

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH VI NHÂN GIỐNG CÂY ĐĂNG SÂM (*Codonopsis javanica*)

Trịnh Thị Hương^{1*}, Nguyễn Đình Triều Vũ^{1,2}, Hoàng Thị Thuỳ Dương¹

¹Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

²Trung tâm nghiên cứu công nghệ và Sở hữu trí tuệ CIPTEK

*Email: huongtt@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 16/01/2025; Ngày chấp nhận đăng: 17/2/2025

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, quy trình vi nhân giống cây đăng sâm (*Codonopsis javanica*) - một loài cây thân thảo sống lâu năm và có giá trị dược liệu cao đã được tiến hành thực hiện. Các mẫu đốt thân của cây đăng sâm được khử trùng bề mặt với dung dịch NaOCl nồng độ 10% trong các khoảng thời gian khác nhau, sau đó chúng được nuôi cấy trên môi trường để cảm ứng tạo chồi. Kết quả thu được cho thấy, mẫu đốt thân được khử trùng bề mặt với dung dịch NaOCl nồng độ 10% trong thời gian 10 phút cho tỷ lệ mẫu sạch và sống cao (83,3%). Đối với giai đoạn nhân nhanh chồi, hiệu quả nhân giống được cải thiện nhờ sử dụng cả hai loại vật liệu là mẫu đốt thân và mẫu lá của chồi *in vitro*. Môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi từ hai loại mẫu này là môi trường MS (Murashige & Skoog) bổ sung 0,75 mg/L 6-benzyladenine (BA), 30 g/L sucrose, 8 g/L agar. Sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh, số chồi đạt được là 8,67 chồi/mẫu (đối với mẫu đốt thân) và 9,83 chồi/mẫu (đối với mẫu lá). Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng việc sử dụng indole-3-butyric acid (IBA) thích hợp cho sự hình thành rễ của chồi đăng sâm hơn so với 1-naphthaleneacetic acid (NAA). Trên môi trường MS có bổ sung 0,75 mg/L IBA, tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 100% với số rễ đạt 7,08 rễ/cây, chiều cao cây đạt 5,89 cm và khối lượng tươi của cây là 198,3 mg. Sau 4 tuần chuyển ra vườn ươm, tỷ lệ cây con sống đạt được cao nhất (92%) ở môi trường này. Nghiên cứu đã đưa ra được một quy trình vi nhân giống cây đăng sâm hiệu quả có thể áp dụng rộng rãi để sản xuất cây giống đăng sâm với số lượng lớn đáp ứng nhu cầu thương mại, đồng thời góp phần bảo tồn và phát triển nguồn cây dược liệu có giá trị.

Từ khóa: BA, cây đăng sâm, IBA, NAA, vi nhân giống.

1. MỞ ĐẦU

Đăng sâm (*Codonopsis javanica*) hay còn gọi là sâm dây thuộc họ hoa chuông, là loài thân thảo, sống nhiều năm. Đây là một trong những loại cây có giá trị dược liệu cao [1] đã được đưa vào từ điển cây thuốc Việt Nam [2]. Đăng sâm được ví như nhân sâm của người nghèo dùng làm thuốc bồi bổ cơ thể, tỳ vị yếu, thiếu máu do mới ốm dậy, đau dạ dày, ho, viêm thận, nước tiểu có albumin. Củ được dùng để ngâm rượu hay ngâm mật ong uống hoặc hầm canh, lá nấu canh giúp giải nhiệt cơ thể, làm mát gan. Bên cạnh đó, đăng sâm được dùng trong những bài thuốc chữa đau răng, đau bụng, cảm mạo, bệnh gan, cao huyết áp, tiểu đường. Bộ phận chứa nhiều hợp chất có giá trị dược liệu ở cây đăng sâm là rễ củ, nên khi khai thác toàn bộ phần rễ bị đào lên, không còn khả năng tái sinh. Đây cũng là nguyên nhân khiến số lượng cây đăng sâm ngày càng suy giảm trong tự nhiên, đặc biệt là cây trưởng thành. Phân tích thành phần hoá học cho thấy, trong rễ cây đăng sâm có chứa các hợp chất như flavonoid, alkaloid, glycosid tim, anthranoid, saponin, tanin, đường khử, acid hữu cơ, tinh bột và chất béo [3].

Hiện nay, nhu cầu của con người về sử dụng các loại cây dược liệu ngày càng gia tăng, vì vậy nhu cầu về nguồn cây giống đăng sâm là rất lớn. Đăng sâm được nhân giống vô tính bằng cách sử dụng đoạn thân hay củ rễ củ, hoặc nhân giống bằng gieo hạt. Trong đó, nhân giống từ rễ củ thường được người dân sử dụng chủ yếu. Biện pháp nhân giống bằng hạt ít được áp dụng vì hạt có thể bị côn trùng cắn phá và tỷ lệ nảy mầm của hạt thấp (khoảng 30%), thêm vào đó là cây trồng bằng hạt có thời gian thu hoạch chậm và năng suất thấp [4]. Phương pháp nhân giống bằng giâm hom đoạn thân cũng được báo cáo là không đạt hiệu quả cao, với tỷ lệ sống dao động từ 23,33 - 63,33% khi các đoạn thân được xử lý với

NAA để kích thích tạo rễ [5]. Mặc dù các phương pháp nhân giống truyền thống này đang được sử dụng phổ biến, nhưng chúng có nhược điểm là cây giống không đồng đều, năng suất thấp và bị phụ thuộc vào vườn được chọn để lấy nguồn giống cây mẹ, chẳng hạn như yêu cầu cây mẹ không bị sâu bệnh, hay cần thời gian cho cây mẹ trưởng thành để thu hoạch hạt hoặc rễ củ. Vi nhân giống là phương pháp nhân giống thực vật hiệu quả có thể khắc phục được những nhược điểm của phương pháp nhân giống truyền thống. Kỹ thuật này cho phép sản xuất cây giống đồng nhất, sạch bệnh với số lượng lớn trong thời gian ngắn một cách chủ động mà không bị phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên, từ đó có thể đáp ứng được nhu cầu cây giống cho các khu vực trồng cây dược liệu có quy mô lớn. Cây giống được sản xuất bằng hình thức vi nhân giống giữ được các đặc tính vốn có của cây mẹ, điều này có ý nghĩa rất lớn đối với các loài cây dược liệu, vì nhiều hợp chất thứ cấp chỉ được tích lũy khi cây đạt được độ tuổi nhất định, và cây giống có nguồn gốc từ những cây mẹ này có khả năng tích lũy hợp chất thứ cấp cao hơn.

Để đáp ứng được nhu cầu ngày càng lớn của thị trường cây dược liệu hiện nay, việc sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cây đẳng sâm là rất cần thiết. Đã có một số công bố thực hiện nhân giống *in vitro* cây đẳng sâm được báo cáo trong nước như: nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của cây đẳng sâm (*C. javanica*) trong điều kiện *in vitro* [6], nghiên cứu nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô từ vật liệu ban đầu là hạt ở loài *C. javanica* [7] và loài *C. lanceolata* [8]; nhân giống *in vitro* cây đẳng sâm (*C. javanica*) từ mô sẹo [9], đánh giá ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến sự phát triển của cây đẳng sâm nuôi cấy mô giai đoạn vườn ươm [10]. Trên thế giới, các nghiên cứu tập trung nhiều ở loài *C. pilosula* (Franch.) Nannf. như nghiên cứu nhân giống *in vitro* bằng cách sử dụng các đoạn chồi đỉnh [11] hoặc chồi nách từ đốt thân [12]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm hướng tới xây dựng một quy trình vi nhân giống hoàn chỉnh và sử dụng các nguồn mẫu khác nhau ở giai đoạn nhân nhanh chồi để nâng cao hệ số nhân giống, từ đó đưa ra được một quy trình vi nhân giống cây đẳng sâm hiệu quả có thể áp dụng rộng rãi để sản xuất cây giống đẳng sâm với số lượng lớn đáp ứng nhu cầu thương mại, đồng thời góp phần bảo tồn và phát triển nguồn cây dược liệu có giá trị.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Nguồn vật liệu thực vật được sử dụng trong nghiên cứu là đoạn đốt thân của cây đẳng sâm (*C. javanica*) trồng ở vườn ươm. Cây đẳng sâm này có nguồn gốc từ rễ củ 2,5 năm tuổi thu hái từ khu vực trồng đẳng sâm của huyện Tư Mờ Rông, tỉnh Kon Tum, sau đó mang về giám củ ở vườn thực nghiệm (tại TP.HCM) để thu nhận các đoạn thân, đem khử trùng và nuôi cấy mẫu tạo nguồn vật liệu chồi *in vitro* ban đầu.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong nghiên cứu này là môi trường MS [13] bổ sung 30 g/L sucrose (Việt Nam), 8 g/L agar (Việt Nam). Tùy vào mục đích của từng thí nghiệm mà các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CDHSTTV) được bổ sung vào với nồng độ khác nhau. Tất cả môi trường được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121 °C, 1 atm trong 15 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp khử trùng mẫu đốt thân và cảm ứng tạo chồi *in vitro*

Cây đẳng sâm 2 tháng tuổi mọc từ rễ củ trồng ở vườn ươm được sử dụng làm cây mẹ để thu hái các mẫu đoạn thân. Các đoạn thân này được cắt cách mặt đất 10 cm và cách chồi đỉnh 5 cm, sau đó cắt bỏ lá và cắt ngắn thành các đoạn nhỏ có chiều dài 2,0 cm, với mỗi đoạn chứa một nách lá. Tiếp theo, chúng được rửa bằng nước xà phòng loãng và rửa lại dưới vòi nước để loại bỏ bụi bẩn bám trên bề mặt. Sau đó, trong không gian tủ cấy vô trùng, các đoạn đốt thân được tiến hành khử trùng với dung dịch ethanol (cồn) 70% trong 1 phút, loại bỏ cồn và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Tiếp theo, mẫu được khử trùng bằng dung dịch NaOCl (Javel, Việt Nam) 10% trong các khoảng thời gian khác nhau (5, 10, 15, 20 phút); loại bỏ dung dịch NaOCl 10% và rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng. Cuối cùng các đoạn đốt thân được cắt bỏ 2 đầu bị tổn thương sau khi khử trùng và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar để cảm ứng tạo chồi [12].

Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu đốt thân không nhiễm (%), tỷ lệ mẫu đốt thân sống và tạo chồi (%) được ghi nhận sau 2 tuần nuôi cấy.

Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%) = (Tổng số mẫu không nhiễm/Tổng số mẫu nuôi cấy) x 100.

Tỷ lệ mẫu sống và tạo chồi (%) = (Tổng số mẫu sống và tạo chồi/Tổng số mẫu nuôi cấy) x 100.

Các chồi *in vitro* hình thành từ những mẫu đốt thân đã được khử trùng thành công (Hình 3A) được duy trì ở môi trường nuôi cấy trong 4 - 6 tuần; sau đó chồi được sử dụng làm vật liệu để thu nhận lá và các đoạn đốt thân *in vitro* phục vụ cho giai đoạn nhân nhanh chồi.

2.2.2. Nghiên cứu nhân nhanh chồi cây đang sẫm

Mẫu lá và đoạn đốt thân được cắt ra từ chồi *in vitro* hình thành ở thí nghiệm trên được sử dụng làm nguồn vật liệu để nghiên cứu nhân nhanh chồi.

Mẫu đốt thân *in vitro* có chiều dài 1 cm mang một mắt chồi ngủ, và mẫu lá có kích thước 0,7x1,0 cm được nuôi cấy trên môi trường MS chứa 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và bổ sung BA (Duchefa, Hà Lan) với các nồng độ khác nhau (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/L) để theo dõi khả năng nhân nhanh chồi từ hai loại mẫu này. Đối chứng là môi trường không bổ sung BA.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), số chồi/mẫu và khối lượng tươi của cụm chồi (g).

2.2.3. Nghiên cứu khả năng ra rễ của chồi cây đang sẫm

Các mẫu chồi ngọn thu nhận được từ giai đoạn nhân nhanh chồi có chiều cao 3 cm, mang 2 cặp lá được nuôi cấy vào môi trường MS chứa 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và bổ sung auxin NAA (Duchefa, Hà Lan) hoặc IBA (Duchefa, Hà Lan) riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/L để theo dõi khả năng ra rễ của chồi. Đối chứng là môi trường không bổ sung auxin.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu ra rễ (%), số rễ/cây, chiều cao cây (cm) và khối lượng tươi của cây (g).

2.2.4. Đánh giá khả năng thích nghi của cây con ở vườn ươm

Các cây con thu nhận được từ giai đoạn ra rễ được đem trồng ở vườn ươm. Các bước thực hiện đưa cây con trồng ở vườn ươm như sau:

(1) Các bình chứa cây con sau 4 - 5 tuần nuôi cấy trên môi trường ra rễ ở điều kiện *in vitro* sẽ được chuyển ra khỏi phòng nuôi cấy và đặt ở vườn ươm trong 3 - 5 ngày để cây con tập thích nghi dần với điều kiện nhiệt độ, ánh sáng của vườn ươm.

(2) Nắp ni lông của bình chứa cây con được loại bỏ và thay bằng nắp giấy/báo để trong 1 - 2 ngày để giảm dần độ ẩm trong bình, giúp cây con quen dần với độ ẩm của vườn ươm.

(3) Cây con được lấy ra khỏi các bình nuôi và rửa bằng nước để loại bỏ agar còn dính trên bề mặt rễ. Tiếp theo, cây được trồng vào chậu nhựa chứa giá thể là đất sạch Tribat (Công ty TNHH TMDV Tribat). Cuối cùng, các chậu cây được đặt ở giàn có trang bị lưới che nắng (tỷ lệ che nắng 30%, Thái Lan) và tưới nước bằng hệ thống phun sương (sử dụng máy bơm có lưu lượng 1,8 lít/phút).

(4) Chăm sóc: Cây con được tưới nước 2 lần/ngày vào buổi sáng và chiều mát, thời gian của mỗi lần tưới là 15 phút.

Theo dõi tỷ lệ sống của cây con sau 4 tuần trồng.

Tỷ lệ sống của cây con (%) = (Tổng số cây sống/Tổng số cây đem trồng) x 100.

2.2.5. Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* được đặt trong phòng nuôi có thiết lập các điều kiện: nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 2.500 ± 200 lux.

2.2.6. Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, các thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại. Số liệu thô thu thập sẽ được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV với độ tin cậy 95%, theo phép thử LSD (Least Significant Difference), riêng đối với thí nghiệm ra rễ và tỷ lệ sống của cây con ở vườn ươm do số nghiệm thức > 5 nên sử dụng theo phép thử Duncan.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng bề mặt của mẫu đốt thân

Trong thí nghiệm này, các mẫu đốt thân cây đu đủ sẫm được khử trùng với dung dịch NaOCl 10% trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả ghi nhận sau 2 tuần nuôi cấy cho thấy, tỷ lệ mẫu không nhiễm gia tăng tỷ lệ thuận với thời gian khử trùng. Tỷ lệ mẫu đốt thân không bị nhiễm, sống và tạo chồi tăng lên rõ rệt khi gia tăng thời gian khử trùng từ 5 phút lên 10 phút (từ 46,7% tăng lên 83,3%). Ở hai khoảng thời gian 5 phút và 10 phút, tất cả mẫu không nhiễm đều sống và tạo chồi. Khi thời gian khử trùng tăng lên 15 phút và 20 phút, tỷ lệ mẫu không nhiễm gia tăng nhưng tỷ lệ mẫu sống và tạo chồi giảm dần. Với thời gian 20 phút, tỷ lệ mẫu không nhiễm đạt cao nhất (93,3%), nhưng tỷ lệ mẫu sống và tạo chồi chỉ đạt 76,7% (Bảng 1). Nguyên nhân là do thời gian khử trùng kéo dài giúp loại bỏ nhiều vi sinh vật hơn, nhưng đồng thời cũng làm gia tăng tổn thương mẫu thực vật, dẫn đến các mẫu đốt thân không bị nhiễm vi sinh vật nhưng không tạo được chồi do chồi ngủ bị tổn thương nghiêm trọng hoặc bị chết. Ngược lại, nếu thời gian khử trùng ngắn, chưa thể tiêu diệt được hết các vi sinh vật, chính vì vậy ở thời gian 5 phút, tỷ lệ mẫu không nhiễm đạt thấp nhất (46,7%) (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng trong dung dịch NaOCl 10% đến khả năng sống và tạo chồi của mẫu đốt thân

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống và tạo chồi (%)
5	46,7 ^c	46,7 ^{b*}
10	83,3 ^b	83,3 ^a
15	86,7 ^{ab}	80,0 ^a
20	93,3 ^a	76,7 ^a

*Các chữ cái a, b,...trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ý nghĩa thống kê của giá trị trung bình với độ tin cậy 95% theo phép thử LSD.

Vì tỷ lệ mẫu sống và tạo chồi là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá hiệu quả khử trùng, nên thời gian khử trùng thích hợp đối với mẫu đốt thân cây đu đủ sẫm trong thí nghiệm này là 10 phút khi dùng NaOCl ở nồng độ 10%. Khoảng thời gian khử trùng mẫu 10 phút cũng được sử dụng trong nghiên cứu của nhóm tác giả Phạm Hương Sơn và Nguyễn Thị Lài khi tiến hành khử trùng mẫu đốt thân cây đu đủ sẫm bằng dung dịch NaOCl 3%, kết quả thu được tỷ lệ mẫu sống và vô trùng cao nhất, đạt 66,5% sau 2 tuần [6]. Như vậy, kết quả đạt được về tỷ lệ mẫu sống và vô trùng ở nghiên cứu này cao hơn so với nghiên cứu của nhóm tác giả trên nếu sử dụng cùng thời gian 10 phút nhưng nồng độ của NaOCl tăng lên 10%. Một số nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây đu đủ sẫm khác cũng đã được báo cáo trong những năm gần đây, nhưng hầu hết sử dụng vật liệu ban đầu là hạt [7-9]. Nghiên cứu này sử dụng vật liệu là đoạn thân, góp phần giúp cho việc sử dụng nguồn vật liệu để vi nhân giống được đa dạng hơn. Ngoài ra, việc thu nhận đoạn thân cũng thuận tiện hơn so với hạt vì hạt chỉ thu nhận được ở thời điểm quả chín vào tháng 11 - 12 trong năm [4].

3.2. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi từ mẫu lá và đốt thân

Mẫu đốt thân sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường để bật chồi. Sau khoảng 6 tuần nuôi cấy, các chồi *in vitro* hình thành có chiều cao từ 3 cm trở lên được tách ra khỏi cụm chồi để thu nhận mẫu lá và đoạn thân dùng cho thí nghiệm nhân nhanh chồi.

Kết quả ghi nhận sau 3 tuần nuôi cấy mẫu đốt thân đu đủ sẫm trên môi trường nhân nhanh chồi cho thấy, tỷ lệ mẫu đốt thân tạo chồi đều đạt 100%. Cytokinin làm giảm hiện tượng ưu thế ngọn, tăng phân hóa cành, do vậy số lượng chồi thu được ở các nghiệm thức có bổ sung BA cao hơn đối chứng và số lượng chồi gia tăng dần khi nồng độ BA tăng từ 0,25 đến 1,0 mg/L. Do số lượng chồi tăng dần nên khối lượng tươi của cụm chồi thu được cũng tăng theo nồng độ BA (Bảng 2). Giữa hai nghiệm thức 0,75 và 1,0 mg/L BA không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê về chỉ tiêu số chồi và khối lượng cụm chồi, nhưng khối lượng tươi cụm chồi ở nồng độ 1,0 mg/L BA đang có xu hướng giảm xuống do chồi tạo thành có kích thước nhỏ hơn (Hình 1T). Ngoài ra, việc gia tăng nồng độ CĐHSTTV trong vi nhân giống không được khuyến khích bởi tăng nguy cơ tạo ra các biến dị soma hoặc hình thành dạng thủy tinh thể, dẫn tới giảm chất lượng chồi. Một số nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng, nếu gia tăng nồng độ các nhóm chất thuộc cytokinin càng cao (> 1,0 mg/L) thì số chồi/mẫu, chiều cao chồi có xu hướng

giảm dần, chồi có hiện tượng bị giảm sức sống [5, 14]. Do vậy, ở thí nghiệm này, nồng độ 0,75 mg/L BA được lựa chọn là thích hợp để bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhân nhanh chồi từ mẫu đốt thân.

Đối với mẫu lá, tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 100% ghi nhận được tại hai nghiệm thức 0,75 và 1,0 mg/L BA, trong khi ở nghiệm thức đối chứng tỷ lệ mẫu tạo chồi chỉ đạt 38%. Số chồi/mẫu và khối lượng của cụm chồi cũng đạt cao nhất ở hai nghiệm thức này (Bảng 3). Tương tự với kết quả ghi nhận ở mẫu đốt thân, thì ở thí nghiệm này, giữa hai nồng độ 0,75 và 1,00 mg/L BA không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê, nhưng nồng độ BA thích hợp được lựa chọn để nuôi cấy tạo chồi từ mẫu lá đang sẫm là 0,75 mg/L bởi các ưu điểm khi sử dụng nồng độ CĐHSTTV với nồng độ thấp hơn trong vi nhân giống.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tạo chồi từ mẫu đốt thân cây đang sẫm sau 3 tuần nuôi cấy

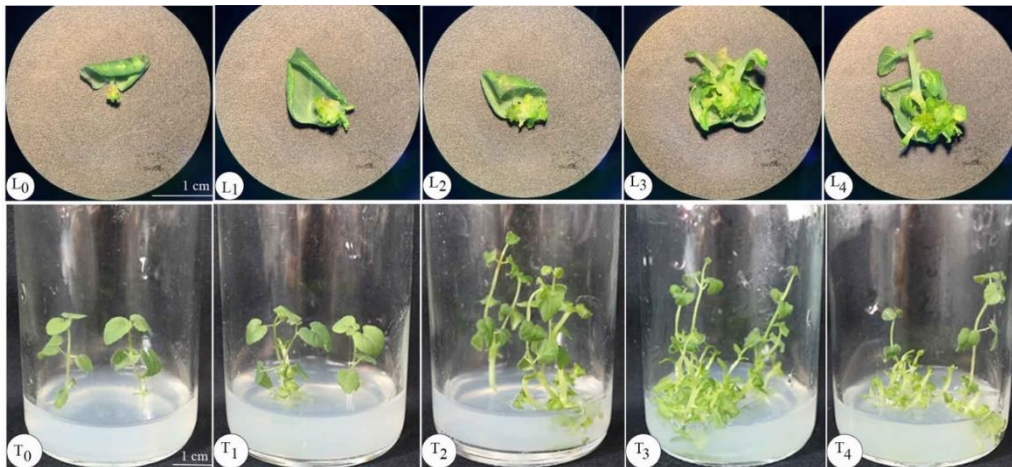
Nồng độ BA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Khối lượng cụm chồi (g)
0	1,67 ^c	47,83 ^{d*}
0,25	2,33 ^c	57,67 ^c
0,50	4,33 ^b	74,75 ^b
0,75	8,67 ^a	104,87 ^a
1,00	8,83 ^a	102,25 ^a

*Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ý nghĩa thống kê của giá trị trung bình với độ tin cậy 95% theo phép thử LSD. Chỉ đếm các chồi có chiều cao từ 5 mm trở lên.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tạo chồi từ mẫu lá cây đang sẫm sau 3 tuần nuôi cấy

Nồng độ BA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Khối lượng cụm chồi (mg)
0	38 ^d	0,67 ^d	13,63 ^{c*}
0,25	56 ^c	2,50 ^c	17,93 ^b
0,50	84 ^b	4,17 ^b	19,27 ^b
0,75	100 ^a	9,83 ^a	35,40 ^a
1,00	100 ^a	10,00 ^a	35,58 ^a

*Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ý nghĩa thống kê của giá trị trung bình với độ tin cậy 95% theo phép thử LSD. Chỉ đếm các chồi có chiều cao từ 5 mm trở lên.



Hình 1. Hình ảnh nhân nhanh chồi từ mẫu lá và mẫu đốt thân cây đang sẫm sau 3 tuần nuôi cấy. L₀-L₄: Mẫu lá nuôi cấy ở nồng độ BA tương ứng: 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/L. T₀-T₄: Mẫu đốt thân nuôi cấy ở nồng độ BA tương ứng: 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/L.

Nhận xét về khả năng tạo chồi của từ hai loại mẫu khác nhau (đốt thân và lá) có thể thấy, tại cùng nồng độ 0,75 mg/L BA, số lượng chồi tạo thành từ hai loại mẫu này không có sự khác biệt nhau nhiều (8,67 chồi/đốt thân và 9,83 chồi/lá), nhưng khối lượng của cụm chồi tạo thành từ mẫu đốt thân lớn hơn cụm chồi có nguồn gốc từ lá. Sự khác biệt này là do sự phát sinh chồi từ mẫu đốt thân diễn ra sớm hơn, dẫn tới chiều cao và đường kính của chồi phát sinh từ mẫu đốt thân lớn hơn so với chồi có nguồn gốc

từ lá (Hình 1). Đối với mẫu đốt thân, sự bật chồi được quan sát thấy sau khoảng 4 - 5 ngày nuôi cấy; trong khi đó ở mẫu lá diễn ra sau khoảng 7 - 10 ngày nuôi cấy. Ngoài ra, khả năng nhân nhanh chồi cũng tiếp tục được theo dõi ở lần cấy chuyển tiếp theo, kết quả cho thấy, số lượng chồi gia tăng đáng kể. Tại nồng độ 0,75 mg/L BA, số chồi/mẫu thu được là 35,4 chồi (đối với mẫu lá) (Hình 3C₁) và 34,8 chồi (đối với mẫu đốt thân) (Hình 3C₂) tại thời điểm sau 6 tuần nuôi cấy.

So sánh với kết quả của các nghiên cứu khác trong nước về nhân giống cây đẳng sâm trong những năm gần đây cho thấy, khả năng nhân nhanh chồi từ mẫu đốt thân sau 6 tuần đạt cao nhất là 19,28 chồi/mẫu, trên môi trường SH bổ sung 3% sucrose, 0,8% agar, 10% nước dừa, 1,0 mg/L TDZ, 0,5 mg/L NAA đã được báo cáo trong nghiên cứu của nhóm tác giả Phạm Hương Sơn và Nguyễn Thị Lại [6]. Kết quả đạt được ở nghiên cứu này cho thấy số chồi/mẫu đạt được là 8,67 chồi/mẫu, tuy thấp hơn 19,28 chồi/mẫu, nhưng thời gian theo dõi ở nghiên cứu này ngắn hơn (3 tuần) so với nghiên cứu của nhóm tác giả (6 tuần). Đồng thời môi trường nuôi cấy ở nghiên cứu này cũng đơn giản hơn (chỉ sử dụng CĐHSTTV 0,75 mg/L BA) so với nghiên cứu của nhóm tác giả đã báo cáo; việc này thuận lợi hơn để áp dụng trong sản xuất cây giống. Trong một nghiên cứu khác [9], khúc cắt đoạn thân (1,0 - 1,5 cm) đẳng sâm có nguồn gốc từ hạt đã khử trùng và nuôi cấy *in vitro* được dùng để tạo mô sẹo. Mô sẹo được tách ra và cảm ứng tạo chồi trên môi trường MS chứa 1 mg/L BA và 0,2 mg/L NAA; 82,67% mẫu cảm ứng tạo chồi, và số chồi đạt cao nhất với 9,92 chồi/mẫu. Chồi được tách ra và chuyển sang môi trường MS chứa 2 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA để nhân nhanh chồi, kết quả ghi nhận được hệ số nhân chồi đạt 5,87 lần sau 60 ngày nuôi cấy [9]. Kết quả này cho thấy rằng, hệ số nhân chồi đạt được ở nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với phương pháp tạo chồi gián tiếp thông qua mô sẹo của nhóm tác giả đã công bố. Nghiên cứu của Phan Văn Thuận cho thấy, cảm ứng tạo cụm chồi trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BA, 0,2 mg/L NAA, 100 ml/L nước dừa, 30 g/L sucrose và 7 g/L agar cho hệ số nhân chồi là 60,15 chồi/mẫu sau 7 tuần. Hệ số nhân nhanh của nhóm tác giả thực hiện trên đối tượng là loài *C. lanceolata*, đây là loài đẳng sâm có xuất xứ ở miền đông bắc Trung Quốc, Hàn Quốc, Triều Tiên; trong khi nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên loài *C. javanica*, một loài đẳng sâm ở Việt Nam [8]. Các nghiên cứu về nhân giống cây đẳng sâm đã công bố ngoài nước cũng chủ yếu tập trung ở loài *C. pilosula*, một cây thuốc được sử dụng theo truyền thống nhiều ở Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản [11, 12]. Những nghiên cứu trong và ngoài nước này đều sử dụng nguồn mẫu để nhân nhanh chồi là mẫu đốt thân, chưa ghi nhận thấy công bố nào báo cáo về việc sử dụng mẫu lá để nhân nhanh chồi.

Trong vi nhân giống, CĐHSTTV là yếu tố có vai trò then chốt, trong đó BA thường được bổ sung vào môi trường để cảm ứng tạo chồi và nhân nhanh chồi bởi nó được chuyển hóa dễ dàng hơn so với các CĐHSTTV tổng hợp khác trong các mô thực vật, và có khả năng tạo ra các hormone tự nhiên như zeatin trong mô thực vật [15]. Ngoài chịu tác động của CĐHSTTV, loại mẫu nuôi cấy cũng có ảnh hưởng đến hệ số nhân giống. Theo Faisal và cộng sự, nếu sử dụng vật liệu là đốt thân và được đặt nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng có chứa CĐHSTTV thích hợp thì số lượng chồi có thể gia tăng đáng kể [16]. Các chồi phát sinh từ các đoạn thân cũng đã được báo cáo là nhiều hơn so với từ các chồi đỉnh [17] bởi tính ưu thế ngọn của các chồi đỉnh làm ức chế sự phát triển của chồi bên [18], và sử dụng mẫu đốt thân có thể loại bỏ được tính ưu thế ngọn. Ngoài ra, việc sử dụng đốt thân thay vì chồi đỉnh để nhân nhanh chồi cũng có ưu điểm là nguồn vật liệu mẫu ban đầu nhiều hơn, bởi vì từ một cây ban đầu có thể cắt thành nhiều đoạn đốt thân, trong khi đó, nếu sử dụng chồi đỉnh thì chỉ thu được một mẫu duy nhất. Chính vì vậy, ở thí nghiệm này, các đoạn đốt thân cây đẳng sâm được chọn làm vật liệu để nhân nhanh chồi thay vì sử dụng chồi đỉnh. Tương tự như vậy, lá cũng là vật liệu dồi dào hơn chồi đỉnh. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy mẫu đốt thân, các lá được cắt tách ra khỏi các nách lá, nên việc sử dụng đồng thời cả mẫu lá và đốt thân để nhân nhanh chồi sẽ nâng cao được hiệu quả của quy trình vi nhân giống cây đẳng sâm.

3.3. Ảnh hưởng của auxin đến khả năng ra rễ và sự thích nghi của cây con ở vườn ươm

Trong thí nghiệm này, kết quả thu được cho thấy, ở môi trường đối chứng, sự hình thành rễ thấp hơn rõ rệt so với môi trường bổ sung auxin. IBA thích hợp cho sự ra rễ của cây đẳng sâm hơn so với NAA. Tất cả các chỉ tiêu theo dõi ở môi trường sử dụng IBA đều cao hơn so với môi trường sử dụng NAA (Bảng 4). Ngoài ra, quan sát hình thái cho thấy, có sự hình thành mô sẹo phần gốc của các chồi được nuôi cấy trên môi trường bổ sung NAA; trong khi đó, các chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung IBA không nhận thấy có thấy hiện tượng này (Hình 2). Chồi và lá non là cơ quan tổng hợp auxin chủ yếu ở thực vật. Ở thí nghiệm này, đoạn chồi ngọn đẳng sâm nuôi cấy có mang 2 cặp lá, vì vậy các chồi này có khả năng tự tổng hợp auxin nội sinh. Trong nuôi cấy *in vitro*, môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm auxin ngoại sinh giúp cảm ứng sự hình thành rễ, nhưng nếu sử dụng ở nồng độ cao lại cảm ứng

sự hình thành mô sẹo. NAA và IBA đều là auxin tổng hợp, nhưng hoạt tính của NAA mạnh hơn IBA; thêm vào đó, bản thân chồi vẫn tự tổng hợp auxin nội sinh. Chính vì vậy sự kết hợp bổ sung NAA và hàm lượng auxin nội sinh đã dẫn tới gia tăng quá mức hàm lượng auxin cần thiết cho sự tạo rễ của chồi đang sẫm, từ đó hình thành mô sẹo ở phần gốc của chồi khi sử dụng NAA trong thí nghiệm ngày. Tác động ra rễ của IBA cao hơn so với NAA ở cây đang sẫm cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Phạm Hương Sơn và Nguyễn Thị Lài [6]. Sự hình thành mô sẹo đã ức chế quá trình tạo rễ của chồi, và cũng làm giảm tỷ lệ sống của cây con trồng ở vườn ươm, nên tỷ lệ sống của cây con thu được ở môi trường bổ sung NAA thấp hơn đáng kể so với môi trường sử dụng IBA (Bảng 4). Kết quả tương tự cũng đã được Shekhawat và cộng sự báo cáo, đó là các cây con có nhiều mô sẹo và rễ nhỏ thích nghi không tốt trong quá trình trồng ở nhà kính [19].

Các kết quả đạt được cũng chứng tỏ rằng sự tác động của auxin trong giai đoạn ra rễ không chỉ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây con khi nuôi cấy ở điều kiện *in vitro* mà còn ảnh hưởng đến giai đoạn sinh trưởng ở vườn ươm. Trên môi trường nuôi cấy có bổ sung 0,75 mg/L IBA, các cây con ở giai đoạn nuôi cấy *in vitro* có số rễ, chiều cao và khối lượng tươi cây đạt giá trị cao nhất, nên khi được chuyển ra vườn ươm, khả năng thích nghi của cây ở nghiệm thức này cũng đạt cao nhất, với tỷ lệ sống của cây sau 4 tuần trồng ở vườn ươm đạt 92% (Bảng 4). Như vậy, nồng độ auxin thích hợp cho sự ra rễ của cây đang sẫm là 0,75 mg/L IBA.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng ra rễ của cây đang sẫm sau 4 tuần nuôi cấy

Nồng độ auxin (mg/L)		Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng tươi cây (mg)	Tỷ lệ cây sống (%)*
IBA	NAA					
0	0	4 ^c	0,42 ^c	4,29 ^c	102,5 ^c	0 ^d
0,25	0	82 ^b	3,42 ^b	4,36 ^c	115,8 ^{de}	58 ^c
0,50	0	100 ^a	6,92 ^a	5,75 ^{ab}	193,3 ^a	80 ^b
0,75	0	100 ^a	7,08 ^a	5,89 ^a	198,3 ^a	92 ^a
1,00	0	100 ^a	7,00 ^a	5,56 ^b	185,8 ^{ab}	90 ^a
0	0,25	8 ^c	0,50 ^c	4,28 ^c	110,0 ^{de}	0 ^d
0	0,50	8 ^c	0,50 ^c	4,30 ^c	122,5 ^d	4 ^d
0	0,75	12 ^c	0,58 ^c	4,46 ^c	143,3 ^c	6 ^d
0	1,00	12 ^c	0,58 ^c	4,41 ^c	173,3 ^b	6 ^d

(*)Số liệu được chuyển đổi sang arcsine $\sqrt{x + 0,5}$ trước khi phân tích thống kê. Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ý nghĩa thống kê của giá trị trung bình với độ tin cậy 95% theo phép thử Duncan.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến sự hình thành rễ *in vitro* của chồi cây đang sẫm sau 4 tuần nuôi cấy. 0-1,00: tương ứng với nồng độ 0-1,0 mg/L của NAA và IBA bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

So sánh với kết quả của các nghiên cứu khác, Phạm Hương Sơn và Nguyễn Thị Lài báo cáo rằng môi trường bổ sung 0,5 mg/L IBA được chứng minh là có hiệu quả nhất cho sự tạo rễ (11,17 rễ/chồi) của cây đang sẫm *C. javanica*, nhưng không công bố về tỷ lệ cây sống ở vườn ươm [6]. Cũng ở loài *C.*

javanica, nhóm tác giả Nguyễn Thị Tường Vi và cộng sự báo cáo rằng, trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/L IBA, tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 88,67% với 4,33 rễ/cây. Trên giá thể hữu cơ phối trộn 30% xơ dừa và 70% phân trùn quế cho tỷ lệ cây sống đạt 88,67% [9]. Trong một nghiên cứu về ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến sự phát triển của cây đu đủ sẫm *C. javanica* nuôi cấy mô giai đoạn vườn ươm, kết quả cũng chỉ ra rằng tỷ lệ sống của cây con chịu ảnh hưởng của thời gian huấn luyện, phương pháp xử lý giá thể trước khi trồng, tỷ lệ phối trộn giá thể, độ ẩm môi trường, kết quả thu được tỷ lệ cây con sống trên 90,3% [10]. Ở loài *C. lanceolata*, Phan Văn Thuận báo cáo rằng, cây con hoàn chỉnh được huấn luyện và chuyển ra trồng trên giá thể cát 100% cho tỷ lệ sống là 79,23% [8]. Nghiên cứu ở loài *C. pilosula* cũng chỉ ra rằng, môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L IBA, tạo ra số rễ cao nhất 9 rễ/chồi và chiều dài rễ tối đa 2,09 cm, tỷ lệ sống của cây con là 94% sau khi chuyển ra vườn ươm [11]. Các kết quả này cho thấy, môi trường nuôi cấy giai đoạn tạo rễ cây đu đủ sẫm đều sử dụng IBA với nồng độ dao động từ 0,5 - 1,0 mg/L, tương tự với kết quả ghi nhận trong nghiên cứu này, ngoài ra tỷ lệ cây con sống khi chuyển ra vườn ươm của các nghiên cứu đều thấp hơn hoặc bằng so với nghiên cứu của chúng tôi. Chỉ ghi nhận nghiên cứu của nhóm tác giả Bùi Văn Thắng và cộng sự thu được tỷ lệ cây con sống ở vườn ươm cao hơn (đạt 98,89%), khi được huấn luyện và trồng trên giá thể 100% cát vàng, đồng thời nhóm tác giả xây dựng quy trình vi nhân giống cây đu đủ sẫm từ vật liệu ban đầu là hạt, khác với nghiên cứu của chúng tôi sử dụng mẫu đốt thân [7].



Hình 3. Hình ảnh về quy trình vi nhân giống cây đu đủ sẫm. A: khử trùng và cảm ứng tạo chồi từ mẫu đốt thân của cây đu đủ sẫm *ex vitro* sau 2 tuần nuôi cấy. B1-2: Nhân nhanh chồi ở môi trường bổ sung 0,75 mg/L BA từ mẫu lá (B1) và mẫu đốt thân (B2) sau 3 tuần nuôi cấy. C1-2: Nhân nhanh chồi ở môi trường sử dụng 0,75 mg/L BA sau 6 tuần từ mẫu lá (C1) và mẫu đốt thân (C2) ở chu kỳ cấy chuyển thứ hai. D: Cây con ra rễ (ở môi trường bổ sung 0,75 mg/L IBA) được đưa ra trồng. E1-2: Cây con trồng ở vườn ươm sau 4 tuần (E1) và 8 tuần (E2).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình vi nhân giống cây đu đủ sẫm hiệu quả từ nguồn vật liệu ban đầu là mẫu đốt thân, với hệ số nhân giống cao và thời gian ngắn hơn so với phương pháp nhân giống truyền thống. Thời gian khử trùng mẫu đốt thân trong dung dịch NaOCl 10% thích hợp là 10 phút. Sau đó, mẫu đốt thân được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L BA để cảm ứng tạo chồi trong khoảng 4 - 6 tuần. Giai đoạn nhân nhanh có thể sử dụng cả mẫu lá và mẫu đốt thân *in vitro* làm vật liệu. Trên môi trường MS có bổ sung 0,75 mg/L BA, hệ số nhân nhanh đạt được từ đốt thân và mẫu lá tương ứng là 8,67 và 9,83 lần sau 3 tuần ở chu kỳ nhân nhanh đầu tiên. Ở chu kỳ nhân nhanh tiếp theo, hệ số nhân giống đạt 35,4 lần (ở mẫu lá) và 34,8 lần (ở mẫu đốt thân) sau 6 tuần nuôi cấy. Với giai đoạn tạo rễ, sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,75 mg/L IBA, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100% và tỷ lệ cây con sống ở vườn ươm đạt 92%.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 127/HĐ-DCT ngày 15 tháng 7 năm 2024.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ - Sách Đỏ Việt Nam, Phần II - Thực vật. NXB Khoa học tự nhiên & Công nghệ Hà Nội (2007).
2. Võ Văn Chi - Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học Hà Nội (2011).
3. Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương - Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm. NXB Khoa học và Kỹ thuật (2007).
4. Phan Thị Bích Thao, Nguyễn Việt Thắng, Nguyễn Minh Trí - Một số đặc điểm sinh học và thành phần hóa học của cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica*) phân bố tại huyện Tư Mợ Rông, tỉnh Kon Tum. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học, ĐH Huế **20** (2) (2022) 113-124.
5. Nguyễn Thị Bích Ngọc - Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. & Thoms) phân bố tự nhiên tại Sơn La. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp **6** (2021) 5-19.
6. Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Lài - Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của cây đẳng sâm trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam **2** (9) (2015) 55-59.
7. Bùi Văn Thắng, Cao Thị Việt Nga, Vũ Văn Kiên, Nguyễn Văn Việt - Nhân giống cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thomson) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp **4** (2016) 3-9.
8. Phan Văn Thuận - Vi nhân giống cây đẳng sâm. Tạp chí Khoa học Đại học Thủ Dầu Một **3** (14) (2019) 75-80.
9. Nguyễn Thị Tường Vi, Hồ Lê Diễm Trinh, Phan Thị Á Kim - Nhân giống *in vitro* cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thomson) từ mô sẹo. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ **2** (4) (2018) 56-61.
10. Nguyễn Trịnh Hoàng Anh, Nguyễn Phương, Phạm Tuấn Đạt, Đỗ Trọng Tấn - Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến sự phát triển của cây đẳng sâm nuôi cấy mô giai đoạn vườn ươm. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam **4** (77) (2017) 73-76.
11. Gang R., Komakech R., Chung Y., Okello D., Kim W.J., Moon B.C., Yim N.H., and Kang Y. - *In vitro* propagation of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. using apical shoot segments and phytochemical assessments of the maternal and regenerated plants. BMC Plant Biology **23** (2023) 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03950-w>
12. Słupski W., Tubek B., and Matkowski A. - Micropropagation of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. by axillary shoot multiplication. Acta Biologica Cracoviensia **53** (2) (2011) 87-93. <https://doi.org/10.2478/v10182-011-0031-2>
13. Murashige T., Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum **15** (2006) 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
14. Lê Thu Thủy, Bùi Trang Việt, Trần Thanh Hương - Khảo sát ảnh hưởng của một vài chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong nuôi cấy *in vitro* cây viễn chí lá nhỏ (*Polygala paniculata* L.). Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành **2** (2018) 71-73.
15. Zaerr J.B., Mapes M.O. - Action of growth regulators. In: Tissue culture in forestry, Bonga J.M., Durzan D.J. (Eds). The Hague-Boston-London: Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers (1982) 231-255.
16. Faisal M., Ahmad N., and Anis M. - An efficient micropropagation system for *Tylophora indica*: An endangered, medicinally important plant. Plant Biotechnology Reports **1** (2007) 155-161. <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0025-4>
17. Deng Z. C., Jin H., and He H. - An efficient micropropagation system for *Morinda officinalis* How. (Rubiaceae), an endangered medicinal plant. Journal of Agricultural Science and Technology **17** (6) (2015) 1609-1618.

18. Laufs P., Grandjean O., Jonak C., Kieu K., and Traas J. - Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10** (8) (1998) 1375-1389. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.8.1375>
19. Shekhawat M.S., Manokari M., and Kannan N. - Micromorphological response towards altered environmental conditions in subsequent stages of *in vitro* propagation of *Morinda coreia*. *Environmental & Experimental Biology* **15** (1) (2017) 37-46. <https://doi.org/10.22364/eeb.15.06>

ABSTRACT

STUDY ON MICROPROPAGATION PROTOCOL OF *Codonopsis javanica*

Trinh Thi Huong^{1*}, Nguyen Dinh Trieu Vu^{1,2}, Hoang Thi Thuy Duong¹

¹*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

²*CIPTEK Technology & IP Commercialization*

*Email: huongtt@huit.edu.vn

In this study, a micropropagation protocol was developed for *Codonopsis javanica*, a herbaceous perennial with high medicinal value. Nodal explants were surface-sterilized with a 10% sodium hypochlorite (NaOCl) solution for various durations and then cultured on a medium for shoot induction. The results showed that nodal explants surface-sterilized with a 10% NaOCl solution for 10 minutes yielded a high percentage of clean and viable samples (83.3%). For the shoot multiplication stage, propagation efficiency was improved by using both nodal and leaf explants derived from *in vitro* shoots. The optimal medium for shoot multiplication from these explants was Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with 0.75 mg/L 6-benzyladenine (BA), 30 g/L sucrose, and 8 g/L agar. After three weeks of culture on this medium, the number of shoots was 8.67 shoots/explant (for nodal segments) and 9.83 shoots/explant (for leaf explants). This study also indicated that indole-3-butyric acid (IBA) was more suitable than 1-naphthaleneacetic acid (NAA) for root formation in *C. javanica* shoots. On MS medium supplemented with 0.75 mg/L IBA, the rooting rate, number of roots, plant height, and fresh weight were 100%, 7.08 roots/plant, 5.89 cm, and 198.3 mg, respectively. After 4 weeks of transfer to the nursery, the survival rate of plantlets was the highest (92%) on this medium. This study has developed an effective micropropagation protocol for *C. javanica* that can be widely applied to produce plantlets in large quantities to meet commercial demand and contribute to the conservation and development of valuable medicinal plant resources.

Keywords: BA, *Codonopsis javanica*, IBA, micropropagation, NAA.