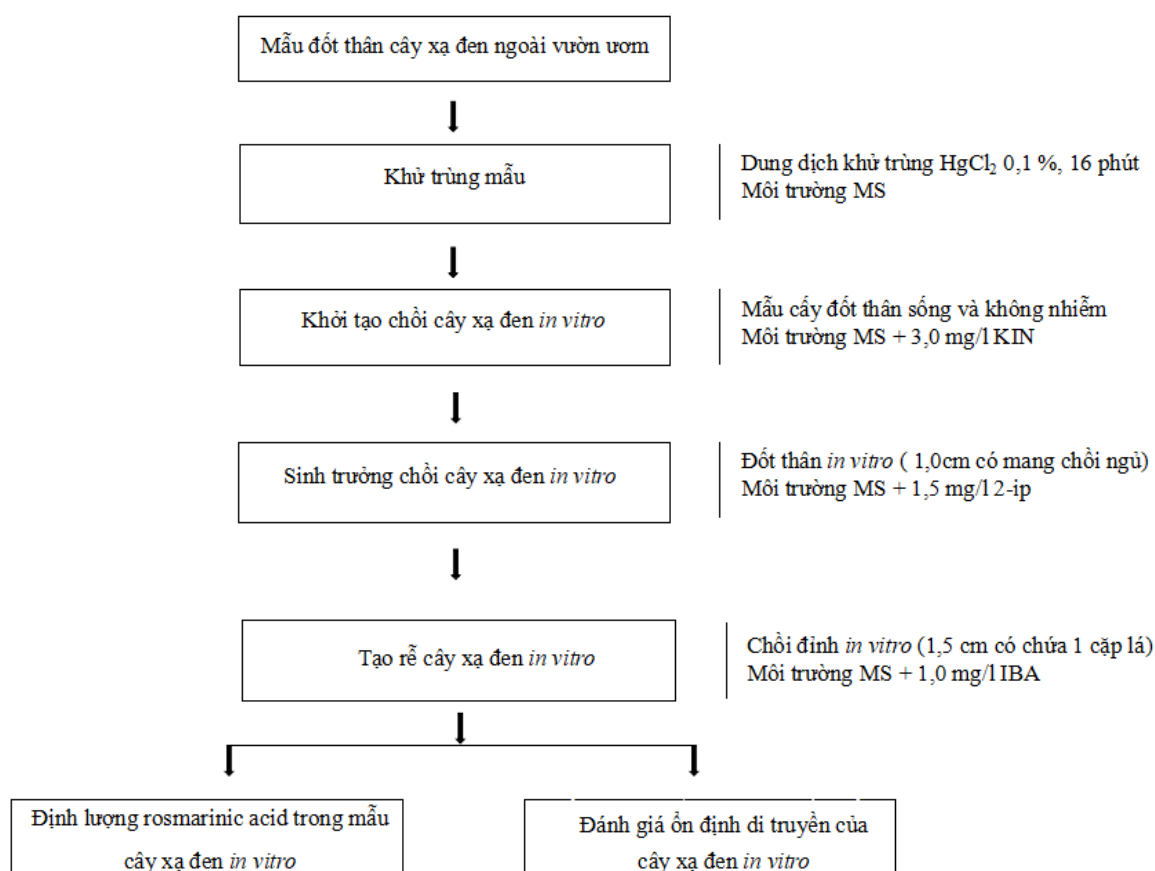
Hình 3.11. Cây phát sinh loài của cây xạ đen *in vitro* và *ex vitro* dựa trên trình tự ITS của trình tự nghiên cứu và các trình tự tham chiếu trên NCBI.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy, chế độ khử trùng đốt thân cây xạ đen bằng dung dịch HgCl₂ 1% trong 16 phút là cho hiệu quả khử trùng tốt nhất. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l 2-ip được xác định là môi trường tối ưu cho quá trình nhân chồi, trong khi môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l IBA thúc đẩy sự hình thành rễ cây xạ đen *in vitro*. Cây xạ đen nuôi cấy *in vitro* duy trì sự tích lũy RA và trình tự vùng ITS của chúng không có nhiều biến đổi so với cây bên ngoài vườn ươm.

Quy trình nhân giống cây xạ đen được đề xuất từ các kết quả nghiên cứu:



Hình 3.12. Quy trình nhân giống cây xạ đen

KIẾN NGHỊ

Qua kết quả thu được từ nghiên cứu này, một số kiến nghị được đề xuất như sau:

- Xây dựng một quy trình nuôi trồng cây xạ đen *in vitro* ngoài vườn ươm hoàn chỉnh.

- Khảo sát ảnh hưởng của các loại và nồng độ auxin, cytokinin khác nhau đến quá trình nhân chồi và tạo rễ sẽ giúp tối ưu hóa quy trình nuôi cấy.

- Nghiên cứu các yếu tố môi trường như ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm... tác động đến khả năng sống sót của cây con khi đưa ra ngoài *ex vitro* để nâng cao hiệu quả của quy trình nhân giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Quỳnh Hoa, Trần Công Khánh, 2009, Đặc điểm thực vật của ba loại cây thuốc thuộc chi Cờm rưng (*Ehretia* P. BR.), họ Vòi voi (Boraginaceae), *Tạp chí Dược liệu*, 14(3), tr. 137-141.
2. Huang H.C., Shen C.C., Chen C.F., Wu Y.C., Kuo Y.H., 2000, A novel agarofuran sesquiterpene, celahin D from *Celastrus hindsii* Benth, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48, pp. 1079-1080.
3. Kuo Y.H., Chou C.J., Yang-Kuo L.M., Hu Y.Y., Chen Y.C., Chen C.F., Lee K.H., 1996, A sesquiterpene ester from *Celastrus hindsii*, *Phytochemistry*, 41, pp. 549-551.
4. Kuo Y.H., Chen C.F., Yang-Kuo L.M., 1995, Celahinine A, a new sesquiterpene pyridine alkaloid from *Celastrus hindsii*, *Journal of Natural Product*, 58, pp. 1735-1738.
5. Ly T.N., Shimoyamada M., Yamauchi R., 2006, Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 3786-3793.
6. Luo D., Xiong S., Li Q.G., Jiang L., Niu Q.W., He L.J., Li Y.L., Zhang Y.B., Wang G.C., 2018, Terpenoids from the stems of *Celastrus hindsii* and their anti-RSV activities, *Fitoterapia*, 130, pp. 118-124.
7. Kuo Y.H., Yang-Kuo L.M., 1997, Antitumour and anti-AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, 44, pp.1275-1281.
8. Nguyễn Thị Vân Khanh, Triệu Duy Diệt, Nguyễn Văn Minh, Vũ Bình Dương, Nguyễn Tuấn Quang, Lương Quang Anh, Phạm Quốc Long, 2007, Kết quả ban đầu về nghiên cứu cấu trúc hóa học của chất phân lập từ cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.), *Hội nghị Khoa học và Công nghệ hóa hữu cơ toàn quốc lần thứ IV*, tr. 422-425.
9. Ly T.N., Shimoyamada M., Yamauchi R., 2006, Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth. leaves and their antioxidative activity, *Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), pp. 3786-3793.
10. Tuan T.T., Loan N.T.K., Thuy P.T.T., Hang N.T.T., Trang N.T.H., Thao N.V.T., Giap D.D., Giang N.T., Ho N.H., 2016, Quanlitative rosmarinic acid content in *ex vitro* plant and initial micropropagation of *Celastrus hindsii*, *Vietnamese Journal of Biotechnology*, 14, pp. 283-290.

11. Ly T.N., 2016, Separation process of rosmarinic acid and their derivatives from *Celastrus hindsii* Benth. leaves, *Journal of Science and Technology*, 54(2), pp. 380-387.
12. Le T.T., Kang T.K., Do H.T., Nghiem T.D., Lee W.B., Jung S.H., 2021, Protection against oxidative stress-induced retinal cell death by compounds isolated from *Ehretia asperula*, *Natural Product Communications*, 16(12), pp. 1-7.
13. Petersen M., Abdullah Y., Benner J., Eberle D., Gehlen K., Hücheri S., Janiak V., Kim K.H., Sander M., Weitzel C., Wolters S., 2009, Evolution of rosmarinic acid biosynthesis, *Phytochemistry*, 70, pp. 1663-1679.
14. Al-Khayri J.M., Naik P.M., 2010, Elicitor-induced production of biomass and pharmaceutical phenolic compounds in cell suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), *Molecules*, 25, pp. 4669-4679.
15. Öztürk M., Duru M.E., Ince B., Harmandar M. and Topçu G. (2010). A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts, *Food Chem*, 123, 1352-1356
16. Trần Thị Mỹ Trâm, Trịnh Thị Hương, Lê Quỳnh Loan, Nguyễn Hoàng Dũng, Trần Trọng Tuấn, 2018, Khảo sát sự sinh trưởng, khả năng kháng oxy hóa và hàm lượng phenolic của cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) *in vitro* dưới tác động của đèn LED, *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 16 (1), tr. 38-48.
17. Lê Thị Tâm Hồng, Lê Thị Thủy Tiên, Trần Văn Minh, 2019, Nuôi cấy *in vitro* đọt thân cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 61 (5), tr. 26-30.
18. Phạm Thị Mỹ Trâm, Ngô Kế Sương, Lê Thị Thủy Tiên, 2020, Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến quá trình nuôi cấy tế bào xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.), *Tạp chí Khoa học - Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 129 (1A), tr. 31-41.
19. Võ Thị Bạch Mai, 2004, Sự Phát Triển Chồi và Rễ, Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia, Tp. Hồ Chí Minh.
20. Nhut D.T., Teixeira da Silva J.A., Aswath C.R., 2003, The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology, *In vitro Cellular & Developmental Biology -Plant*, 39, pp. 266-276.
21. Christianson M.L., Warnick D.A., 1984, Phenocritical times in the process of *in vitro* shoot organogenesis, *Developmental Biology*, 101, pp. 382-390.
22. Broertjes C., Roest S., Bokelmann Euratom G.S., 1976, Mutation breeding of *chrysanthemum morifolium* RAM. Using *in vitro* and *in vitro* adventitious bud techniques, *Euphytica*, 25, pp. 11-19.

23. Norris R.E., Smith R.H., Vaughn K.C., 1983, Plant chimeras used to establish de novo origin of shoots, *Science*, 220, pp. 75-76.
24. Attfeld E.M., Evans P.K., 1991, Stages in the initiation of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc., *Journal of Experimental Botany* Volume, 42(1), pp. 59-63.
25. Jasmina K., Timothy E.S., and Jan A.S., 2019, Antagonistic activity of auxin and cytokinin in shoot and root organs, *American Society of Plant Biologist*, 3(2), pp 1-9.
26. Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J., 2015, The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development, *Plant Cell*, 27, pp. 44-63.
27. Besnard F., Refahi Y., Morin V., Marteaux B., Brunoud G., Chambrier P., Rozier F., Mirabet V., Legrand J., Lainé S., Thévenon E., Farcot E., Cellier C., Das P., Bishopp A., Dumas A., Parcy F., Helariutta Y., Boudaoud A., Godin C., Traas J., Guédon Y., Vernoux T., 2014, Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis, *Nature*, 505, pp. 417-421.
28. Bishopp A., Help H., El-Showk S., Weijers D., Scheres B., Friml J., Bishopp A., Help H., El-Showk S., Weijers D., Scheres B., Friml J., Benková E., Mähönen A.P., Helariutta Y., 2011, A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots, *Current Biology*, 21, pp. 917-926.
29. Chickarmane V.S., Gordon S.P., Tarr P.T., Heisler M.G., Meyerowitz, E.M., 2012, Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, pp. 4002-4007.
30. Dello I.R., Nakamura K., Moubayidin L., Perilli S., Taniguchi M., Morita M. T., Aoyama T., Costantino P., Sabatini S., 2008, A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322, pp. 1380-1384.
31. Truskina J., Vernoux T., 2018, The growth of a stable stationary structure: Coordinating cell behavior and patterning at the shoot apical meristem, *Current Opinion in Plant Biology*, 41, pp. 83-88.
32. Bar M., Ori N., 2014, Leaf development and morphogenesis, *Development*, 141, pp. 4219-4230.
33. Laskowski M., Ten Tusscher K.H., 2017, Periodic lateral root priming: What makes it tick?, *The Plant Cell*, 29, pp. 432-444.
34. Aloni R., Aloni E., Langhans M., Ullrich C.I., 2006, Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root

initiation, root apical dominance and root gravitropism, *Annals of botany*, 97(5), pp. 883-893.

35. Aloni R., 2004, The induction of vascular tissue by auxin, In 'Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!' (Ed. PJ Davies), pp. 471- 492.

36. Aloni R., Langhans M., Aloni E., Dreieicher E., Ullrich C.I., 2005, Root-synthesized cytokinin in Arabidopsis is distributed in the shoot by the transpiration stream, *Journal of Experimental Botany*, 56, pp. 1535-1544.

37. Murashige T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, pp. 473-497.

38. Couto R.O., Conceicao E.C., Chaul L.T., Oliveira E.M., Alves S.F., 2011, Rezende K.R., Maria T.F.B., Paula J.R., 2011, Validated HPLC-PDA method for rosmarinic acid quantification in rosemary, *Latin American Journal of Pharmacy*, 30(10), pp. 1951-6.

39. Doyle J.J., Doyle J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, 19, pp. 11-15.

40. Nguyen T.L., Pham T.H., Huynh T.T.H., 2017, Evaluating the systematic position of *Ehretia asperula* Zoll. & Moritzi based on ITS1, matK and trnL-trnF DNA sequences, *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 59(4), pp. 61-65.

41. Ankita K., Handique P.J., 2010, Standardization of sterilization techniques prior to *in vitro* propagation of *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees; *Asian Journal of Science and Technology*, 6, pp. 119-122.

42. Agrios G.N., 2005, *Plant Pathology*, Netherlands: Elsevier Science.

43. Razdan M.K., 2002, An introduction to plant tissue culture, Oxford and IBH publishing.

44. Liu Z., Lee C., Wakeham S.G., 2006, Effects of mercuric chloride and protease inhibitors on degradation of particulate organic matter from the diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Organic Geochemistry*, 37(9), pp. 1003-1018.

45. Davies P.J., 1995, The plant hormones: their nature, occurrence, and functions, In: *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*, pp. 1-12.

46. Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M., 1955, Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid¹, *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), pp. 1392-1392.

47. Miller C.O., Skoog F., Okumura C.S., von Saltza M.H., Strong F.M., 1955, Structure and synthesis of kinetin, *Journal of the American Chemical Society*, 77, pp. 2662-2663.
48. Gillespie L.M., Volaire F.A., 2017, Are winter and summer dormancy symmetrical seasonal adaptive strategies? The case of temperate herbaceous perennials, *Annals of Botany*, 119, pp. 311-323.
49. Bairu M.W., Stirk W.A., Dolezal K., Van Staden J., 2007, Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: Can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin?, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, pp. 15-23.
50. Posada M., Ballesteros N., Obando W., Angarita A., 1999, Micropropagation of *Gerbera* from floral buds, *Acta Horti*, 482, pp. 329-332.
51. Behera S., Nayak N., Shasmita D.P., Naik S.K., 2015, An efficient micropropagation protocol of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell through two-stage culture of nodal segments and *ex vitro* acclimatization, *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 3(3), pp. 16-21.
52. Ioio I.R., Linhares F.S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., Costantino P., Sabatini S., 2007, Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation, *Current biology*, 17, pp. 678-682.
53. Adrian S., Nigel S., Mark, F., 2003, *Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants*, Oxford University Press, UK.
54. Yew C.K., Balakrishnan B., Sundasekaran J., Subramaniam S., 2010, The effect of cytokinins on *in vitro* shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, pp. 2641-2646.
55. Hussein S.A., Noori A.M., Kanber H.S., 2020, Stratification Period with Different Agricultural Media Roll On Seeds Germination Ratio And Humic Acid Fertilization On Apricot Seedlings *Prunus armeniaca* L. Growth, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(71–72), pp. 23-29.
56. Al-Sulaiman M.A., Barakat M.N., 2010, *In vitro* shoot multiplication of *Ziziphus spina-christi* by shoot tip culture, *African Journal of Biotechnology*, 9(6), pp. 850-857.
57. Guang-jie Z., Zhan-bin W., Dan W., 2008, *In vitro* propagation and *ex vitro* rooting of blueberry plantlets, *Plant Tissue Cult and Biotech*, 18(1), pp. 187-195.

58. Hussain T.M., Chandrasekhar T., Gopal G.R., 2008, Micropropagation of *Sterculia urens* Roxb., an endangered tree species from intact seedlings, *African Journal of Biotechnology*, 7, pp. 95-101.
59. Jana S., Sivanesan I., Jeong B.R., 2013, Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of *Sophora tonkinensis*, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(7), pp. 549-553.
60. Gitta K.M., Agnes B., Gyongyi N., Laszlo K., 2019, Hormon combinations for root induction of pear, *Agricultural Research and Technology*, 22, pp. 38-39.
61. Reed B.M., 1995, Screening *Pyrus* germplasms for *in vitro* rooting response, *Horticultural Science*, 30, pp. 1292–1294.
62. Haq I.U., Ahmad T., Hafiz I.A., Abbasi N.A., 2009, Influence of microcutting sizes and IBA concentrations on *in vitro* rooting of olive cv. ‘Dolce Agogia’, *Pakistan Journal of Botany*, 41, pp. 1213-1222.
63. Nemeth G., 1986, Induction of rooting. In: Bajaj YPS, eds. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees*, 1, pp. 49-64.
64. Islam A.T.M.R., Islam M.M., Alam M.F., 2017, Rapid *in vitro* clonal propagation of herbal spice, *Mentha piperita* L. using shoot tip and nodal explants, *Plant Science Research*, 5, pp. 43-50.
65. Imtiaz M., Khattak A.M., Khan M.A., Jalal F., Bo H., 2019, Rapid *in-vitro* propagation of *Chrysanthemum morifolium* through shoot bud explants, *Pakistan Journal of Botany*, 51, pp. 1093–1098.
66. Huang T. Zhang H., Zhao R., Zhu Z., 2022, Establishing an efficient regeneration system for tissue culture in *Bougainvillea buttiana* ‘Miss Manila’, *Plants*, 11, pp. 2372.
67. Shahriyar S., Akram S., Khan K., Miya M. F., Sarkar M.A.R., 2015, *In vitro* plant regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) at the rate of different hormonal concentration, *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 1(2), pp. 297-303.
68. Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch, Vũ Quang Sáng, 2006, *Sinh lý thực vật*, Nhà xuất bản Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội, tr. 239.
69. Thiman K.V., 1937, On the nature of inhibitions caused by auxin, *American Journal of Botany*, 24(7), pp. 407-412.
70. Alsemaan T., 2013, Micro-propagation of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) cv. Almarah. *International Journal of Agricultural Research*, 8, pp. 172-177.
71. Ribnicky D.M., Ilic N., Cohen J.D., Cooke T.J., 1996, The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism (the

implications for carrot somatic embryogenesis), *Plant Physiology*, 112(2), pp. 549-558.

72. Justamante M.S., Acosta-Motos J.R., Cano A., Villanova J., Birlanga V., Albacete A., Cano E.A., Acosta M., Pérez-Pérez J.M., 2019, Integration of phenotype and hormone data during adventitious rooting in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stem cuttings, *Plants*, 8, pp. 226.

73. Kodad S., Melhaoui R., Han C., Addi M., Sahib N., Elamrani A., Mihamou A., 2021, Effect of culture media and plant growth regulators on shoot proliferation and rooting of internode explants from Moroccan native Almond (*Prunus dulcis* Mill.) genotypes, *International Journal of Agronomy*, 2021(1), 9931574.

74. Lin H., Xu J., Wu K., Gong C., Jie Y., Yang B., Chen J., 2024, An efficient method for the propagation of *bougainvillea glabra* 'new river'(nyctaginaceae) from *in vitro* stem segments, *Forests*, 15(3), pp. 519.

75. Trịnh Thị Hương, Nguyễn Ngọc Hoàng Vân, Trần Trọng Tuấn, 2022, Ảnh Hưởng Của Chất Điều Hoà Sinh Trưởng Thực Vật Đến Quá Trình Nhân Giống *In Vitro* Cây Ba Kích (*Morinda officinalis* How.), *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 22(4), tr. 37-46.

76. Karhu S.T., 1997, Rooting of blue honeysuckle microshoots, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, pp. 153-159.

77. Deng Z.C., Jin H., He H., 2015, An efficient micropropagation system for *Morinda officinalis* How. (Rubiaceae), an endangered medicinal plant, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, pp. 1609-1618.

78. Khan S., Nasib A., Saeed B., Employment of *in vitro* technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*), *Pakistan Journal of Botany*, 36, pp. 611–616.

79. Dreger M., Gryszczyńska A., Szalata M., Wielgus K., 2020, Micropropagation and HPLC-DAD, UPLC MS/MS analysis of oenothien B and phenolic acids in shoot cultures and in regenerated plants of fireweed (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143, pp. 653-663.

80. Moudi M., Go R., 2015, Phylogenetic analysis among four sections of the genus *dendrobium* sw.(orchidaceae) based on low copy nuclear gene (xdh) sequences in peninsular malaysia, *The Iranian Journal of Botany*, 21(2), pp. 169-178.

PHỤ LỤC
PHỤ LỤC 1: THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG KHOÁNG

Loại stock	Hóa chất	mg/l
Đa lượng	KNO ₃	1900
	NH ₄ NO ₃	1650
	KH ₂ PO ₄	170
	MgSO ₄ hoặc MgSO ₄ .7H ₂ O	180.54 370.1
	CaCl ₂	332
Vi lượng	H ₃ BO ₃	6.2
	MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
	KI	0.83
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
FeEDTA	Na ₂ EDTA	37.3
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
	hoặc FeNaEDTA	36.7
Vitamin MS	Glycine	2
	Myo-Inositol	100
	Nicotinic acid	0.5
	Pyridoxine HCl	0.5
	Thiamine HCl	0.1

PHỤ LỤC 2: KẾT QUẢ THỐNG KÊ CÁC THÍ NGHIỆM BẰNG PHẦN MỀM MINITAB 16

3.1. THÍ NGHIỆM 1

General Linear Model: Tỷ lệ nhiễm, Tỷ lệ sống versus Thời gian

Factor	Type	Levels	Values
Thời gian	fixed	3	12, 16, 20

Analysis of Variance for Tỷ lệ nhiễm, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Thời gian	2	2.8222	2.8222	1.4111	6.33	0.003
Error	87	19.4000	19.4000	0.2230		
Total	89	22.2222				

S = 0.472217 R-Sq = 12.70% R-Sq(adj) = 10.69%

Analysis of Variance for Tỷ lệ sống, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Thời gian	2	0.8222	0.8222	0.4111	1.67	0.194
Error	87	21.4000	21.4000	0.2460		
Total	89	22.2222				

S = 0.495961 R-Sq = 3.70% R-Sq(adj) = 1.49%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for Tỷ lệ nhiễm

Thời gian	N	Mean	Grouping
12	30	0.6667	A
16	30	0.4333	A B
20	30	0.2333	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for Tỷ lệ sống

Thời gian	N	Mean	Grouping
16	30	0.5667	A
20	30	0.4333	A
12	30	0.3333	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Descriptive Statistics: Tỷ lệ nhiễm

Variable	Thời gian		N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
	N								
Tỷ lệ nhiễm	12	30	0	0.6667	0.0875	0.4795	0.0000	0.0000	1.0000
	16	30	0	0.4333	0.0920	0.5040	0.0000	0.0000	0.0000
	20	30	0	0.2333	0.0785	0.4302	0.0000	0.0000	0.0000

Variable	Thời gian		Q3	Maximum
	N			
Tỷ lệ nhiễm	12	30	1.0000	1.0000
	16	30	1.0000	1.0000
	20	30	0.2500	1.0000

Descriptive Statistics: Tỷ lệ sống

Variable	Thời gian			Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
	gian	N	N*						
Tỷ lệ sống	12	30	0	0.3333	0.0875	0.4795	0.0000	0.0000	0.0000
	16	30	0	0.5667	0.0920	0.5040	0.0000	0.0000	1.0000
	20	30	0	0.4333	0.0920	0.5040	0.0000	0.0000	0.0000

Variable	Thời gian		
	gian	Q3	Maximum
Tỷ lệ sống	12	1.0000	1.0000
	16	1.0000	1.0000
	20	1.0000	1.0000

3.2. THÍ NGHIỆM 2

General Linear Model: Số chồi, Số lá, Chiều cao versus Nồng độ

Factor	Type	Levels	Values
Nồng độ	fixed	11	K0, K0.5, K1, K1.5, K2, K2.5, K3, K3.5, K4, K4.5, K5

Analysis of Variance for Số chồi, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	10	14.9576	14.9576	1.4958	11.54	0.000
Error	319	41.3333	41.3333	0.1296		
Total	329	56.2909				

S = 0.359961 R-Sq = 26.57% R-Sq(adj) = 24.27%

Unusual Observations for Số chồi

Obs	Số chồi	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
63	2.00000	1.10000	0.06572	0.90000	2.54 R
69	2.00000	1.10000	0.06572	0.90000	2.54 R
88	2.00000	1.10000	0.06572	0.90000	2.54 R
93	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
96	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
100	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
101	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
103	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
109	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
114	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
247	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
249	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
254	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
256	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
259	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
264	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R
265	2.00000	1.23333	0.06572	0.76667	2.17 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for Số lá, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	10	377.364	377.364	37.736	34.57	0.000
Error	319	348.200	348.200	1.092		
Total	329	725.564				

S = 1.04477 R-Sq = 52.01% R-Sq(adj) = 50.51%

Unusual Observations for Số lá

Obs	Số lá	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
2	3.00000	0.93333	0.19075	2.06667	2.01 R
92	4.00000	1.66667	0.19075	2.33333	2.27 R
108	4.00000	1.66667	0.19075	2.33333	2.27 R
121	4.00000	1.83333	0.19075	2.16667	2.11 R
137	4.00000	1.83333	0.19075	2.16667	2.11 R
186	3.00000	5.30000	0.19075	-2.30000	-2.24 R
196	8.00000	5.30000	0.19075	2.70000	2.63 R
210	3.00000	5.30000	0.19075	-2.30000	-2.24 R
214	5.00000	2.53333	0.19075	2.46667	2.40 R
215	0.00000	2.53333	0.19075	-2.53333	-2.47 R
220	0.00000	2.53333	0.19075	-2.53333	-2.47 R
221	0.00000	2.53333	0.19075	-2.53333	-2.47 R
226	5.00000	2.53333	0.19075	2.46667	2.40 R
236	5.00000	2.53333	0.19075	2.46667	2.40 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for Chiều cao, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	10	57.9362	57.9362	5.7936	38.98	0.000
Error	319	47.4153	47.4153	0.1486		
Total	329	105.3515				

S = 0.385535 R-Sq = 54.99% R-Sq(adj) = 53.58%

Unusual Observations for Chiều cao

Obs	Chiều cao	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
142	2.00000	1.23333	0.07039	0.76667	2.02 R
148	2.20000	1.23333	0.07039	0.96667	2.55 R
151	2.50000	1.45667	0.07039	1.04333	2.75 R
152	2.30000	1.45667	0.07039	0.84333	2.22 R
168	2.50000	1.45667	0.07039	1.04333	2.75 R
170	2.50000	1.45667	0.07039	1.04333	2.75 R
177	2.50000	1.45667	0.07039	1.04333	2.75 R
180	0.60000	1.45667	0.07039	-0.85667	-2.26 R
183	3.00000	2.08000	0.07039	0.92000	2.43 R
188	3.00000	2.08000	0.07039	0.92000	2.43 R
193	3.00000	2.08000	0.07039	0.92000	2.43 R
198	3.00000	2.08000	0.07039	0.92000	2.43 R
203	3.00000	2.08000	0.07039	0.92000	2.43 R
208	3.00000	2.08000	0.07039	0.92000	2.43 R
213	3.00000	2.10333	0.07039	0.89667	2.37 R
218	3.00000	2.10333	0.07039	0.89667	2.37 R
223	3.00000	2.10333	0.07039	0.89667	2.37 R
228	3.00000	2.10333	0.07039	0.89667	2.37 R
233	3.00000	2.10333	0.07039	0.89667	2.37 R
238	3.00000	2.10333	0.07039	0.89667	2.37 R
291	2.00000	1.13000	0.07039	0.87000	2.30 R
299	2.00000	1.13000	0.07039	0.87000	2.30 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for Số chồi

Nồng độ	N	Mean	Grouping
K3	30	1.6667	A
K3.5	30	1.4333	A B
K2.5	30	1.4000	A B
K2	30	1.3333	B C
K4	30	1.2333	B C D

K1.5	30	1.2333	B C D
K1	30	1.1000	C D
K5	30	1.0000	D
K4.5	30	1.0000	D
K0.5	30	1.0000	D
K0	30	1.0000	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for Số lá

Nồng độ	N	Mean	Grouping
K3	30	5.3000	A
K3.5	30	2.5333	B
K4	30	2.4667	B C
K4.5	30	2.3333	B C D
K2.5	30	2.3000	B C D
K5	30	2.0333	B C D
K2	30	1.8333	B C D
K1.5	30	1.6667	B C D E
K1	30	1.6333	C D E
K0.5	30	1.5667	D E
K0	30	0.9333	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for Chiều cao

Nồng độ	N	Mean	Grouping
K3.5	30	2.1033	A
K3	30	2.0800	A
K4	30	1.5400	B
K2.5	30	1.4567	B
K2	30	1.2333	B C
K4.5	30	1.1300	C
K1.5	30	1.1300	C
K5	30	1.0967	C
K1	30	1.0500	C
K0.5	30	1.0000	C D
K0	30	0.7133	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Descriptive Statistics: Số chồi

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Số chồi	K0	30	0	1.0000	0.000000	0.000000	1.0000	1.0000	1.0000
	K0.5	30	0	1.0000	0.000000	0.000000	1.0000	1.0000	1.0000
	K1	30	0	1.1000	0.0557	0.3051	1.0000	1.0000	1.0000
	K1.5	30	0	1.2333	0.0785	0.4302	1.0000	1.0000	1.0000
	K2	30	0	1.3333	0.0875	0.4795	1.0000	1.0000	1.0000
	K2.5	30	0	1.4000	0.0910	0.4983	1.0000	1.0000	1.0000
	K3	30	0	1.6667	0.0875	0.4795	1.0000	1.0000	2.0000
	K3.5	30	0	1.4333	0.0920	0.5040	1.0000	1.0000	1.0000
	K4	30	0	1.2333	0.0785	0.4302	1.0000	1.0000	1.0000
	K4.5	30	0	1.0000	0.000000	0.000000	1.0000	1.0000	1.0000
K5	30	0	1.0000	0.000000	0.000000	1.0000	1.0000	1.0000	

Variable	Nồng độ	Q3	Maximum
Số chồi	K0	1.0000	1.0000
	K0.5	1.0000	1.0000
	K1	1.0000	2.0000
	K1.5	1.2500	2.0000
	K2	2.0000	2.0000
	K2.5	2.0000	2.0000
K3	2.0000	2.0000	

K3.5	2.0000	2.0000
K4	1.2500	2.0000
K4.5	1.0000	1.0000
K5	1.0000	1.0000

Descriptive Statistics: Số lá

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
Số lá	K0	30	0	0.933	0.151	0.828	0.000	0.000	1.000	1.250
	K0.5	30	0	1.567	0.149	0.817	0.000	1.000	2.000	2.000
	K1	30	0	1.633	0.169	0.928	0.000	1.000	1.000	2.250
	K1.5	30	0	1.667	0.200	1.093	0.000	1.000	1.000	2.250
	K2	30	0	1.833	0.180	0.986	0.000	1.000	2.000	2.250
	K2.5	30	0	2.300	0.167	0.915	1.000	2.000	2.000	3.000
	K3	30	0	5.300	0.240	1.317	3.000	4.000	5.000	6.250
	K3.5	30	0	2.533	0.274	1.502	0.000	1.000	2.500	4.000
	K4	30	0	2.467	0.164	0.900	1.000	2.000	3.000	3.000
	K4.5	30	0	2.333	0.200	1.093	1.000	2.000	2.000	4.000
K5	30	0	2.033	0.162	0.890	1.000	1.000	2.000	3.000	

Variable	Nồng độ	Maximum
Số lá	K0	3.000
	K0.5	3.000
	K1	3.000
	K1.5	4.000
	K2	4.000
	K2.5	4.000
	K3	8.000
	K3.5	5.000
	K4	4.000
	K4.5	4.000
K5	3.000	

Descriptive Statistics: Chiều cao

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Chiều cao	K0	30	0	0.7133	0.0367	0.2013	0.5000	0.5000	0.6500
	K0.5	30	0	1.0000	0.0549	0.3006	0.5000	0.8500	1.0000
	K1	30	0	1.0500	0.0538	0.2945	0.6000	0.7000	1.0000
	K1.5	30	0	1.1300	0.0399	0.2184	0.7000	1.0000	1.1000
	K2	30	0	1.2333	0.0675	0.3698	0.7000	1.0000	1.2000
	K2.5	30	0	1.457	0.110	0.603	0.600	1.000	1.350
	K3	30	0	2.0800	0.0991	0.5429	1.5000	1.5000	2.0000
	K3.5	30	0	2.1033	0.0981	0.5372	1.5000	1.5000	2.0000
	K4	30	0	1.5400	0.0500	0.2737	1.0000	1.5000	1.5000
	K4.5	30	0	1.1300	0.0566	0.3098	0.6000	1.0000	1.0000
K5	30	0	1.0967	0.0619	0.3388	0.5000	0.9750	1.0000	

Variable	Nồng độ	Q3	Maximum
Chiều cao	K0	0.9000	1.0000
	K0.5	1.2000	1.5000
	K1	1.3000	1.5000
	K1.5	1.3000	1.5000
	K2	1.5000	2.2000
	K2.5	1.975	2.500
	K3	2.4250	3.0000
	K3.5	2.4500	3.0000
	K4	1.6500	2.0000
	K4.5	1.2250	2.0000
K5	1.5000	1.5000	

3.3. THÍ NGHIỆM 3

General Linear Model: số chồi, chiều cao chồi, số lá versus Nồng độ

Factor	Type	Levels	Values
Nồng độ	fixed	9	B0, B05, B1, B15, B2, B25, B3, B35, B4

Analysis of Variance for số chồi, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	8	328.904	328.904	41.113	77.86	0.000
Error	126	66.533	66.533	0.528		
Total	134	395.437				

S = 0.726665 R-Sq = 83.17% R-Sq(adj) = 82.11%

Unusual Observations for số chồi

Obs	số chồi	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
47	2.00000	3.46667	0.18762	-1.46667	-2.09 R
49	2.00000	3.46667	0.18762	-1.46667	-2.09 R
50	5.00000	3.46667	0.18762	1.53333	2.18 R
53	5.00000	3.46667	0.18762	1.53333	2.18 R
84	6.00000	4.40000	0.18762	1.60000	2.28 R
90	6.00000	4.40000	0.18762	1.60000	2.28 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for chiều cao chồi, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	8	2.82815	2.82815	0.35352	11.21	0.000
Error	126	3.97333	3.97333	0.03153		
Total	134	6.80148				

S = 0.177579 R-Sq = 41.58% R-Sq(adj) = 37.87%

Unusual Observations for chiều cao chồi

Obs	chiều cao chồi	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	0.90000	1.42667	0.04585	-0.52667	-3.07 R
25	1.90000	1.48667	0.04585	0.41333	2.41 R
29	1.00000	1.48667	0.04585	-0.48667	-2.84 R
30	1.10000	1.48667	0.04585	-0.38667	-2.25 R
41	2.00000	1.54000	0.04585	0.46000	2.68 R
61	2.20000	1.74000	0.04585	0.46000	2.68 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for số lá, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	8	194.400	194.400	24.300	40.29	0.000
Error	126	76.000	76.000	0.603		
Total	134	270.400				

S = 0.776643 R-Sq = 71.89% R-Sq(adj) = 70.11%

Unusual Observations for số lá

Obs	số lá	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
9	1.00000	2.86667	0.20053	-1.86667	-2.49 R
43	4.00000	5.86667	0.20053	-1.86667	-2.49 R
64	8.00000	6.46667	0.20053	1.53333	2.04 R

87	5.00000	6.53333	0.20053	-1.53333	-2.04	R
100	9.00000	7.40000	0.20053	1.60000	2.13	R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for số chồi

Nồng độ	N	Mean	Grouping
B3	15	6.267	A
B35	15	5.067	B
B25	15	4.400	B C
B2	15	3.933	C D
B4	15	3.867	C D
B15	15	3.467	D
B1	15	2.067	E
B05	15	1.667	E F
B0	15	1.200	F

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for chiều cao chồi

Nồng độ	N	Mean	Grouping
B3	15	1.893	A
B25	15	1.780	A B
B35	15	1.767	A B
B2	15	1.740	A B C
B4	15	1.720	A B C
B15	15	1.680	B C D
B1	15	1.540	C D E
B05	15	1.487	D E
B0	15	1.427	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for số lá

Nồng độ	N	Mean	Grouping
B3	15	7.400	A
B35	15	6.533	A B
B25	15	6.533	A B
B2	15	6.467	B
B4	15	6.200	B C
B15	15	6.133	B C
B1	15	5.867	B C
B05	15	5.400	C
B0	15	2.867	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Descriptive Statistics: số lá

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
số lá	B0	15	0	2.867	0.215	0.834	1.000	2.000	3.000	3.000
	B05	15	0	5.400	0.190	0.737	4.000	5.000	6.000	6.000
	B1	15	0	5.867	0.215	0.834	4.000	5.000	6.000	6.000
	B15	15	0	6.133	0.215	0.834	5.000	5.000	6.000	7.000
	B2	15	0	6.467	0.192	0.743	5.000	6.000	6.000	7.000
	B25	15	0	6.533	0.215	0.834	5.000	6.000	6.000	7.000
	B3	15	0	7.400	0.190	0.737	6.000	7.000	7.000	8.000
	B35	15	0	6.533	0.165	0.640	6.000	6.000	6.000	7.000
	B4	15	0	6.200	0.200	0.775	5.000	6.000	6.000	7.000

Variable	Nồng độ	Maximum
số lá	B0	4.000

B05	6.000
B1	7.000
B15	7.000
B2	8.000
B25	8.000
B3	9.000
B35	8.000
B4	7.000

Welcome to Minitab, press F1 for help.

Retrieving project from file: 'C:\USERS\HANG\DOCUMENTS\MINITABBA.MPJ'

Descriptive Statistics: số chồi

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
số chồi	B0	15	0	1.200	0.107	0.414	1.000	1.000	1.000	1.000
	B05	15	0	1.667	0.159	0.617	1.000	1.000	2.000	2.000
	B1	15	0	2.067	0.206	0.799	1.000	1.000	2.000	3.000
	B15	15	0	3.467	0.236	0.915	2.000	3.000	3.000	4.000
	B2	15	0	3.933	0.182	0.704	3.000	3.000	4.000	4.000
	B25	15	0	4.400	0.235	0.910	3.000	4.000	4.000	5.000
	B3	15	0	6.267	0.182	0.704	5.000	6.000	6.000	7.000
	B35	15	0	5.067	0.153	0.594	4.000	5.000	5.000	5.000
	B4	15	0	3.867	0.192	0.743	3.000	3.000	4.000	4.000

Variable	Nồng độ	Maximum
số chồi	B0	2.000
	B05	3.000
	B1	3.000
	B15	5.000
	B2	5.000
	B25	6.000
	B3	7.000
	B35	6.000
	B4	5.000

Descriptive Statistics: chiều cao chồi

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1
chiều cao chồi	B0	15	0	1.4267	0.0492	0.1907	0.9000	1.3000
	B05	15	0	1.4867	0.0646	0.2503	1.0000	1.4000
	B1	15	0	1.5400	0.0434	0.1682	1.3000	1.4000
	B15	15	0	1.6800	0.0460	0.1781	1.5000	1.6000
	B2	15	0	1.7400	0.0550	0.2131	1.5000	1.6000
	B25	15	0	1.7800	0.0405	0.1568	1.6000	1.7000
	B3	15	0	1.8933	0.0345	0.1335	1.7000	1.8000
	B35	15	0	1.7667	0.0347	0.1345	1.6000	1.7000
	B4	15	0	1.7200	0.0355	0.1373	1.5000	1.6000

Variable	Nồng độ	Median	Q3	Maximum
chiều cao chồi	B0	1.5000	1.6000	1.6000
	B05	1.5000	1.7000	1.9000
	B1	1.5000	1.6000	2.0000
	B15	1.6000	1.7000	2.0000
	B2	1.6000	1.9000	2.2000
	B25	1.7000	1.9000	2.1000
	B3	1.9000	2.0000	2.1000
	B35	1.7000	1.9000	2.0000
	B4	1.7000	1.8000	2.0000

3.4. THÍ NGHIỆM 4

General Linear Model: Số chồi, Chiều cao chồi, Số lá versus Nồng độ

Factor	Type	Levels	Values
Nồng độ	fixed	9	IP0, IP0.5, IP1, IP1.5, IP2.0, IP2.5, IP3, IP3.5, IP4

Analysis of Variance for Số chồi, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	8	50.6667	50.6667	6.3333	13.24	0.000
Error	126	60.2667	60.2667	0.4783		
Total	134	110.9333				

S = 0.691597 R-Sq = 45.67% R-Sq(adj) = 42.22%

Unusual Observations for Số chồi

Obs	Số chồi	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
59	5.00000	3.20000	0.17857	1.80000	2.69 R
63	4.00000	2.13333	0.17857	1.86667	2.79 R
109	4.00000	1.46667	0.17857	2.53333	3.79 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for Chiều cao chồi, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	8	44.4120	44.4120	5.5515	22.46	0.000
Error	126	31.1373	31.1373	0.2471		
Total	134	75.5493				

S = 0.497113 R-Sq = 58.79% R-Sq(adj) = 56.17%

Unusual Observations for Chiều cao chồi

Obs	Chiều cao chồi	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
39	3.50000	1.92000	0.12835	1.58000	3.29 R
49	2.50000	3.56000	0.12835	-1.06000	-2.21 R
53	5.00000	3.56000	0.12835	1.44000	3.00 R
54	2.50000	3.56000	0.12835	-1.06000	-2.21 R
58	2.50000	3.56000	0.12835	-1.06000	-2.21 R
62	3.00000	1.98667	0.12835	1.01333	2.11 R
63	3.00000	1.98667	0.12835	1.01333	2.11 R
111	0.50000	1.61333	0.12835	-1.11333	-2.32 R
114	3.00000	1.61333	0.12835	1.38667	2.89 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for Số lá, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	8	29.704	29.704	3.713	3.45	0.001
Error	126	135.600	135.600	1.076		
Total	134	165.304				

S = 1.03740 R-Sq = 17.97% R-Sq(adj) = 12.76%

Unusual Observations for Số lá

Obs	Số lá	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
17	1.00000	3.06667	0.26785	-2.06667	-2.06 R
22	1.00000	3.06667	0.26785	-2.06667	-2.06 R
111	6.00000	3.13333	0.26785	2.86667	2.86 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for Số chồi

Nồng độ	N	Mean	Grouping
N1.5	15	3.200	A
N2.0	15	2.133	B
N2.5	15	1.800	B C
N3	15	1.667	B C
N3.5	15	1.467	B C
N0.5	15	1.267	C
N1	15	1.267	C
N4	15	1.200	C
N0	15	1.200	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for Chiều cao chồi

Nồng độ	N	Mean	Grouping
N1.5	15	3.560	A
N2.0	15	1.987	B
N0.5	15	1.980	B
N1	15	1.920	B
N2.5	15	1.920	B
N0	15	1.800	B
N3	15	1.647	B
N3.5	15	1.613	B
N4	15	1.553	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for Số lá

Nồng độ	N	Mean	Grouping
N1.5	15	4.333	A
N2.0	15	3.667	A B
N1	15	3.400	A B
N2.5	15	3.267	A B
N3	15	3.200	A B
N3.5	15	3.133	B
N0.5	15	3.067	B
N0	15	2.867	B
N4	15	2.600	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Descriptive Statistics: Số chồi

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
Số chồi	N0	15	0	1.200	0.107	0.414	1.000	1.000	1.000	1.000
	N0.5	15	0	1.267	0.118	0.458	1.000	1.000	1.000	2.000
	N1	15	0	1.267	0.118	0.458	1.000	1.000	1.000	2.000
	N1.5	15	0	3.200	0.223	0.862	2.000	3.000	3.000	4.000
	N2.0	15	0	2.133	0.236	0.915	1.000	1.000	2.000	3.000
	N2.5	15	0	1.800	0.223	0.862	1.000	1.000	2.000	3.000
	N3	15	0	1.667	0.187	0.724	1.000	1.000	2.000	2.000
	N3.5	15	0	1.467	0.215	0.834	1.000	1.000	1.000	2.000
	N4	15	0	1.200	0.107	0.414	1.000	1.000	1.000	1.000

Variable	Nồng độ	Maximum
Số chồi	N0	2.000
	N0.5	2.000
	N1	2.000
	N1.5	5.000
	N2.0	4.000
	N3	3.000

N3.5 4.000
N4 2.000

Descriptive Statistics: Số lá

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
Số lá	N0	15	0	2.867	0.215	0.834	1.000	2.000	3.000	3.000
	N0.5	15	0	3.067	0.284	1.100	1.000	3.000	3.000	4.000
	N1	15	0	3.400	0.254	0.986	2.000	3.000	3.000	4.000
	N1.5	15	0	4.333	0.252	0.976	3.000	3.000	5.000	5.000
	N2.0	15	0	3.667	0.270	1.047	2.000	3.000	4.000	5.000
	N2.5	15	0	3.267	0.330	1.280	2.000	2.000	3.000	5.000
	N3	15	0	3.200	0.262	1.014	2.000	2.000	3.000	4.000
	N3.5	15	0	3.133	0.274	1.060	2.000	2.000	3.000	4.000
N4	15	0	2.600	0.254	0.986	1.000	2.000	3.000	3.000	

Variable	Nồng độ	Maximum
Số lá	N0	4.000
	N0.5	5.000
	N1	5.000
	N1.5	6.000
	N2.0	5.000
	N2.5	5.000
	N3	5.000
	N3.5	6.000
N4	4.000	

3.5. THÍ NGHIỆM 6

Welcome to Minitab, press F1 for help.

General Linear Model: số re, chiều dài re, ty le hình t versus Nồng độ

Factor	Type	Levels	Values
Nồng độ	fixed	7	I0, I05, I1, I15, I2, I25, I3

Analysis of Variance for số re, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	6	161.873	161.873	26.979	9.13	0.000
Error	56	165.556	165.556	2.956		
Total	62	327.429				

S = 1.71940 R-Sq = 49.44% R-Sq(adj) = 44.02%

Unusual Observations for số re

Obs	số re	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
4	5.00000	1.55556	0.57313	3.44444	2.12 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for chiều dài re, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	6	67.877	67.877	11.313	6.87	0.000
Error	56	92.240	92.240	1.647		
Total	62	160.117				

S = 1.28341 R-Sq = 42.39% R-Sq(adj) = 36.22%

Analysis of Variance for ty le hình thanh re, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nồng độ	6	3.3016	3.3016	0.5503	2.48	0.034
Error	56	12.4444	12.4444	0.2222		
Total	62	15.7460				

S = 0.471405 R-Sq = 20.97% R-Sq(adj) = 12.50%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for số re

Nồng độ	N	Mean	Grouping
I1	9	5.7778	A
I15	9	2.3333	B
I05	9	2.0000	B
I0	9	1.5556	B
I2	9	1.5556	B
I25	9	0.7778	B
I3	9	0.6667	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for chiều dài re

Nồng độ	N	Mean	Grouping
I1	9	3.4667	A
I05	9	2.1111	A B
I0	9	1.6333	A B
I15	9	1.5444	B
I2	9	0.6667	B
I25	9	0.4333	B
I3	9	0.2889	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence for ty lệ hình thành re

Nồng độ	N	Mean	Grouping
I1	9	1.0000	A
I05	9	0.5556	A B
I15	9	0.5556	A B
I2	9	0.4444	A B
I0	9	0.4444	A B
I25	9	0.3333	A B
I3	9	0.2222	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Descriptive Statistics: số re

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
số re	I0	9	0	1.556	0.669	2.007	0.000	0.000	0.000	3.500
	I05	9	0	2.000	0.667	2.000	0.000	0.000	3.000	3.500
	I1	9	0	5.778	0.278	0.833	5.000	5.000	6.000	6.500
	I15	9	0	2.333	0.764	2.291	0.000	0.000	3.000	4.500
	I2	9	0	1.556	0.626	1.878	0.000	0.000	0.000	3.500
	I25	9	0	0.778	0.401	1.202	0.000	0.000	0.000	2.000
	I3	9	0	0.667	0.441	1.323	0.000	0.000	0.000	1.500

Variable	Nồng độ	Maximum
số re	I0	5.000
	I05	5.000
	I1	7.000
	I15	5.000

I2	4.000
I25	3.000
I3	3.000

Descriptive Statistics: chiều dài re

Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
chiều dài re	I0	9	0	1.633	0.646	1.938	0.000	0.000	0.000
	I05	9	0	2.111	0.671	2.013	0.000	0.000	3.500
	I1	9	0	3.467	0.132	0.397	2.600	3.200	3.600
	I15	9	0	1.544	0.489	1.468	0.000	0.000	2.700
	I2	9	0	0.667	0.267	0.802	0.000	0.000	0.000
	I25	9	0	0.433	0.219	0.658	0.000	0.000	0.000
	I3	9	0	0.289	0.192	0.575	0.000	0.000	0.000

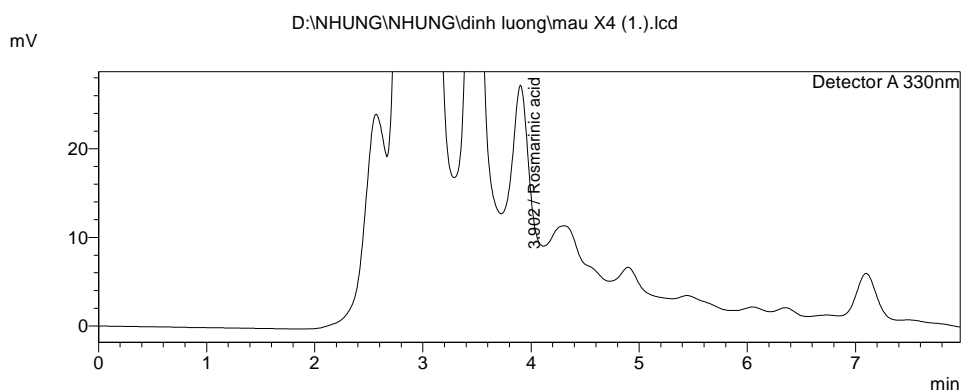
Variable	Nồng độ	Q3	Maximum
chiều dài re	I0	3.700	3.800
	I05	3.850	4.200
	I1	3.750	3.800
	I15	2.750	3.000
	I2	1.550	1.700
	I25	1.200	1.500
	I3	0.600	1.400

Descriptive Statistics: ty lệ hình thành re

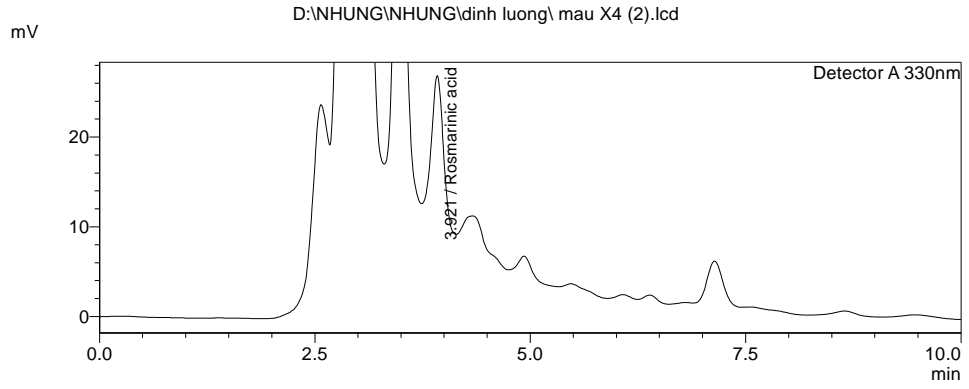
Variable	Nồng độ	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum
ty lệ hình thành re	I0	9	0	0.444	0.176	0.527	0.000
	I05	9	0	0.556	0.176	0.527	0.000
	I1	9	0	1.0000	0.000000	0.000000	1.0000
	I15	9	0	0.556	0.176	0.527	0.000
	I2	9	0	0.444	0.176	0.527	0.000
	I25	9	0	0.333	0.167	0.500	0.000
	I3	9	0	0.222	0.147	0.441	0.000

Variable	Nồng độ	Q1	Median	Q3	Maximum
ty lệ hình thành re	I0	0.000	0.000	1.000	1.000
	I05	0.000	1.000	1.000	1.000
	I1	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	I15	0.000	1.000	1.000	1.000
	I2	0.000	0.000	1.000	1.000
	I25	0.000	0.000	1.000	1.000
	I3	0.000	0.000	0.500	1.000

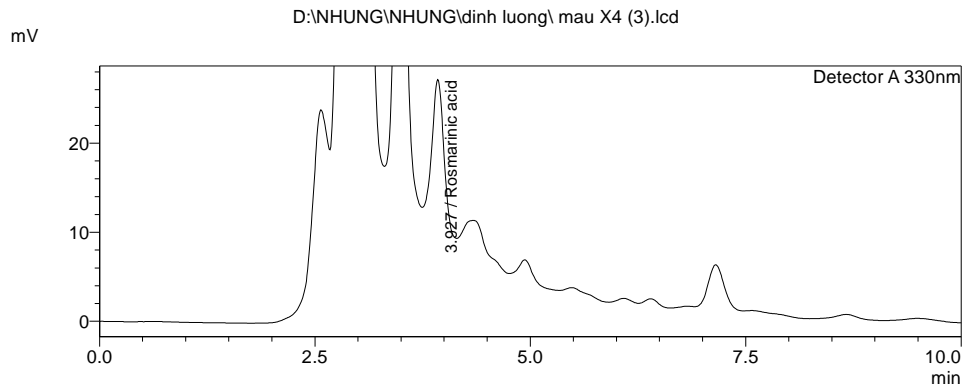
PHỤ LỤC 3: ĐỊNH LƯỢNG ROSMARINIC ACID TRONG MẪU XẠ ĐEN



Detector A 330nm				
Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(USP)
Rosmarinic acid	3.902	199117	--	2961
		199117		



Detector A 330nm				
Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(USP)
Rosmarinic acid	3.921	221242	--	2753
		221242		



Detector A 330nm				
Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(USP)
Rosmarinic acid	3.927	205371	--	2865
		205371		