

VI NHÂN GIỐNG CÂY ĐĂNG SÂM

Phan Văn Thuận⁽¹⁾

(1)Trường Đại học Thủ Dầu Một.

Ngày nhận bài 25/03/2019; Ngày gửi phản biện 28/03/2019; Chấp nhận đăng 30/05/2019

Email: thuanpv@tdmu.edu.vn

Tóm tắt

Cây đăng sâm (*Codonopsis lanceolata*) là một loài thực vật có hoa ở Đông Á (Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và vùng Viễn Đông của Nga). Quy trình nhân giống cây đăng sâm bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được nghiên cứu thành công. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hạt được rửa bằng cồn 70% trong 1 phút và khử trùng bằng sodium hypochlorite (NaOCl) 10% trong 15 phút cho tỉ lệ mẫu sạch này mầm 100%. Cầm ứng tạo cụm chồi trên môi trường MS bổ sung 1.0 mg/L BAP, 0.2 mg/L NAA, 100 ml/L nước dừa, 30g/L sucrose và 7g/L agar cho hệ số nhân chồi là 60.15 chồi/mẫu (7 tuần). Chồi ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình 11.31 rễ/cây, chiều dài rễ trung bình 2.4 cm khi nuôi cấy trên môi trường WPM bổ sung 0.25 mg/L IBA, 0.25 mg/L NAA, 0.1 mg/L BAP, 100ml/L nước dừa, 2.0 g/L than hoạt tính, 20g/L sucrose và 7 g/L agar (5 tuần nuôi cấy). Cây con hoàn chỉnh được huấn luyện và chuyển ra trồng trên giá thể cát 100% cho tỉ lệ sống 79.23%. Cây sinh trưởng và phát triển tốt sau 4 tuần trồng. Những kết quả đó có thể được ứng dụng để thiết lập quy trình nhân nhanh cây giống đăng sâm từ hạt.

Từ khóa: cây đăng sâm, cụm chồi, nhân giống, nuôi cấy mô.

Abstract

MICROPROPAGATION OF CODONOPSIS LANCEOLATA

Codonopsis lanceolata is a flowering plant native to East Asia (China, Japan, Korea, and the Russian Far East). Procedure for micropropagation of *Codonopsis lanceolata* has developed. The seeds were soaked in 70% (v/v) ethanol solution for 1 minutes and then in sodium hypochlorite (NaOCl) 10 % for 15 minutes (the regeneration percentage archived 100%). MS medium supplemented with 1.0 mg/L BAP, 0.2 mg/L 1- Naphthaleneacetic acid (NAA), 100 ml/L coconut, 30 g/L sucrose and 7 g/L agar was the most effective medium for multi – shoot regeneration (60.15 shoots/explant) after 7 weeks. 100% shoots have rooted on WPM medium contained 0.25 mg/L IBA, 0.25 mg/L NAA, 0.1 mg/L BAP, 100ml/L coconut, 2.0 mg/L active carbon, 20 g/L sucrose and 7 g/L agar, with the remarkable figures being 11.31 roots/shoot and 2.4 cm/root after 5 weeks. The survival rate archived 79.23 % after 4 weeks of ex vitro acclimating and transplanting to pots of 100% sand. These results can be used to establish a simple and commercially viable protocol for mass propagation of *C. lanceolata* for plantations or breeding.

1. Đặt vấn đề

Đăng sâm là một loài thảo dược quý, được chứng minh là thuốc bổ nhẹ tăng cường năng lượng và giúp cơ thể thích ứng với căng thẳng, có tác dụng giống như cây nhân sâm nhưng nó tác dụng nhẹ hơn và thời gian ngắn hơn. Nó được dùng cho những người mà nhân sâm là thuốc bổ quá mạnh so với

họ, dùng để thay thế cho cây nhân sâm trong chế biến dược thảo. Đảng sâm có xuất xứ ở miền đông bắc Trung Quốc, Hàn Quốc, Triều Tiên nổi tiếng bởi 2 giống: *Codonopsis lanceolata* và *Codonopsis pilosula*. Ở Việt Nam nổi tiếng có giống đảng sâm *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thomson. Đảng sâm được trồng bằng hạt giống vào mùa thu hoặc vào mùa xuân khi các phần trên ngọn tàn lụi hoặc cây được trồng bằng nảy chồi từ củ. Nhưng việc hình thành cây mới từ hạt hoặc củ chỉ phù hợp với từng mùa và miền đất khác nhau. Lĩnh vực nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô và tế bào thực vật đã được áp dụng phổ biến để nhân nhanh và phục tráng giống cây trồng. Đối với giống đảng sâm *Codonopsis lanceolata*, Wojciech Slupski và cs (2012) đã công bố quy trình nhân giống. Đối với giống *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thomson, tiêu biểu là công bố nhân giống của Bùi Văn Thắng và cs (2016). Hiện tại chưa có công bố chi tiết nào về quy trình nhân giống vô tính in vitro giống *Codonopsis lanceolata*. Bài báo này công bố kết quả nghiên cứu thành công việc nhân giống vô tính in vitro cây đảng sâm *Codonopsis lanceolata*.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Hạt đảng sâm có nguồn gốc từ Hàn Quốc, được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Trường Đại học Thủ Dầu Một, được khử trùng và nuôi cấy trên môi trường thích hợp nhằm tạo cây con in vitro dùng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng hạt: Hạt cây đảng sâm sau khi rửa sạch được khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 60 giây, tiếp tục được khử trùng bằng sodium hypochlorite (NaOCl) 10% trong thời gian 15 phút. Cuối cùng, rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 - 6 lần. Hạt được cấy lên môi trường $\frac{1}{2}$ MS không bổ sung đường và vitamine, sau 3 tuần nuôi cấy thu nhân kết quả, cây con in vitro được dùng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo. Các chỉ tiêu đánh giá: tỉ lệ hạt vô trùng, tỉ lệ hạt nảy mầm...

Nhân nhanh chồi: Cây con in vitro cao khoảng từ 3 – 4 đốt thân được cắt nhỏ với kích thước 1 cm (chồi nách) dùng làm mẫu cấy; cấy lên môi trường MS bổ sung BAP nồng độ 0.5 – 2.0 mg/L, kết hợp 0.2 mg/L NAA, 100 ml/L nước dừa, 30g/L sucrose và 7g/L agar nhằm nghiên cứu khả năng nhân chồi của mẫu. Sau 7 tuần thu nhận kết quả. Chỉ tiêu đánh giá: số chồi trung bình, chiều cao của chồi, sinh trưởng và phát triển của chồi.

Tạo cây hoàn chỉnh: Chồi đỉnh in vitro có kích thước 1cm đầy đủ lá và ngọn, khoảng từ 3 – 4 lá, khỏe mạnh được cấy lên môi trường WPM + 10%V nước dừa + IBA (0.10 – 0.35ml/L) + NAA (0.10 – 0.35ml/L) + 0.1ml/L BAP + 2.0 g/L than hoạt tính. Kết quả cảm ứng tạo rễ được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy. Chỉ tiêu đánh giá: số rễ trung bình, chiều dài rễ, sinh trưởng và phát triển của cây con.

Đưa cây con ra trồng ngoài tự nhiên: Cây con đảng sâm ở trong ống nghiệm khỏe mạnh, xanh tốt và đồng đều được mở nắp và thích nghi trong phòng thí nghiệm 3 ngày, ngày thứ tư tiến hành gắp cây ra khỏi bình; rửa sạch môi trường còn dính lại trên bộ rễ, bảo quản cây con trong giấy báo ẩm và tiến hành trồng trên các giá thể khác nhau. Giá thể được sử dụng bao gồm: Giá thể 1: (100% cát vàng, Giá thể 2: (1 cát vàng : 1 tro), Giá thể 3: (1 cát vàng : 1 tro : 1 đất tầng B). Cây con được trồng trong nhà lưới với độ che phủ lưới đen là 50%. Cường độ chiếu sáng dao động 1500 – 4500 lux, Cây được tưới bằng phun sương tần suất 3 lần/ngày. Thời gian tưới 15 phút/lần. Sau 4 tuần nuôi trồng thu nhận kết quả. Chỉ tiêu đánh giá: tỉ lệ cây sống, chiều cao trung bình, số rễ trung bình, sinh trưởng và phát triển của cây.

Điều kiện phòng nuôi cấy: nhiệt độ phòng $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

Môi trường nuôi cấy: môi trường dinh dưỡng cơ bản MS (Murashige T. và Skoog F., 1962) và WPM (Woody Plant Medium). Các thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 500 ml, mỗi công thức lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phương pháp Duncan, test với mức sai số có ý nghĩa $p = 0.05$.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Khử trùng mẫu hạt cây đấng sâm.

Hạt cây đấng sâm sau khi rửa sạch được khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 60 giây, tiếp tục được khử trùng bằng sodium hypochlorite (NaOCl) 10% trong thời gian 15 phút. Cuối cùng, rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 - 6 lần. Hạt được cấy lên môi trường $\frac{1}{2}$ MS không bổ sung đường và vitamine, sau 3 tuần nuôi cấy thu được cây con *in vitro* kích thước 3 - 4 cm dùng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo. Tỷ lệ vô trùng đạt 100%, tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 90%.



Hình 1. Cây con *in vitro* nảy mầm từ hạt

3.2. Nhân nhanh chồi cây đấng sâm.

Cây con *in vitro* cao khoảng từ 3 - 4 đốt thân được cắt nhỏ với kích thước 1 cm (chồi nách) dùng làm mẫu cấy; cấy lên môi trường MS bổ sung BAP nồng độ 0.5 - 2.0 mg/L, kết hợp 0.2 mg/L NAA, 100 ml/L nước dừa, 30g/L sucrose và 7g/L agar nhằm nghiên cứu khả năng nhân chồi của mẫu. Sau 7 tuần thu được kết quả ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất ĐHST lên khả năng nhân chồi của cây đấng sâm

Môi trường	Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng		Hệ số nhân chồi (chồi/mẫu)	Chồi hữu hiệu (%)
	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)		
ĐC	-	-	2.33 ^e	77.27
MS1	0.5	0.2	49.32 ^b	90.88
MS2	1.0	0.2	60.15^a	87.12
MS3	1.5	0.2	45.31 ^c	89.33
MS4	2.0	0.2	40.37 ^d	75.06

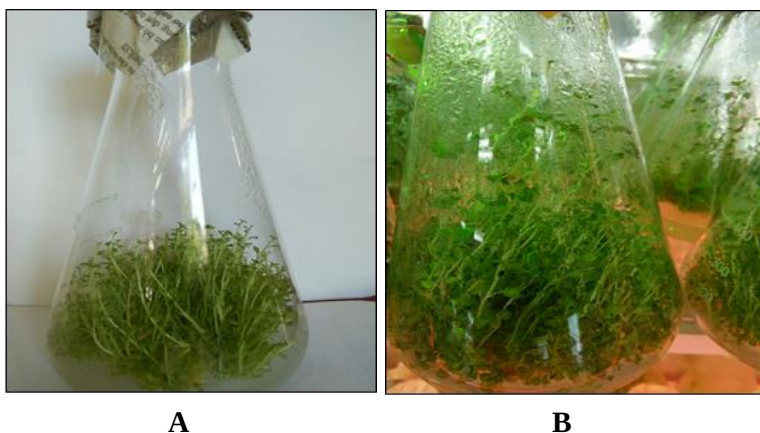
Ghi chú: chồi hữu hiệu chiều cao $\geq 2\text{cm}$ đủ tiêu chuẩn làm nguyên liệu cho thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy chất điều hòa sinh trưởng BAP và NAA tác động lớn lên khả năng nhân chồi của mẫu, nhìn chung khi tăng nồng độ chất BAP kết hợp với 0.2 mg/L NAA cho hệ số nhân chồi tăng. Chồi đạt hệ số nhân chồi cao nhất ở môi trường MS bổ sung 1.0 mg/L BAP kết hợp 0.2 mg/L NAA với số chồi trung bình đạt 60.15 chồi/mẫu. Tỷ lệ chồi đạt kích thước trên 2cm là 87.12%. Ở môi trường đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng cho hệ số

nhân chồi thấp. Kết quả nghiên cứu thu được khá tương đồng với kết quả của Wojciech Slupski và cs (2012) trên đối tượng *Codonopsis pilosula* khi nghiên cứu tạo cụm chồi trên môi trường MS + 1.0 µl BA + 4.0 µl NAA. Sau 6 tuần nuôi cấy số lượng chồi lớn nhất maximum = 69 chồi/mẫu, số chồi trung bình là 38.16 chồi/mẫu. Hệ số nhân chồi chúng tôi nghiên cứu lớn hơn vì thời gian thu số liệu là 7 tuần so với 5 tuần. Theo kết quả nghiên cứu của Bùi Văn Thắng và cs. (2016) về việc nhân nhanh chồi cây đấng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thomson). Môi trường tốt nhất để nhân nhanh là môi trường MS bổ sung 0.5 mg/L kinetin, 0.2 m/L NAA cho hệ số nhân chồi đạt 16.55 chồi/mẫu sau 3 tuần nuôi cấy. Kết quả này khá tương đồng với kết quả chúng tôi thu được trong 3 tuần đầu. Nhưng càng về sau hệ số nhân chồi càng tăng cao.

Hình 2. Tạo chồi cây đấng sâm trên môi trường MS2

- A. Cụm chồi sau 5 tuần nuôi cấy
B. Cụm chồi sau 7 tuần nuôi cấy



3.3. Cắm ứng tạo rễ cây đấng sâm.

Chồi đỉnh *in vitro* có kích thước 1cm đầy đủ lá và ngọn, khoảng từ 3 – 4 lá, khỏe mạnh được cấy lên môi trường WPM + 10%V nước dừa + IBA (0.10 – 0.35ml/L) + NAA (0.10 – 0.35ml/L) + 0.1ml/L BAP + 2.0 g/L than hoạt tính. Kết quả cắm ứng tạo rễ thu được sau 4 tuần nuôi cấy thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất ĐHST lên khả năng tạo rễ của cây đấng sâm

Môi trường	Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng			Số rễ TB (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)
	BAP	NAA	IBA		
ĐC	-	-	-	0.00 ^e	0.00
WPM1	0.10	0.10	0.10	2.39 ^d	1.33
WPM2	0.10	0.15	0.15	4.52 ^c	2.54
WPM3	0.10	0.25	0.25	11.31^a	2.40
WPM4	0.10	0.35	0.35	8.91 ^b	1.89

Môi trường đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, mẫu cây không cắm ứng tạo rễ. Khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, khả năng tạo rễ của mẫu cây được cải thiện đáng kể. Nhìn chung khi tăng nồng độ NAA và IBA, số lượng rễ trung bình tăng theo. Môi trường thích hợp nhất để hình thành rễ cho cây là môi trường WPM bổ sung 0.10 mg/L BAP kết hợp 0.25 mg/L NAA và 0.25mg/L IBA hệ số nhân chồi đạt 11.31 rễ/cây, chiều cao trung bình của cây là 2,4 cm.

So sánh với kết quả nghiên cứu tạo rễ của Wojciech Slupski và cs. (2012) trên đối tượng *Codonopsis pilosula* số rễ trung bình cao nhất đạt 7.3 rễ/cây. So sánh kết quả nghiên cứu tạo rễ của

Bùi Văn Thắng và cs. (2016) trên đối tượng đảng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thomson). Số rễ trung bình đạt 18.61 rễ/cây. Sự khác biệt này là do tiến hành trên các đối tượng khác nhau, nồng độ chất điều hòa sinh trưởng khác nhau và trên môi trường khoáng khác nhau.

Hình 3. Tạo rễ cây đảng sâm trên môi trường WPM3



3.4. Chuyển cây con ra trồng ngoài tự nhiên.

Sau 4 tuần nuôi trồng thu được số liệu ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của giá thể lên khả năng sống của cây đảng sâm ngoài tự nhiên

Giá thể	Chỉ tiêu đánh giá			Số lượng cây	Sinh trưởng của cây
	Tỉ lệ sống	Số rễ TB (rễ/cây)	Chiều cao TB (cm)		
Giá thể 1	79.23	15.44	13.19	250	++
Giá thể 2	72.00	12.76	7.02	250	++
Giá thể 3	4.00	11.89	4.61	250	+

Ghi chú: +: cây con chất lượng tốt, ++: cây con chất lượng rất tốt.

Nhìn chung tỉ lệ sống của cây con biến đổi lớn trên các giá thể trồng khác nhau từ 4% – 79%. Giá thể tốt nhất khi đưa cây ra trồng ngoài tự nhiên là 100% cát vàng với tỉ lệ sống là 79.23%, số rễ trung bình tăng và đạt 15.44 rễ/cây, chiều cao trung bình của cây đạt 13.19 cm. Cây con sinh trưởng và phát triển tốt đủ điều kiện để trồng sản xuất.

So sánh với kết quả đưa cây ra trồng ngoài tự nhiên của Bùi Văn Thắng và cs. (2016) trên đối tượng đảng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thomson) cho thấy rằng giá thể 100% cát vàng là thích hợp nhất khi chuyển cây con ra trồng. Rõ ràng cát vàng tuy ít có giá trị dinh dưỡng cho cây nhưng có khả năng thoát nước tốt và thông thoáng giúp cho cây con tránh bị úng bộ rễ trong giai đoạn đầu. Giai đoạn trồng sản xuất được chuyển qua giá thể phù hợp với nhu cầu dinh dưỡng của cây con.



Hình 4. Cây con trồng trên giá thể 1

4. Kết luận

- Hạt cây đẳng sâm khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 60 giây, khử trùng bằng sodium hypochlorite (NaOCl) 10% trong thời gian 15 phút. Cấy lên môi trường ½ MS không bổ sung đường và vitamin cho tỉ lệ vô trùng đạt 100%, tỉ lệ hạt nảy mầm đạt 100%.

- Hệ số nhân chồi cao nhất ở môi trường MS bổ sung 1.0 mg/L BAP kết hợp 0.2 mg/L NAA với số chồi trung bình đạt 60.15 chồi/mẫu. Tỉ lệ chồi đạt kích thước trên 2cm là 87.12%.

- Môi trường thích hợp để hình thành rễ cho cây là môi trường WPM bổ sung 0.10 mg/L BAP kết hợp 0.25 mg/L NAA và 0.25mg/L IBA hệ số nhân chồi đạt 11.31 rễ/cây.

- Chuyển cây ra trồng ngoài tự nhiên sử dụng giá thể 100% cát vàng cho tỉ lệ sống là 79.23%, số rễ trung đạt 15.44 rễ/cây, chiều cao trung bình của cây đạt 13.19 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bùi Văn Thắng và cs. (2016). 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*. Số 4. 1– 9.
- [2] M. Ichikawa, S. Ohta, N. Komoto et al. (2009). Simultaneous determination of seven saponins in the roots of *Codonopsis lanceolata* by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Natural Medicines*, 63 (1), 52–57.
- [3] R. Qisheng, Y. Xiongying, S. Xinrong, and C. Huangshi (2005). Chemical constituents from *Codonopsis lanceolata*. *Zhongcaoyao*, 36, 1773–1775.
- [4] T. Lee, J. Choi, W. T. Jung, J. H. Nam, H. J. Jung, and H. J. Park (2002). Structure of a new echinocystic acid bisdesmoside isolated from *Codonopsis lanceolata* roots and the cytotoxic activity of prosapogenins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4190–4193.
- [5] W. Slupski, B. Tubek, and A. Matkowski (2011). Micropagation of *Codonopsis pilosula* (Franch) Namf by axillary shoot multiplication. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*.
- [6] Y. G. Lee, J. Y. Kim, J. Y. Lee et al (2007). Regulatory effects of *Codonopsis lanceolata* on macrophage-mediated immune responses. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(1), 180–188.