# Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng nhân sinh khối rễ tơ cây Ké hoa đào (*Urena lobata*)


- **Cao Minh Đại**
- **Vũ Thị Bạch Phượng**
- **Quách Ngô Diễm Phương**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh


*(Nhận ngày 17 tháng 10 năm 2016, đăng bài ngày 26 tháng 07 năm 2017 )*


## TÓM TẮT

*Trong dân gian Việt Nam, Ké hoa đào (Urena lobata) là một loài dược liệu thường được sử dụng trong điều trị các bệnh về viêm khớp hay giảm mỡ trong gan và máu. Hiện nay trên thế giới cũng đã có rất nhiều nghiên cứu chứng minh tiềm năng của loài cây này về hoạt tính sinh học. Đặc biệt, rễ luôn là bộ phận có hoạt tính cao nhất so với toàn cây hoặc các bộ phận khác. Vì vậy, áp dụng các kĩ thuật công nghệ sinh học hiện đại trong tăng sinh khối rễ Ké hoa đào có thể được xem là bước phát triển đầy tiềm năng trong việc chủ động thu nhận sinh khối. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát một số yếu tố tác động đến khả năng tăng trưởng của rễ bao gồm mật độ nuôi cấy ban đầu, ánh sáng, môi trường khoáng và nồng độ sucrose, từ đó cải thiện một số yếu tố trong nuôi cấy nhân sinh khối rễ tơ Ké hoa đào. Kết quả cho thấy, mật độ nuôi cấy ban đầu (10 g/L), ánh sáng (cường độ 3000 lux), môi trường nuôi cấy WPM giữ nguyên nồng độ khoáng đa lượng bổ sung 4 % sucrose là thích hợp cho sự tăng sinh khối rễ. Khi áp dụng kết hợp các yếu tố đã được cải thiện, chúng tôi có thể thu nhận được sinh khối rễ tơ với trọng lượng tươi tăng 2,01 lần và khô tăng 1,94 lần so với điều kiện nuôi cấy ban đầu.*


***Từ khóa**: nhân sinh khối, nuôi cấy rễ tơ, Urena lobata, yếu tố tăng trưởng*

## MỞ ĐẦU

Cây Ké hoa đào (*Urena lobata*) là một loài cây thân thảo sống lâu năm, thường phân bố ở những nơi có khí hậu nhiệt đới như Việt Nam, từ lâu đã được sử dụng như một bài thuốc dân gian điều trị bệnh hiệu quả. Theo từ điển Cây thuốc Việt Nam cũng như sách Cây thuốc và động vật làm thuốc, rễ Ké hoa đào có thể được sử dụng để chữa thấp khớp, cảm cúm, viêm ruột, tiêu hóa kém, sốt rét, bướu giáp [1]. Trong những năm gần đây, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu liên quan đến hoạt tính sinh học và dược tính của loài thực vật này như: kháng khuẩn, kháng oxy hóa, kháng phân chia tế bào ung thư hay giảm hàm lượng đường huyết trên chuột bị tiểu đường. Thêm vào đó, nhiều công bố cũng cho thấy trong cây chứa một số hợp chất thứ cấp quan trọng như: quercetin, kaempferol, saponin,… có nhiều ứng dụng cho ngành công nghiệp sản xuất dược liệu [2–4]. Điều quan trọng là trong các nghiên cứu gần đây, rễ luôn là bộ phận được tập trung nghiên cứu nhiều nhất [2–4]. Tuy nhiên hiện nay trên thế giới vẫn chưa có bất kì công bố nào liên quan đến khả năng nuôi cấy và thu nhận nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng này.

Rễ tơ được tạo ra do sự chuyển gene sử dụng hệ thống vector tự nhiên từ *Agrobacterium rhizogenes* từ lâu đã được xác định là một trong những nguồn thu nhận sinh khối và hợp chất thứ cấp có hiệu quả cao

hơn so với các phương pháp khác. Với nhiều ưu điểm vượt trội, nuôi cấy rễ tơ từ lâu đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như sản xuất hợp chất thứ cấp, tìm hiểu con đường sinh tổng hợp hợp chất có hoạt tính sinh học hay sản xuất protein tái tổ hợp. Tuy nhiên, để thu nhận nguồn nguyên liệu này một cách hiệu quả và chủ động, cần áp dụng một số yếu tố và điều kiện đã được chứng minh là có khả năng cải thiện sự tăng trưởng của rễ tơ khi được tối ưu hóa như: mật độ nuôi cấy ban đầu, điều kiện ánh sáng, hàm lượng dinh dưỡng…[5–8]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm chứng minh tác động của một số yếu tố có ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng sinh khối rễ tơ cây Ké hoa đào, từ đó có thể chủ động thu nhận nguồn dược liệu đầy tiềm năng này.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Quy trình nuôi cấy rễ tơ cây Ké hoa đào

Rễ tơ cảm ứng bởi chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATTC 15834 từ lá cây Ké hoa đào *in vitro* 15 ngày tuổi được sử dụng cho các thí nghiệm. Rễ tơ được chuyển sang môi trường nuôi cấy lỏng lắc với mật độ nuôi cấy ban đầu là 10 g FW/L (cân 0,2 g/20 mL môi trường) trong bình erlen 250 mL, môi trường được sử dụng ban đầu là MS lỏng có bổ sung sucrose 3 %; pH 5,7 và không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật, được đặt trên máy lắc với vận tốc 60–80 vòng/phút, ở 22–25 °C, điều kiện tối hoàn toàn.

### Khảo sát một số yếu tố tác động đến sự tăng trưởng rễ tơ

Rễ tơ được cắt và cấy chuyền qua môi trường lỏng lắc ban đầu, sau 15 ngày tuổi được chuyển sang các môi trường nuôi cấy lỏng lắc với các yếu tố khảo sát được thiết lập: mật độ nuôi cấy ban đầu: 5, 10, 15 g/L, các loại môi trường MS, B5, WPM ở các nồng độ khoáng đa lượng tăng gấp đôi, giữ nguyên, giảm một nửa và giảm còn một phần tư (kí hiệu lần lượt là: 2, 1, ½, ¼), hàm lượng sucrose bổ sung: 1, 2, 3, 4 và 5 %, điều kiện chiếu sáng là sáng (3000 lux) hoặc tối hoàn toàn. Trừ các yếu tố được khảo sát, các yếu tố khác được cố định và giữ nguyên như trong quy trình nuôi cấy ban đầu. Tất cả các thí nghiệm khảo sát việc ứng dụng các điều kiện tăng năng suất thu nhận sinh khối rễ tơ Ké hoa đào đều có cùng chỉ tiêu theo dõi là sự tăng trưởng và phát triển của rễ tơ bằng trọng lượng tươi (FW) và khô (DW) sau mỗi 5 ngày nuôi cấy.

Mỗi thí nghiệm được thiết kế khảo sát từng yếu tố riêng lẻ và được lặp lại 3 lần ở mỗi nghiệm thức, số liệu được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1, phân nhóm các giá trị bằng phương pháp Duncan với p = 0,05.

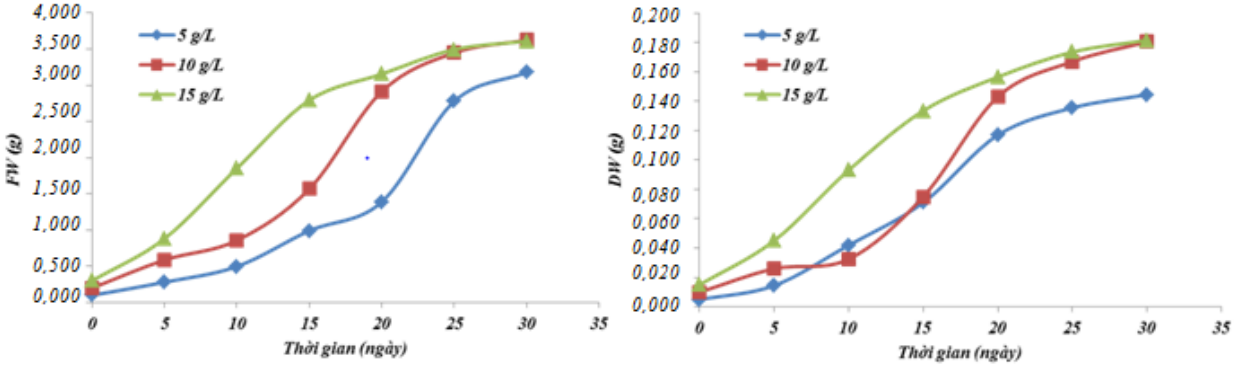
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tác động của mật độ nuôi cấy ban đầu

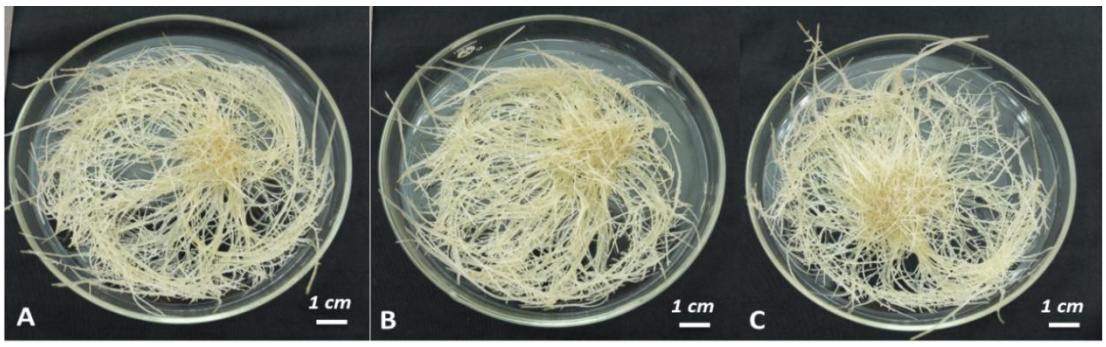
Kết quả nuôi cấy rễ tơ cây Ké hoa đào được trình bày trong Hình 1 và 2. Rễ tơ ở các mật độ nuôi cấy ban đầu khảo sát đều đạt đến pha ổn định sau 30 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên khi so sánh sinh khối ngày 30 ở các nghiệm thức: mật độ nuôi cấy ban đầu (10 và 15 g/L) đạt trọng lượng tươi (FW = 3,625 ± 0,128 g; 3,610 ± 0,018 g) và khô (DW = 0,181 ± 0,012 g; 0,182 ± 0,004 g) cùng phân hạng và lớn hơn so với mật độ 5 g/L (FW = 3,180 ± 0,037 g và DW = 0,145 ± 0,004 g) và có sự khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5 %.

Trong nuôi cấy rễ tơ, nếu mật độ quá thấp dẫn đến pha khởi đầu kéo dài, tế bào rễ giảm khả năng phân chia, tốc độ tăng trưởng chậm. Tăng mật độ nuôi cấy dẫn đến pha khởi đầu và pha tăng trưởng ngắn, tế bào rễ sẽ tăng số lần phân chia, tốc độ tăng trưởng tăng. Tuy nhiên, mật độ nuôi cấy ban đầu nếu quá cao dẫn đến sự thiếu oxygen trong môi trường nuôi cấy do sự phát triển nhanh của rễ. Nhận định này có thể được xem là phù hợp với rễ tơ Ké hoa đào, khi ở mật độ nuôi cấy ban đầu 5 g/L, rễ tơ có thời gian bắt đầu pha tăng trưởng (15 ngày) chậm hơn so với hai nghiệm thức còn lại. Trong khi đó, ở mật độ nuôi cấy ban đầu 15 g/L, rễ tơ có thời gian bắt đầu pha tăng trưởng nhanh nhất (5 ngày) tuy nhiên rễ phát triển chậm lại ở ngày thứ 15 và lượng sinh khối thu được sau 30 ngày chỉ ngang bằng mật độ nuôi cấy 10 g/L.

Tương tự với kết quả trên, Wu và cộng sự (2006) khi khảo sát sự tăng trưởng của rễ tơ cây Cúc nhím (*Echinacea angustifolia*) cũng là một loài cây thân thảo ở các mật độ từ 2,5 đến 20 g/L cho sinh khối và tốc độ tăng trưởng tốt nhất ở mật độ nuôi cấy trung bình 10 g/L [9]. Do đó, trong các nghiệm thức khảo sát, mật độ nuôi cấy ban đầu 10 g/L có thể được xem là thích hợp cho sự tăng sinh khối rễ tơ Ké hoa đào.



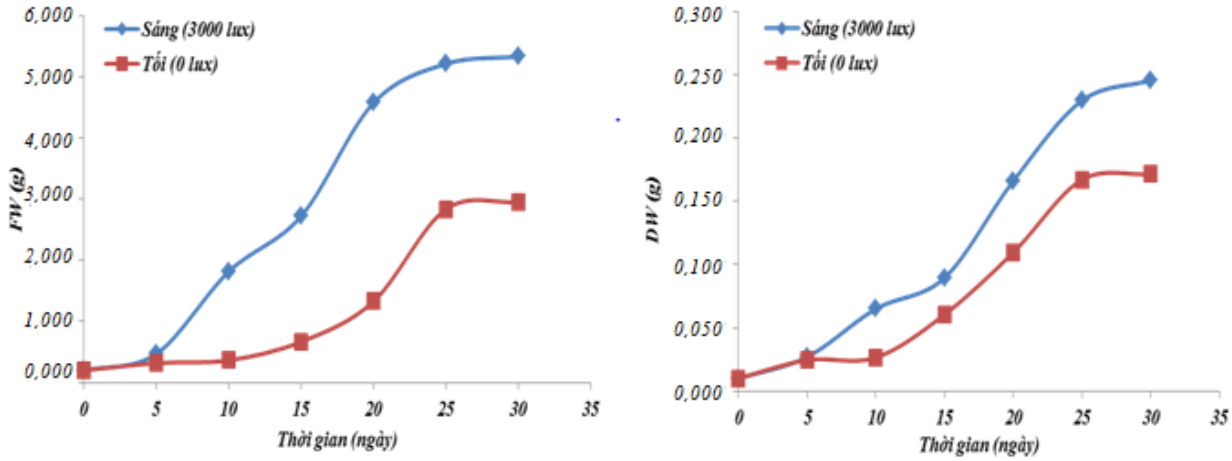

**Hình 1.** Đường cong tăng trưởng của rễ tơ ở các mật độ nuôi cấy khác nhau



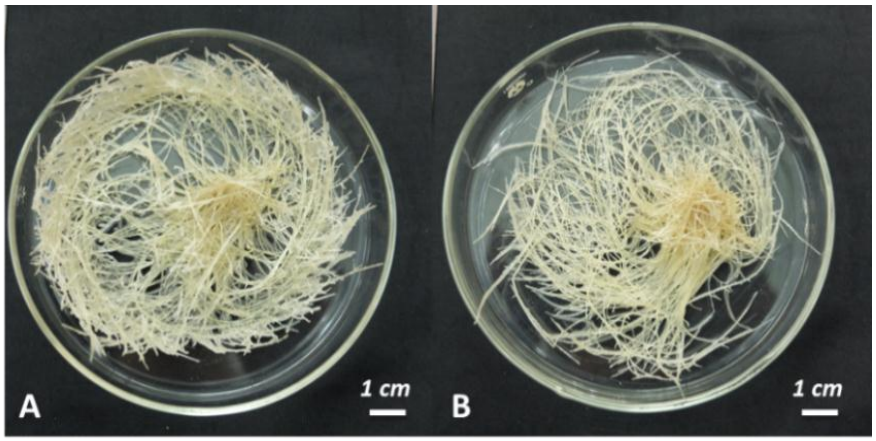

**Hình 2.** Rễ tơ ở các mật độ nuôi cấy ban đầu khác nhau sau 30 ngày (A: 5 g/L, B: 10 g/L, C: 15 g/L)

**Tác động của ánh sáng**

Kết quả nuôi cấy rễ tơ cây Ké hoa đào và đường cong tăng trưởng sau 30 ngày ở các điều kiện ánh sáng khác nhau được trình bày trong Hình 3 và 4. Rễ tơ ở các điều kiện ánh sáng khảo sát đều đạt đến pha ổn định sau 30 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên khi so sánh sinh khối ngày 30 ở các nghiệm thức: ở điều kiện chiếu sáng (cường độ 3000 lux) cho trọng lượng tươi và khô (FW = 5,333 ± 0,124 g và DW = 0,248 ± 0,008 g) đều lớn hơn so với nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn (FW = 2,955 ± 0,098 g và DW = 0,172 ± 0,004 g) và có sự khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5 %. Tương tự với kết quả trên, nghiên cứu của Liu và cộng sự (2002) cũng cho thấy thời gian chiếu sáng liên tục với cường độ 3000 lux là thích hợp cho sự tăng sinh khối rễ tơ cây Thanh hao hoa vàng (*Atermisia annua*) bởi khi tăng sự chiếu sáng trong thời gian dài sẽ làm tăng sự hấp thụ dinh dưỡng và tích lũy carbohydrate trong rễ [7]. Thêm vào đó, Bustrom và cộng sự (1960) đã chứng minh trong điều kiện nuôi cấy tối hoàn toàn, EDTA ở dạng chelate tạo phức với sắt trong môi trường nuôi cấy có thể ngăn chặn sự phát triển của rễ ở một số loài thực vật [10]. Như vậy, việc chiếu sáng liên tục (cường độ 3000 lux) có thể được xem là điều kiện thích hợp trong tăng sinh khối rễ tơ Ké hoa đào.




**Hình 3.** Đường cong tăng trưởng của rễ tơ ở các điều kiện chiếu sáng khác nhau (các số trong hình dùng dấu phẩy)

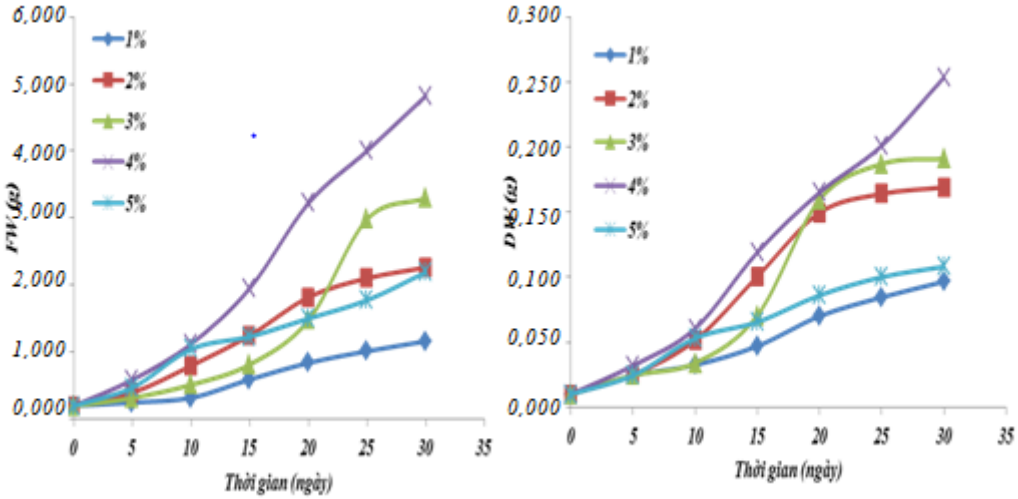



**Hình 4.** Rễ tơ ở điều kiện chiếu sáng khác nhau (A: sáng, B: tối)

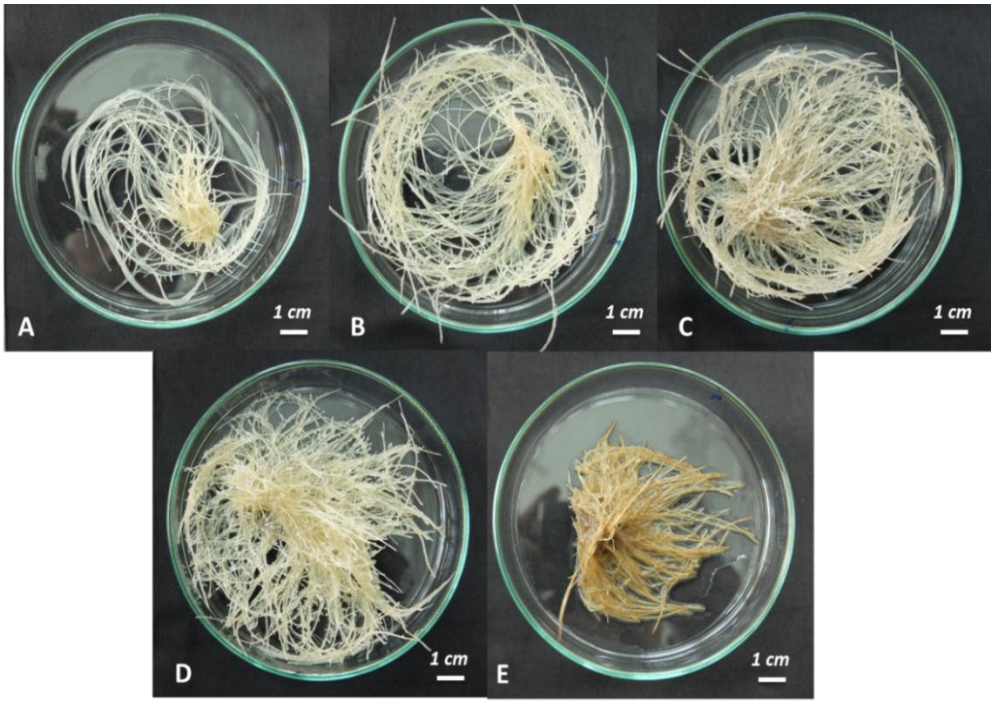
**Tác động của hàm lượng sucrose bổ sung vào môi trường nuôi cấy**

Kết quả nuôi cấy rễ tơ cây Ké hoa đào và đường cong tăng trưởng sau 30 ngày ở các nồng độ sucrose khác nhau được trình bày trong Hình 5 và 6. Ngoại trừ rễ tơ ở nồng độ sucrose 4 % vẫn tiếp tục ở pha tăng trưởng, ở các nồng độ sucrose còn lại đều đạt đến pha ổn định sau 30 ngày nuôi cấy. So sánh sinh khối rễ ngày thứ 30 ở các nghiệm thức cho thấy hàm lượng sucrose có tác động đến khả năng phát triển của rễ tơ. Tỉ lệ sucrose bổ sung càng cao thì sinh khối của rễ càng tăng do tế bào thực vật thường phân giải đường làm nguồn carbon cho sự tăng trưởng, tuy nhiên ở nồng độ cao nhất (5 %) rễ phát triển chậm và bắt đầu hóa nâu ở ngày 15 có thể là do stress thẩm thấu [6]. Rễ tơ được nuôi cấy ở môi trường bổ sung sucrose 4 % có trọng lượng tươi và khô (FW = 4,825 ± 0,141 g và DW = 0,254 ± 0,008 g) gấp 1,46 lần trọng lượng tươi và 1,33 lần trọng lượng khô so với môi trường ban đầu (sucrose 3 %) và có sự khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5 %. Tương tự với kết quả nghiên cứu trên rễ tơ cây Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana*) khi khảo sát ở các nồng độ sucrose từ 1–6 % cho thấy sucrose 4 % cho hiệu quả tăng sinh khối tốt hơn các nồng độ còn lại [6]. Điều này có thể được giải thích do nhu cầu về nguồn carbon cần thiết cho sự tăng sinh khối rễ có thể mang nhiều tính tương đồng khi khảo sát ở cùng những loài thân thảo như Cỏ ngọt và

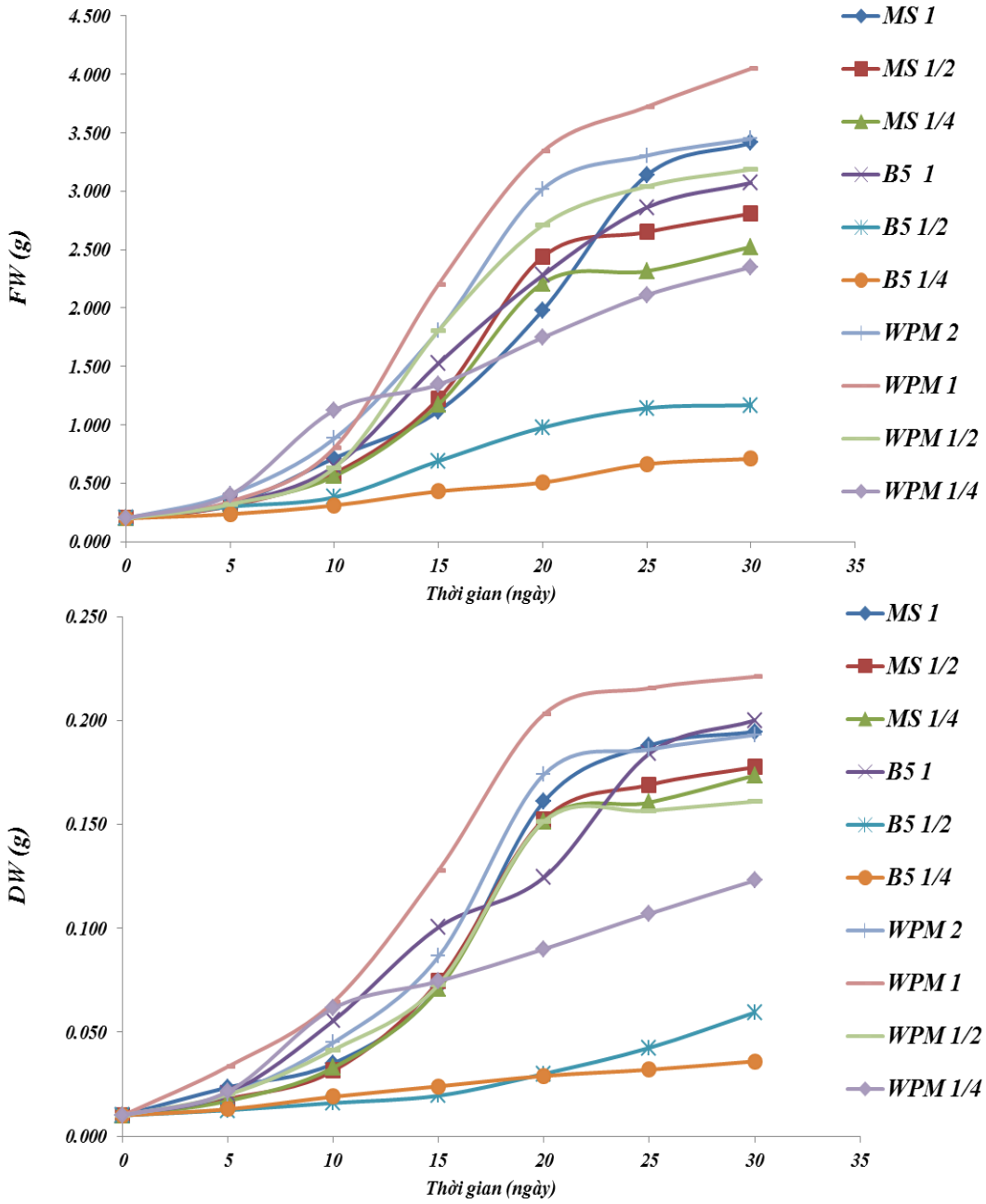
Ké hoa đào. Do đó, trong phạm vi khảo sát, nồng độ sucrose 4 % có thể được xem là thích hợp cho việc tăng sinh khối rễ tơ Ké hoa đào.



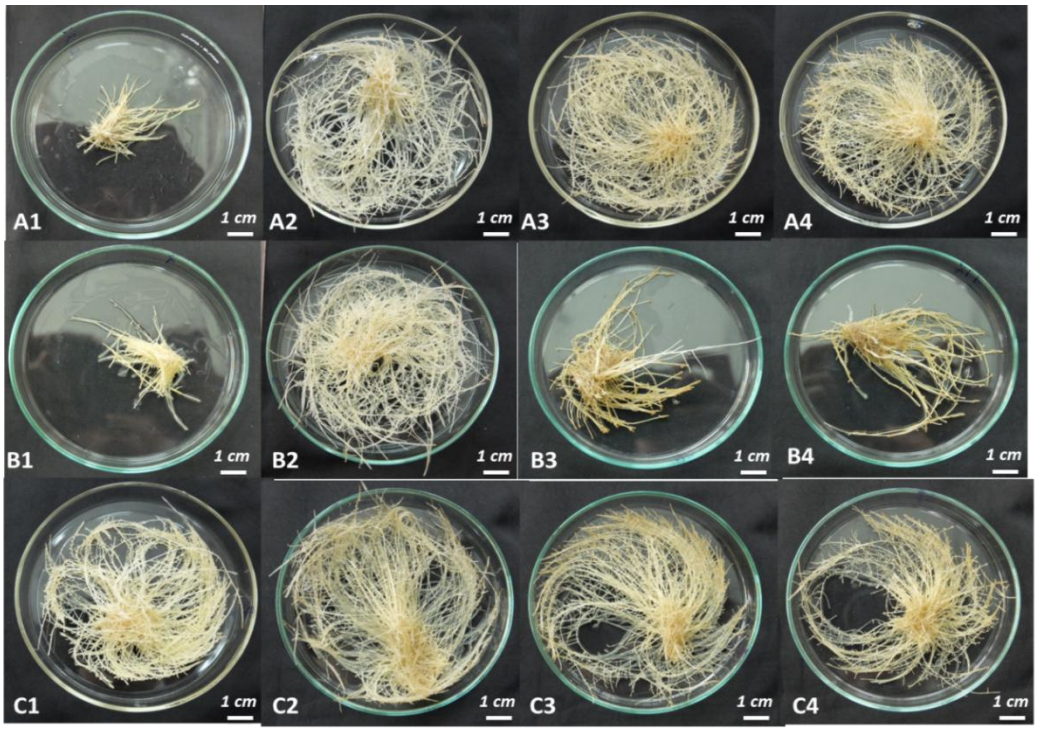

**Hình 5**. Đường cong tăng trưởng của rễ tơ ở các nồng độ sucrose khác nhau các số trong hình dùng dấu phẩy




**Hình 6.** Rễ tơ ở các nồng độ sucrose khác nhau (A: 1 %, B: 2 %, C: 3 %, D: 4 %, E: 5 %)



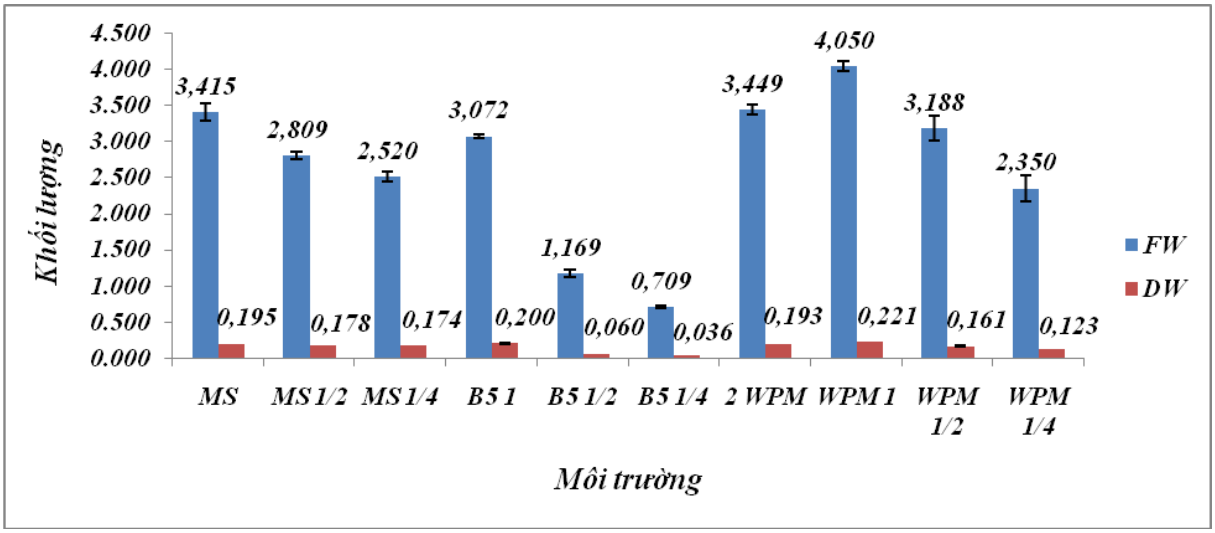

**Hình 7.** Đường cong tăng trưởng của rễ tơ ở các loại môi trường có tỉ lệ khoáng khác nhau các số trong hình dùng dấu phẩy




**Hình 8.** Rễ tơ ở các loại môi trường và tỉ lệ khoáng đa lượng khác nhau (A1, 2, 3, 4; B1, 2, 3, 4; C1, 2, 3, 4 theo thứ tự là các môi trường MS, B5, WPM có nồng độ khoáng tăng gấp đôi, giữ nguyên, giảm một nửa, giảm còn một phần tư)

Kết quả nuôi cấy rễ tơ cây Ké hoa đào và đường cong tăng trưởng sau 30 ngày ở các loại môi trường và nồng độ khoáng đa lượng khác nhau được trình bày trong Hình 7, 8. Kết quả cho thấy sinh khối rễ tơ Ké hoa đào tỉ lệ thuận với nồng độ khoáng đa lượng khi gia tăng tới một mức độ nhất định. So sánh trọng lượng rễ tơ vào ngày thứ 30 ở các nghiệm thức (Hình 9), môi trường WPM giữ nguyên nồng độ khoáng đa lượng đạt trọng lượng tươi (FW=4,050±0,074 g) và khô (DW=0,221 ±0,003 g) lớn hơn tất cả các môi trường còn lại, gấp 1,19 lần trọng lượng tươi (FW) và 1,14 lần trọng lượng khô (DW) so với môi trường ban đầu (MS giữ nguyên nồng độ khoáng đa lượng) và sự khác biệt này đều có ý nghĩa thống kê ở mức 5 %.

Kết quả này là phù hợp với nhận định môi trường WPM có tỉ lệ dinh dưỡng trung bình nhưng hàm lượng vitamine thiamin (B1) cao gấp 10 lần so với môi trường MS nên có tác dụng tốt cho quá trình trao đổi chất, giúp rễ có thể hấp thụ trực tiếp các loại vitamine trong môi trường nuôi cấy [11]. Tương tự với kết quả trên, khi nghiên cứu về tác động của 3 loại môi trường MS, B5, WPM đến khả năng nhân sinh khối của rễ tơ cây Cỏ ca ri (*Trigonella foenum-graecum*), Merkli và cộng sự [12] đã chứng minh sau 35 ngày nuôi cấy, WPM là môi trường cho tốc độ tăng trưởng và sinh khối tốt nhất. Một nghiên cứu khác với kết quả tương tự của Wu và cộng sự (2006) [9] đã đưa ra nhận định khoáng đa lượng bổ sung vào môi trường với nồng độ thấp vừa phải làm tăng sự phát triển của rễ vì khi đó rễ sẽ tăng sự hấp thụ các ion sẵn có, nồng độ khoáng đa lượng quá cao lại giảm tăng trưởng rễ do thế nước của môi trường thấp cản trở sự hấp thụ nước và dinh dưỡng khoáng vào rễ. Do đó, trong phạm vi khảo sát, hàm lượng vitamin B1 cao cùng với tỉ lệ dinh dưỡng trung bình trong môi trường WPM giữ nguyên nồng độ khoáng đa lượng có thể được xem là thích hợp cho việc tăng sinh khối rễ tơ Ké hoa đào.

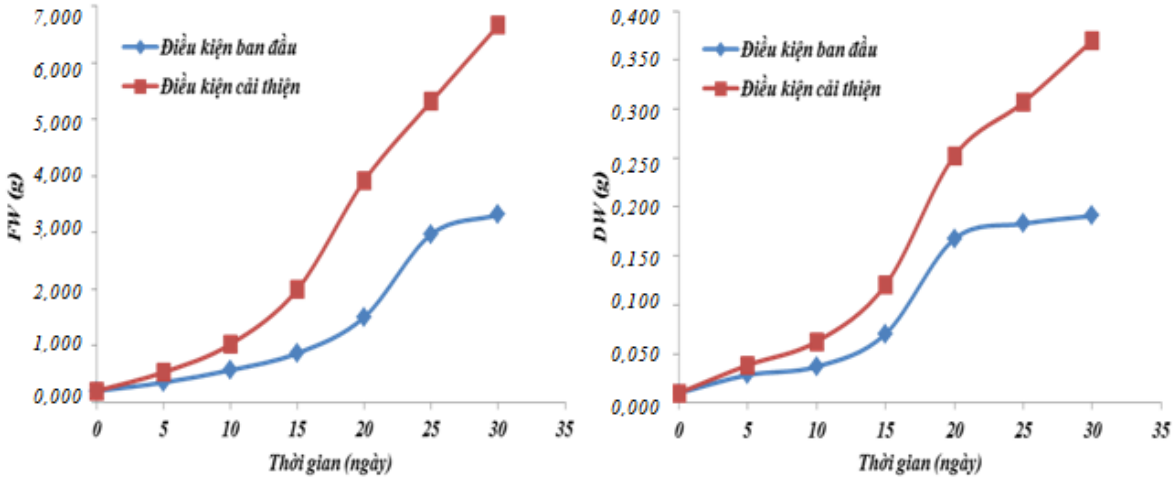



**Hình 9**. Trọng lượng rễ tơ ở các loại môi trường khác nhau sau 30 ngày nuôi cấy

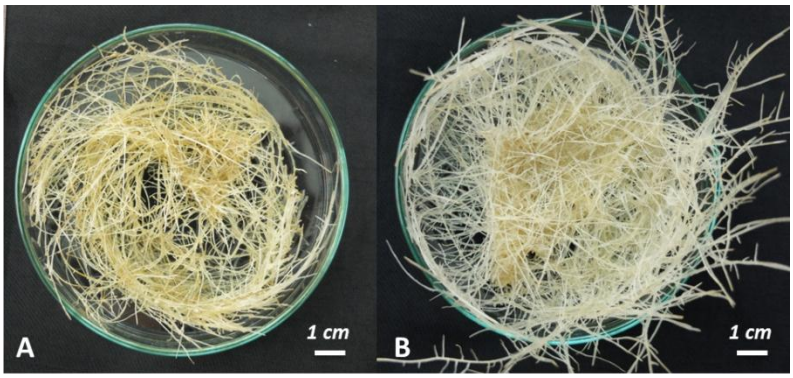
(Số lẻ trong hình ghi dấu phẩy)

**Kiểm tra hiệu quả kết hợp của các yếu tố được cải thiện tác động đến sự tăng trưởng của rễ tơ**

Rễ tơ được nuôi cấy lỏng lắc trong các điều kiện đã được cải thiện: mật độ nuôi cấy ban đầu 10 g/L, môi trường nuôi cấy là WPM bổ sung sucrose nồng độ 4 % trong điều kiện chiếu sáng liên tục (3000 lux). Sau 30 ngày, rễ tơ được thu nhận và so sánh với rễ nuôi trong điều kiện ban đầu (Hình 10 và 11). Rễ tơ trong điều kiện nuôi cấy ban đầu tiến tới pha ổn định ở ngày thứ 25, rễ bắt đầu hóa nâu và giảm tăng trưởng. Trong khi đó, ở môi trường đã được cải thiện, rễ tơ vẫn tiếp tục duy trì pha tăng trưởng sau 30 ngày nuôi cấy. Trọng lượng tươi (FW = 6,662 ± 0,197 g) và khô (DW = 0,370 ± 0,018 g) vào ngày thứ 30 của rễ tơ nuôi cấy trong các điều kiện cải thiện gấp 2,01 lần trọng lượng tươi và 1,94 lần trọng lượng khô so với môi trường ban đầu và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức 5 %.




**Hình 10.** Đường cong tăng trưởng của rễ tơ ở các điều kiện đã được cải thiện so với ban đầu




**Hình 11.** Rễ tơ Ké hoa đào (A: môi trường nuôi cấy ban đầu, B: môi trường đã được cải thiện các yếu tố)

**KẾT LUẬN**

Từ các kết quả thí nghiệm thu được, chúng tôi đề xuất cải thiện một số yếu tố nhân sinh khối rễ tơ Ké hoa đào trong môi trường lỏng lắc như sau: mật độ nuôi cấy ban đầu (10 g/L), điều kiện ánh sáng (3000 lux), môi trường WPM giữ nguyên nồng độ khoáng đa lượng bổ sung 4 % sucrose. Với những yếu tố đã được cải tiến hoàn toàn có thể chủ động trong việc tăng cường thu nhận nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng này.

***Lời cảm ơn:*** *Xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ nghiên cứu này.*

# Effect of growth factors on the production of biomass of the hairy root of *Urena lobata*


- **Cao Minh Dai**
- **Vu Thi Bach Phuong**
- **Quach Ngo Diem Phuong**

University of Science, Vietnam National University-Ho Chi Minh City



**ABSTRACT**

*Urena lobata, one of the traditional medicine, is used to treat inflammation, arthritis or improve lipid profiles in liver and blood. There also has been a lot of studies in the world about its potential biological activities. Interestingly, root extract usually has higher biological activities than the whole plant or other parts. Therefore, applying several modern biotechnology techniques could help to initially obtain this potential resource. In this research, we demonstrated the application of some growth factors which can increase the biomass of hairy root such as: inoculum density, light condition, medium and proportion of marco-nutrient. The results showed that when hairy roots were cultured at the inoculum density of 10 g/L FW, under illumination at 3000 lux, WPM medium supplemented 4 % sucrose were more suitable for the growth of hairy root. At the same time, when all these factors were put fogther the haing root grouthr was improved. The fresh weight (FW) and dry weight (DW) increased 2.01-fold and 1.94-fold, respectively.*


***Keywords****: biomass increasement, growth factors, hairy root culture, Urena lobata*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO


[1]. P.C. Tuấn, Cần phát huy tác dụng cây thuốc Ké hoa đào, *Tạp chí Dược liệu và Đời sống*, 164, 11–13 (2014).

[2].I.O. Onoagbe, E.O. Negbenebor, V.O. Ogbeibe, I.H. Dawha, V. Attah, H.U. Lau, A.A. Omonkhua, A study of the anti-diabetic effects of *Urena lobata* and *Spenostylist stenocarpa* in streptozotocin-induced diabetic rats, *European Journal of Scientific Research*, 43, 1, 6–14 (2010).

[3]. M. Roshid, A.U. Chouduri, Antibacterial, anti-swarming potential of ethanol extracts of *Physalis minima* L. whole plant and *Urena lobata* L. root on cephalosporin resistant *Proteus* species, *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 3, 5, 184–195 (2014).

[4]. K.P. Lissy, T.K. Simon, M.S. Latha, Antioxidant potential of *Sida retusa*, *Urena lobata* and *Triumfetta rhomboidea*, *Ancient Science of Life*, 15, 3&4, 10–15 (2006).

[5]. Q. Liu, L. Cui, Y. Guo, X. Ni, Y. Zhang, G. Kai, Optimization of nutritive factors in culture media for growth and tropane alkaloid production from *Anisodus acutangulus* Hairy Roots, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 1, 1–4 (2013).

[6]. X. Fu, Z.P. Yin, J.G. Chen, X.C. Shangguan, X. Wang, Q.F. Zhang, D.Y. Peng, Production of chlorogenic acid and its derivatives in hairy root culture of *Stevia rebaudiana*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 262–268 (2015).

[7].C. Liu, C. Guo, Y. Wang, F. Ouyang, Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*, 38, 581–585 (2002).

[8].J. Jeong, C.H. Wu, H.N. Murthy, E.J. Hahn, K.Y. Paek, Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 91–98 (2009).

[9].C.H. Wu, Y.H. Dewir, E.J. Hahn, K.Y. Paek, Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*, *Journal of Plant Biology*, 49, 3, 193–199 (2006).

[10]. H. Burstrom, Influence of iron and gibberellic acid on the light sensitivity of roots, *Physiologia Plantarum*, 13, 597–614 (1960).

[11]. N.V. Kết, N.T. Cúc, N.T. Thành, Production of *Camellia piquetiana* (Pierre) Sealy *in vitro*, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 30, 3, 17–25 (2014).

[12]. A. Merkli, P. Christen, I. Kapentanidis, Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L., *Plant Cell Reports*, 16, 632–636 (1997).