

NUÔI CÂY VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT TẾ BÀO CALLUS CÂY MẬT NHÂN (*EURYCOMA LONGIFOLIA* JACK)

A STUDY OF CALLUS CULTURE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *EURYCOMA LONGIFOLIA* JACK EXTRACT

Võ Châu Tuấn, Trần Quang Dân, Bùi Thị Thor

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

vochau Tuan@gmail.com; tquangdan0911@gmail.com; buithonh39@gmail.com

Tóm tắt - Mật nhân là cây thuốc chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học quý, được sử dụng như một loại thảo dược để hỗ trợ, chăm sóc sức khỏe và điều trị bệnh cho con người. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự cầm ứng và tăng sinh khối tế bào callus loài cây này. Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/ml Kinetin là thích hợp nhất để cầm ứng callus từ rễ của cây mật nhân *in vitro* sau khoảng 12-14 ngày nuôi cấy. Sự tích lũy sinh khối tế bào callus tốt nhất, đạt 32,03 g/50 ml tươi tương ứng với 3,6 g/50 ml khô trên môi trường MS lỏng bổ sung 1,5 mg/l NAA sau 14 ngày nuôi cấy, cao gấp 10 lần so với lượng sinh khối ban đầu (3 g/50 ml). Dịch chiết ethanol thô từ sinh khối tế bào callus nuôi cấy huyền phù đã cho thấy khả năng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus cereus* ở nồng độ 100 mg/ml, với đường kính vòng vô khuẩn đạt 32,1 mm.

Từ khóa - Cây mật nhân; callus; huyền phù tế bào; *Escherichia coli* và *Bacillus cereus*.

1. Đặt vấn đề

Theo tổ chức WHO, 80% dân số thế giới đang áp dụng các phương thức chữa bệnh truyền thống bằng cây dược liệu và ¼ các loại thuốc hiện nay đều có chứa các hoạt chất sinh học chiết xuất từ thực vật [1]. Tuy nhiên, thực tế cho thấy việc khai thác các dược liệu này chủ yếu là từ tự nhiên, và dưới các điều kiện bất lợi khác nhau đã làm suy giảm thành phần cũng như số lượng nhiều nguồn dược liệu quý [2]. Do đó, việc tìm ra phương thức thay thế để tạo ra nguồn dược liệu ổn định là rất cần thiết.

Nuôi cấy tế bào thực vật với những ưu điểm vượt trội đã mở ra tiềm năng lớn để tăng thu sinh khối trong thời gian ngắn, tạo nguồn nguyên liệu phục vụ việc tách chiết các hoạt chất sinh học trên quy mô công nghiệp, góp phần giải quyết những khó khăn về nguồn dược liệu tự nhiên [3]. Nhiều hoạt chất sinh học dùng làm thuốc đã được sản xuất theo phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật [4].

Cây mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack) là cây dược liệu quý được biết đến nhiều ở các nước Đông Nam Á [1]. Đây là loài cây thân gỗ, sinh trưởng chậm ngoài tự nhiên, phải trồng mất 4-7 năm mới có thể thu hoạch để dùng làm thuốc. Trong y học cổ truyền, các bộ phận của loài cây này được sử dụng như là một vị thuốc dùng để chữa trị nhiều bệnh khác nhau như: sốt rét, xương khớp, viêm loét, dạ dày, suy giảm sinh lý ở nam [1]. Ngày nay, tác dụng và thành phần dược liệu của cây mật nhân đã được nghiên cứu và công bố trong nhiều công trình khoa học khác nhau [5]. Tuy nhiên, hiện nay số lượng của cây mật nhân ở Việt Nam đang suy giảm nhanh chóng do nhu cầu khai thác quá mức, lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng. Vì vậy, bên cạnh nhân giống *in vitro*, việc nghiên cứu tìm ra phương thức sản xuất

Abstract - *Eurycoma longifolia* Jack is a precious medicinal plant having groups of rare bioactive compounds. The parts of the plant have been traditionally used to support and treat disease. In this study, we carry out the experiments of *in vitro* callus induction and cell suspension culture under the effect of different phytohormones to establish an optimal culture procedure for producing pharmaceutical biomass. The results have shown that the medium MS supplemented with 2.0 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l Kinetin is the most suitable for the induction of yellow-friable callus after 12-14 days of culture. The rapidest multiplication of suspended cells (32.03 g/50 ml FW corresponding to 3.6 g/50 mL DW) obtained in liquid MS medium contains 1.5 mg/l NAA after 14 days, which increases tenfold in comparison with the weight of initial explant. Furthermore, the crude extract from the suspended cell biomass has shown that it is possible to inhibit the growth of bacterium *Bacillus cereus*, at crude concentration of 100 mg/ml, with non-bacterial ring diameter of 32.1 mm.

Key words - *Eurycoma longifolia* Jack; callus; cell suspension; *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*.

sinh khối nhanh và ổn định loài cây này là vô cùng cần thiết.

Xuất phát từ những cơ sở trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nuôi cấy và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết tế bào callus loài cây này nhằm tạo ra cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu sản xuất các hoạt chất sinh học ở quy mô công nghiệp.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Quả chín của cây mật nhân được thu hái từ cây tự nhiên tại xã Hòa Bắc, huyện Hòa Vang, TP. Đà Nẵng và cho này mầm *in vitro* trên môi trường MS. Đoạn rễ của cây mật nhân *in vitro* có kích thước 1,0 cm được sử dụng làm mẫu nuôi cấy để tạo callus.

Các chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* ATCC 11778 và *Escherichia coli* ATCC 25922 được sử dụng cho thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Vi sinh vật, Khoa Sinh - Môi trường, trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng.

2.2. Khả năng tạo callus từ rễ cây *in vitro*

Đoạn rễ *in vitro* (dài 0,5 cm) được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS có bổ sung 3,0% sucrose, 0,8% agar, 2,4-D (2,0 mg/l) kết hợp với KIN (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l). Callus được hình thành từ mẫu rễ có màu vàng sáng, rắn và rời rạc, được tách thành những khối callus nhỏ hơn (đường kính khoảng 5 mm), sau đó nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS bổ sung 3,0% sucrose, 0,8% agar, 2,0 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l KIN. Callus được cấy chuyển lên cùng môi trường cứ 2 tuần/lần để nhân sinh khối làm nguyên liệu nuôi cấy huyền phù tế bào.

2.3. Nuôi cấy huyền phù tế bào

3,0 g tế bào callus được nuôi cấy trong các bình tam giác chứa 50 ml môi trường MS có bổ sung 3,0% sucrose, NAA (0,5-2,5 mg/l) để khảo sát khả năng tăng sinh khối tế bào. Các bình tam giác được đặt nuôi trên máy lắc, với tốc độ 100 vòng/phút. Sau 2 tuần nuôi cấy, mẫu sinh khối được thu bằng cách lọc chân không và cân khối lượng tươi, tiếp đó mẫu sinh khối được đem đi sấy ở nhiệt độ 50°C đến khối lượng không đổi và cân xác định khối lượng khô.

Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* được tiến hành ở điều kiện 25°C ± 2°C, cường độ ánh sáng khoảng 2000 Lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày.

2.4. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Thu dịch chiết ethanol của các loại tế bào mật nhân (callus, tế bào huyền phù và rễ cây tự nhiên) được thực hiện dựa vào phương pháp của Farouk và cộng sự [1]. Cụ thể, 5,0 g sinh khối khô tế bào nuôi cấy huyền phù được nghiền mịn và cho vào 50 ml ethanol 90%, ngâm trong 48 giờ ở 37°C. Sau đó, dịch chiết được lọc qua giấy lọc, và loại bỏ dung môi bằng máy cô quay chân không (Buchi - Thụy Sĩ) ở nhiệt độ 45°C, áp suất 175 mbar để thu kết tủa rắn. Hòa tan kết tủa rắn sau cô quay bằng dung dịch dimethylsulfoxide (DMSO) với nồng độ 100 mg/ml để làm dung dịch thử hoạt tính kháng khuẩn.

Sử dụng dịch huyền phù (10⁶ - 10⁸ CFU/ml) của các chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* ATCC 11778 và *Escherichia coli* ATCC 25922. Lấy 100 µl dịch huyền phù của mỗi chủng cho lên đĩa petri có chứa 20 ml môi trường dinh dưỡng dạng rắn, dùng que cấy dàn đều tế bào vi khuẩn trên mặt thạch. Khoan 3 lỗ, mỗi lỗ có đường kính 4 mm trên mỗi đĩa môi trường, sau đó cho vào mỗi lỗ 70 µl dung dịch của kết tủa rắn (được hòa tan trong DMSO có nồng độ 100 mg/ml). Đặt đĩa môi trường trong tủ lạnh khoảng 8 giờ, sau đó nuôi trong tủ ẩm ở 37°C, sau 24 giờ xác định đường kính vô khuẩn D - d (D: đường kính vòng vô khuẩn; d: đường kính lỗ khoan). Hoạt tính kháng khuẩn được xác định theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch và khả năng kháng khuẩn được đánh giá thông qua đường kính vòng vô khuẩn [6].

2.5. Xử lý thống kê

Mỗi thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần. Giá trị trung bình và sự sai khác có ý nghĩa nhỏ nhất được xử lý theo Duncan's test (*p* < 0,05) bằng phần mềm SAS. ver 9.1.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khả năng cảm ứng callus

Nhiều nghiên cứu cho thấy, 2,4-D là auxin thường được dùng để kích thích sự phân bào và sinh trưởng của tế bào callus [7]. Auxin kết hợp với các thành phần khác của môi trường dinh dưỡng có thể kích thích sự tăng trưởng của callus, huyền phù tế bào và điều hòa sự phát sinh hình thái, đặc biệt là khi nó được sử dụng phối hợp với các cytokinin [8]. Trong nghiên cứu này, khảo sát ảnh hưởng của tổ hợp 2,0 mg/l 2,4-D và các nồng độ khác nhau của KIN đến khả năng tạo callus từ mẫu rễ của cây mật nhân *in vitro*.

Kết quả nghiên cứu (Bảng 1) cho thấy, trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l KIN; đoạn rễ có khả năng tạo callus tốt nhất sau khoảng 12-14 ngày nuôi cấy, callus có màu vàng, rắn, rời rạc (Hình 1B). Trên các môi

trường có sự phối hợp của 2,0 mg/l 2,4-D với các nồng độ KIN khác thì khả năng tạo callus kém hơn, đặc biệt trên môi trường bổ sung tổ hợp 2,0 mg/l 2,4-D và 2,0 mg/l KIN, callus hình thành rất kém, callus vàng nhạt và mỏng nước (Hình 1A).

Bảng 1. Sự cảm ứng callus từ đoạn rễ *in vitro* cây mật nhân

Chất ĐHST (mg/l)		Khả năng tạo callus		
2,4-D	KIN	Thời gian (ngày)	Mức độ cảm ứng	Hình thái
2,0	0,25	13-15	++	Vàng nhạt, rắn, mỏng nước
	0,5	12-14	++++	Vàng đậm, rắn, rời rạc
	1,0	12-14	+++	Vàng đậm, rắn, mỏng nước
	1,5	14- 16	++	Vàng đậm, mỏng nước
	2,0	11-13	+	Vàng nhạt, mỏng nước

Chú thích: +: yếu, ++: trung bình; +++: khá, ++++: tốt



Hình 1. Callus tạo từ rễ cây mật nhân *in vitro* trên môi trường: (A) MS + 2,0 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l KIN; (B) MS + 2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l KIN.

Như vậy, sự kết hợp 2,0 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l KIN trong môi trường nuôi cấy đã mang lại hiệu quả rất tốt cho cảm ứng callus từ rễ cây mật nhân *in vitro* và sự ảnh hưởng này cũng được tìm thấy tương tự trên nhiều đối tượng nghiên cứu khác [8-9]. Nghiên cứu của Andrew và cộng sự (1990) cũng cho thấy, nuôi cấy callus để tái sinh cây *Panax quinquefolium* L. thì môi trường thích hợp nhất cho callus hình thành từ rễ là môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l 2,4-D và 1,0 mg/l KIN [10].

3.2. Khả năng sinh trưởng của tế bào mật nhân nuôi cấy huyền phù

Nuôi cấy huyền phù thực vật là một phương thức nuôi cấy tế bào đơn ở dạng callus hoặc phôi, được ứng dụng để nâng cao hiệu quả tăng sinh khối tế bào. Khi nuôi cấy, các mẫu callus ban đầu sẽ tách nhau ra và phân tán vào trong môi trường lỏng, sau đó hình thành một hệ huyền phù với các tế bào đơn, cụm tế bào, mảnh vỡ tế bào. Sự tích lũy sinh khối tế bào trong quá trình nuôi cấy phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó thành phần và nồng độ các chất ĐHST có một vai trò rất quan trọng [11]. Trong nghiên cứu này, dựa vào kết quả hình thành callus từ mẫu rễ (Bảng 1), môi trường MS chứa NAA riêng lẻ với các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 2,5 mg/l đã được khảo sát để tìm ra điều kiện thích hợp cho sự tăng sinh khối tế bào.

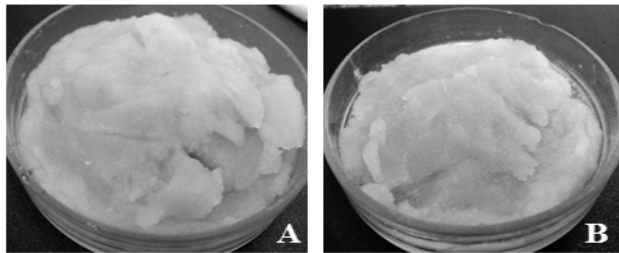
Kết quả thu được cho thấy, nồng độ NAA trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng của tế bào mật nhân nuôi cấy trong môi trường lỏng (Bảng 2). Sự tích lũy sinh khối tế bào đạt cực đại trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l NAA (32,03 g tươi và 1,36 g khô) sau 15 ngày nuôi cấy, cao hơn gấp 10 lần so với lượng sinh khối

tế bào ban đầu đưa vào nuôi cấy. Khi nuôi cấy tế bào mật nhân trên môi trường có nồng độ lớn hơn hoặc nhỏ hơn 1,5 mg/l thì sinh trưởng của tế bào giảm đi đáng kể (môi trường có 2,5 mg/l NAA, đạt 25,97 g tươi và 1,09 g khô; môi trường có 0,5 mg/l NAA, chỉ đạt 19,64 g tươi và 0,74 g khô). Bùi Thị Tường Thu và cộng sự nghiên cứu cho thấy, trên môi trường nuôi cấy lỏng có bổ sung NAA, sinh khối tế bào cây hoàng lan tăng đáng kể so với nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D [12]. Nghiên cứu ở loài cam thảo dây (*Abrus precatorius*), NAA kích thích mạnh mẽ sự sinh trưởng của tế bào. Nghiên cứu tối ưu hoá quá trình nuôi cấy tế bào huyền phù cây *Saussurea medusa* để thu jaceosidin, Zhao và cộng sự (2001) đã kết luận rằng, môi trường tốt nhất cho sự sinh trưởng của tế bào là 2,0 mg/l NAA bổ sung thêm 0,2 mg/l BA sau 14 ngày nuôi cấy [13].

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng tế bào mật nhân nuôi cấy huyền phù trên môi trường bổ sung NAA

Chất ĐHTNA A (mg/l)	Khả năng sinh trưởng của tế bào mật nhân	
	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
0,5	19,64 ^c	0,74 ^e
1,0	24,70 ^d	1,05 ^d
1,5	32,03 ^a	1,36 ^a
2,0	29,84 ^b	1,27 ^b
2,5	25,97 ^c	1,09 ^c

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa ($p<0,05$)



Hình 2. Sinh khối tế bào huyền phù thu được sau 14 ngày nuôi: (A) trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l NAA; (B) trên môi trường MS bổ sung 0,5mg/l NAA.

3.3. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết tế bào

Trong y học cổ truyền, dịch chiết nước hoặc ethanol cây mật nhân thường được sử dụng để điều trị các bệnh về đường ruột, sốt rét, hoặc lở loét. Những nghiên cứu y học hiện đại về dược tính và thành phần hóa học của dịch chiết đã cho thấy, loài cây này tích lũy nhiều nhóm hoạt chất quý như: triptene, alkaloid, và glycoside [9]; đặc biệt, quassinoid là nhóm hợp chất chính của cây mật nhân với 6 hợp chất (eurycomaside, eurycolactone, eurycomalactone, eurycomanone, and pasakbumin-B, eurycomanol), và chúng quyết định tính đắng và hoạt tính kháng khuẩn của loài cây này [6]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã bước đầu đánh giá tính kháng khuẩn của dịch chiết từ tế bào callus trong sự so sánh với dịch chiết từ rễ cây tự nhiên.

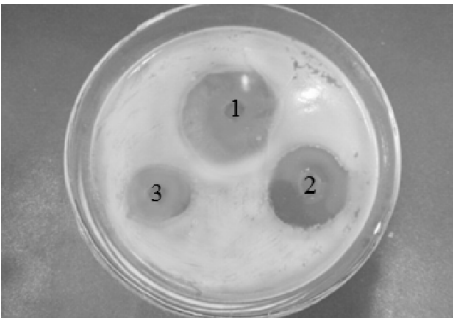
Kết quả thu được ở Bảng 3 cho thấy, dịch chiết ethanol từ tế bào callus, tế bào nuôi cấy huyền phù và rễ cây tự nhiên ở nồng độ thử nghiệm 100 mg/ml có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus cereus*; trong đó dịch

chiết ethanol từ tế bào callus có khả năng ức chế sinh trưởng vi khuẩn *B. cereus* cao nhất (đường kính vòng vô khuẩn đạt 32,1 mm), tiếp đến là dịch chiết từ tế bào nuôi cấy huyền phù (đạt 27,1 mm) và cuối cùng là dịch chiết từ rễ cây mật nhân ngoài tự nhiên (đạt 25,60 mm) (Hình 3). Ngược lại, ở vi khuẩn *Escherichia coli*, cả 03 loại dịch chiết ethanol đều không có khả năng ức chế sinh trưởng của loài vi khuẩn này. Một số nghiên cứu cũng cho thấy, khả năng kháng khuẩn của dịch chiết từ rễ của mật nhân trong tự nhiên có khả năng ức chế mạnh các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và không ức chế vi khuẩn *Escherichia coli* [1,6]. Ở kết quả nghiên cứu của chúng tôi, dịch chiết ethanol của tế bào mật nhân nuôi cấy *in vitro* có khả năng ức chế sinh trưởng vi khuẩn *Bacillus cereus* mạnh hơn dịch chiết từ tế bào rễ cây mật nhân tự nhiên. Nghiên cứu của Nikolaeva và cộng sự (2009) cũng cho thấy, các tế bào callus của cây chè nuôi cấy *in vitro* tích lũy nhiều các chất có khả năng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn [14].

Bảng 3. Khả năng ức chế sinh trưởng vi khuẩn của dịch chiết ethanol tế bào mật nhân

Vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
	Tế bào huyền phù	Tế bào callus	Tế bào rễ cây tự nhiên
<i>Bacillus cereus</i>	27,1 ^b	32,1 ^a	25,60 ^c
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng chỉ sự sai khác có ý nghĩa nhỏ nhất ($p<0,05$). Dấu “-” tương ứng không có vòng vô khuẩn



Hình 3. Khả năng kháng *Bacillus cereus*: (1) dịch chiết callus, (2) tế bào huyền phù, (3) rễ cây tự nhiên.

4. Kết luận

Từ các kết quả thu được trong nghiên cứu này, chúng tôi rút ra các kết luận sau:

- Khả năng tạo callus từ rễ cây mật nhân *in vitro* và sinh trưởng của callus tốt nhất trên môi trường MS có 3% sucrose, 0,8% agar, bổ sung 2,0 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l KIN. Callus được tạo thành có màu vàng, rắn và rời rạc.
- Tế bào callus mật nhân nuôi cấy huyền phù sinh trưởng tốt trên môi trường MS có 3% sucrose, bổ sung 1,5 mg/l NAA. Sinh khối đạt cực đại sau 15 ngày nuôi cấy, cao gấp 10 lần so với lượng sinh khối ban đầu đưa vào nuôi cấy.
- Dịch chiết ethanol từ tế bào callus và tế bào nuôi cấy huyền phù của mật nhân có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus cereus* và không có khả năng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn *Escherichia coli*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Farouk A-E, Benafri A: Antibacterial activity of *Eurycoma longifolia* Jack. A Malaysian medicinal plant. *Saudi medical journal* 2007, 28(9):1422-1424.
- [2] Gao S, Zhu D, Cai Z, Jiang Y, Xu D: Organ culture of a precious Chinese medicinal plant—*Fritillaria unibracteata*. *Plant cell, tissue and organ culture* 1999, 59(3):197-201.
- [3] Tripathi L, Tripathi JN: Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2003, 2(2):243-253.
- [4] Nakagawa K, Fukui H, Tabata M: Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus*. *Plant Cell Reports* 1986, 5(1):69-71.
- [5] Bhat R, Karim A: Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): a review on its ethnobotany and pharmacological importance. *Fitoterapia* 2010, 81(7):669-679.
- [6] Faisal G, Zakaria S, Najmuldeen G: In vitro Antibacterial activity of *Eurycoma Longifolia* Jack (Tongkat Ali) Root Extract. *The International Medical Journal of Malaysia* 2015, 14(1):77-81.
- [7] Furuya T, Yoshikawa T, Ishii T, Kajii K: Effects of auxins on growth and saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Planta medica* 1983, 47(3):183-187.
- [8] Witham FH: Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on the cytokinin requirement of soybean cotyledon and tobacco stem pith callus tissues. *Plant physiology* 1968, 43(9):1455.
- [9] Łuczkiwicz M, Glód D: Callus cultures of Genista plants—in Vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant science* 2003, 165(5):1101-1108.
- [10] Wang AS: Callus induction and plant regeneration of American ginseng. *HortScience* 1990, 25(5):571-572.
- [11] Kieran P, MacLoughlin P, Malone D: Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* 1997, 59(1):39-52.
- [12] Thu BTT, Minh TV: “Nhân nhanh hoa Hoàng Lan bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi soma”, *Tạp chí sinh học* 2011, 33(4):72-78.
- [13] Zhao D, Xing J, Li M, Lu D, Zhao Q: Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2001, 67(3):227-234.
- [14] Nikolaeva T, Zagorskina N, Zaprometov M: Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2, 4-D and NAA. *Russian Journal of Plant Physiology* 2009, 56(1):45-49.

(BBT nhận bài: 24/12/2015, phản biện xong: 09/01/2016)