

Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của cây Đảng sâm trong điều kiện in vitro

Phạm Hương Sơn*, Nguyễn Thị Lại

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 9.3.2015, ngày chuyển phản biện 13.3.2015, ngày nhận phản biện 18.4.2015, ngày chấp nhận đăng 24.4.2015

Đảng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume)) thuộc họ Campanulaceae, là một loại thảo dược quý. Tuy nhiên, số lượng cây ngoài tự nhiên đang giảm nhanh do vùng phân bố bị thu hẹp cùng với sự gia tăng về nhu cầu khai thác và tỷ lệ hạt nảy mầm thấp. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên khả năng tạo chồi và rễ của Đảng sâm trong điều kiện *in vitro* cho thấy: khử trùng bằng dung dịch 3% NaOCl trong 10 phút rồi cấy trên môi trường SH có bổ sung 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa cho tỷ lệ mẫu sống và vô trùng cao nhất, đạt 66,5% sau 2 tuần. Khả năng nhân nhanh chồi sau 6 tuần đạt cao nhất (19,28 chồi/mẫu, chiều cao chồi 4,67 cm) trên môi trường SH bổ sung 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa + 1,0 mg/l TDZ + 0,5 mg/l α NAA. Sau 4 tuần nuôi cấy chồi *in vitro* tạo rễ bất định và tăng trưởng tốt nhất (chiều cao 7,36 cm/chồi; 7,03 lá/chồi; 11,17 rễ/chồi) trên môi trường SH bổ sung 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa + 0,5 mg/l IBA.

Từ khóa: cây thuốc, chất điều hòa sinh trưởng, Đảng sâm, nuôi cấy in vitro.

Chỉ số phân loại 4.6

EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS ON THE MORPHOGENESIS OF CODONOPSIS JAVANICA (BLUME) UNDER IN VITRO CONDITIONS

Summary

Codonopsis javanica (Blume) belongs to the Campanulaceae family and is an important medicinal plant. However, the number of this plant in the nature has been decreasing dramatically because of its narrow distribution, overexploitation and low germination of seeds. The results of studying the effects of plant growth regulators on the formation of shoots and roots of this species under *in vitro* conditions showed that: the explants sterilized with 3% NaOCl for 10 min and then cultured in SH medium supplemented with 3% saccharose + 0.8% agar + 10% coconut water (CW) yielded the highest survival and clean explants (66.5%) after 2 weeks of culture. After 6 weeks, the capability of *in vitro* shoot multiplication was the highest (19.28 shoots/explant, length of 4.67 cm/shoot) in SH medium supplemented with 3% saccharose + 0.8% agar + 10% CW + 1.0 mg/l TDZ + 0.5 mg/l α NAA. After 4 weeks of culture, *in vitro* shoots produced adventitious roots and grew best (length of 7.36 cm/shoot, 7.03 leaves/shoot and 11.17 roots/shoot) when being grown in SH medium supplemented with 3% saccharose + 0.8% agar + 10% CW + 0.5 mg/l IBA.

Keywords: *Codonopsis javanica* (Blume), growth regulators, *in vitro*, medicinal plant.

Classification number 4.6

Mở đầu

Đảng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume)) thuộc họ Campanulaceae, là một loại thảo dược quý trong y học cổ truyền của các nước châu Á như: Trung Quốc, Mianma, Ấn Độ, Lào, Nhật Bản, Việt Nam. Ở nước ta, Đảng sâm thường phân bố ở Lai Châu, Lào Cai, Hà Giang, Hòa Bình, Lâm Đồng.

Theo y học cổ truyền, Đảng sâm có tác dụng chữa tỳ vị suy kém, phế khí hư nhược, kém ăn, mệt mỏi, sa tử cung, tăng bạch cầu, viêm họng, dạ dày... [1]; kháng u, kháng khuẩn và tăng cường miễn dịch.... [2, 3]. Theo các tác giả Zhu E và cs (2001) [4] và Li C.Y và cs (2009)

* Tác giả chính, Email: phson2008@gmail.com

[5], trong rễ cây Đẳng sâm có chứa polysaccharides, saponins, alkaloids và phytosteroids...

Hiện nay, Đẳng sâm đang bị tàn phá nghiêm trọng, mặt khác, tỷ lệ nảy mầm từ hạt trong tự nhiên rất thấp nên loài cây này lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng và được đưa vào “Sách Đỏ Việt Nam” cần được bảo vệ. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tìm ra môi trường nuôi cấy thích hợp để có hệ số nhân chồi cao và tạo cây hoàn chỉnh trong thời gian ngắn, góp phần sản xuất giống cây được liệu quý này với quy mô lớn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu nghiên cứu là đoạn thân cây Đẳng sâm có mầm sinh trưởng được thu hái từ Hòa Bình.

- Chất khử trùng dùng trong thí nghiệm: NaOCl.

- Môi trường nuôi cấy: SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) [6].

- Chất kích thích sinh trưởng được bổ sung vào môi trường là: KIN, TDZ, IBA, α NAA.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu khử trùng mẫu: xác định nồng độ và thời gian khử trùng mẫu bằng NaOCl. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại với nồng độ NaOCl (1%; 2%; 3%; 4%) và thời gian tương ứng (5; 10; 15; 20 phút).

Các bước tiến hành: mẫu được rửa dưới vòi nước chảy, sau đó cắt đoạn thân mang chồi ngủ có kích thước $1,5-2,0 \pm 0,2$ cm được khử trùng bằng 1-4% NaOCl trong 5-20 phút, rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng khoảng 3 lần. Sau đó cấy trên môi trường SH, bổ sung 3% đường, 0,8% thạch, 10% nước dừa.

Nghiên cứu nhân nhanh chồi *in vitro*: nghiên cứu ảnh hưởng KIN, TDZ, α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại với nồng độ KIN [0 (Đ/C); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l] và TDZ với nồng độ [0 (Đ/C); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l] bổ sung vào môi trường SH.

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi: từ kết quả của thí nghiệm KIN, TDZ bổ sung nêu trên, thí nghiệm bổ sung α NAA với các nồng độ [0 (Đ/C); 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l] kết hợp với KIN và bổ sung α NAA với các nồng độ [0

(Đ/C); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg/l] kết hợp với TDZ bổ sung vào môi trường SH. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại.

Các bước tiến hành: cây Đẳng sâm *in vitro* được cắt thành từng đoạn mang chồi ngủ có kích thước $1,5-2,0 \pm 0,2$ cm. Sau đó, mẫu được cấy trên môi trường SH có bổ sung KIN, TDZ, KIN + α NAA, TDZ + α NAA, 3% đường, 0,8% thạch, 10% nước dừa.

Nghiên cứu môi trường tạo *in vitro* cây hoàn chỉnh: nghiên cứu tạo rễ cây Đẳng sâm *in vitro*. Thí nghiệm bổ sung α NAA hoặc IBA với nồng độ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) vào môi trường SH bổ sung 3% đường, 0,8% thạch, 10% nước dừa. Đối chứng: không bổ sung α NAA hoặc IBA.

Các bước tiến hành: các chồi *in vitro* của cây Đẳng sâm có kích thước $4,0 \pm 0,2$ cm được tách ra từ cụm chồi trên môi trường nhân nhanh được cấy trên môi trường SH bổ sung 3% đường, 0,8% thạch, 10% nước dừa, với các nồng độ từ 0,5-2,0 mg/l α NAA và 0,5-2,0 mg/l IBA để khảo sát khả năng hình thành rễ *in vitro*. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại. Ở tất cả các thí nghiệm trên, mỗi công thức là 30 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu thí nghiệm: nghiên cứu tiến hành theo dõi định kỳ 1 tuần/lần. Theo dõi các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu sống (%), mẫu nhiễm (%), khả năng sinh trưởng của chồi, số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá (lá/chồi), số rễ (rễ/chồi)... Các thí nghiệm được đặt trong phòng thí nghiệm có cường độ chiếu sáng 2.400 lux, thời gian chiếu sáng là 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng $24 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm phòng $55 \pm 5\%$. Các số liệu thu thập được phân tích thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và ANOVA.

Kết quả và thảo luận

Tạo vật liệu khởi đầu

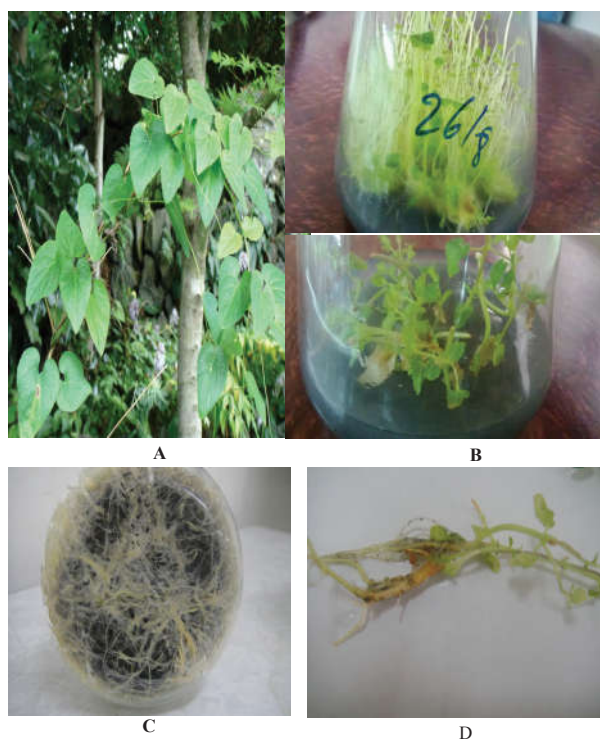
Vật liệu nghiên cứu là các đoạn thân của cây Đẳng sâm. Trước khi đưa vào nuôi cấy, mẫu được xử lý khử trùng bằng NaOCl với các nồng độ và thời gian khác nhau. Khử trùng đoạn thân của cây Đẳng sâm bằng dung dịch 3% NaOCl trong thời gian 10 phút tỷ lệ sống đạt cao nhất (66,5%). Khi tăng nồng độ và thời gian khử trùng lên, tỷ lệ mẫu sống giảm dần. Tỷ lệ sống thấp nhất khi xử lý ở nồng độ 4% NaOCl trong 20 phút, chỉ là 24,5% (bảng 1).

Bảng 1: ảnh hưởng của thời gian và nồng độ NaOCl đến mẫu Đảng sâm

Thời gian (phút)	Tỷ lệ % mẫu											
	Nồng độ 1%			Nồng độ 2%			Nồng độ 3%			Nồng độ 4%		
	Sống	Nhiễm	Chết	Sống	Nhiễm	Chết	Sống	Nhiễm	Chết	Sống	Nhiễm	Chết
5	26,5	66,2	7,3	29,1	58,6	12,3	36,9	54,6	8,5	26,5	46,2	27,3
10	35,2	50,4	14,4	52,1	31,9	16,0	66,5	20,5	13,0	40,1	21,8	38,1
15	40,3	39,6	20,2	50,0	20,6	29,4	52,0	21,5	26,5	32,3	15,7	52,0
20	35,6	34,2	30,2	42,0	22,8	35,2	48,0	33,8	19,0	24,5	12,8	62,7

Như vậy, khử trùng đoạn thân của cây Đảng sâm bằng dung dịch 3% NaOCl trong thời gian xử lý 10 phút là thích hợp nhất.

Giai đoạn nhân nhanh



Hình 1: Đảng sâm và các giai đoạn nhân giống
A- Đảng sâm (*Codonopsis javanica*); B- Giai đoạn nhân nhanh;
C, D- Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Ảnh hưởng của KIN đến quá trình nhân nhanh chồi: KIN thuộc nhóm cytokinin, chúng được bổ sung vào môi trường chủ yếu để kích thích sự phân chia tế bào và phân hóa chồi bất định, tăng cường khả năng tổng hợp chất diệp lục của cây. Để đánh giá ảnh hưởng của KIN lên quá trình hình thành cụm chồi, chúng tôi bổ sung KIN với nồng độ từ 0,5 đến 2,0 mg/l vào môi trường và kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của KIN được trình bày ở bảng 2. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, KIN có

tác dụng không rõ rệt về làm gia tăng số chồi của Đảng sâm. Như vậy, nếu bổ sung đơn lẻ KIN sẽ có tác dụng thấp đến quá trình nhân nhanh chồi Đảng sâm.

Ảnh hưởng của TDZ đến quá trình nhân nhanh chồi: TDZ có tác động rất hiệu quả đến nhân chồi của nhiều loài cây. Để tìm hiểu ảnh hưởng của TDZ đến khả năng nhân chồi *in vitro* của Đảng sâm, chúng tôi bổ sung TDZ với nồng độ từ 0,5 đến 2,0 mg/l vào môi trường và kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: ảnh hưởng của TDZ, KIN đến quá trình nhân nhanh chồi

Chất kích thích sinh trưởng (mg/l)		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
KIN	TDZ		
0 (Đ/C)	-	1,72 c	2,92 d
0,5	-	3,36 a	3,24 a
1,0	-	2,86 ab	3,18 ab
1,5	-	2,50 b	3,06 bc
2,0	-	2,47 b	3,01cd
LSD 0,05		0,52	0,13
CV(%)		3,2	3,4
-	0 (Đ/C)	1,73 e	1,90 d
-	0,5	6,16 b	3,27 b
-	1,0	6,55 a	3,54 a
-	1,5	5,11 c	3,08 bc
-	2,0	4,04 d	2,93 c
LSD 0,05		0,13	0,21
CV(%)		3,0	4,8

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

Bảng 2 cho thấy, TDZ có tác dụng kích thích mạnh đến quá trình nhân nhanh chồi ở cây Đảng sâm. Ở nồng độ 1,0 mg/l TDZ bổ sung vào môi trường, số chồi trên mẫu đã tăng lên 6,55 chồi/mẫu và chiều cao chồi đạt 3,54 cm, sai khác ở mức đáng tin cậy so với đối chứng và các nồng độ khác. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ TDZ lớn hơn 1,0 mg/l, số chồi/mẫu, chiều cao chồi lại có xu hướng giảm dần và chồi có hiện tượng vàng.

Ảnh hưởng của tổ hợp KIN + α NAA, TDZ + α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi: khi kết hợp auxin với cytokinin sẽ giúp sự tăng trưởng chồi non và khởi phát sự tạo mới mô phân sinh ngọn chồi từ nhu mô. Gaspar và cs (2003) [7] cho rằng, các thí nghiệm tạo chồi bất định thường cho kết quả cao khi sử dụng cytokinin nồng độ cao và auxin nồng độ từ thấp đến trung bình. Do đó, các auxin trong thí nghiệm này được sử dụng ở nồng độ thấp nhằm khảo sát tác động của sự phối hợp giữa auxin (α NAA) với KIN, TDZ lên sự tạo chồi cây Đảng sâm.

Kết quả nghiên cứu sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3 cho thấy: trên môi trường bổ sung tổ hợp KIN ở nồng độ 0,5 mg/l và α NAA nồng độ từ (0,2-1,0 mg/l) có tác dụng tích cực tới sự phát sinh cụm chồi, nhưng thích hợp nhất cho việc tăng hệ số nhân chồi, chiều cao chồi là môi trường bổ sung 0,5 mg/l KIN kết hợp với 0,2 mg/l α NAA so với công thức khác ở mức có ý nghĩa thống kê. Ở môi trường này, số lượng chồi đạt 12,10 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 4,56 cm. Khi tăng nồng độ α NAA cao hơn 0,2 mg/l có xu hướng làm giảm khả năng tạo chồi của mẫu cây. Như vậy, việc bổ sung α NAA vào môi trường kết hợp với KIN làm tăng hiệu quả tạo chồi, tuy nhiên số chồi vẫn còn thấp, chất lượng chồi chưa cao.

Khi kết hợp TDZ với α NAA ở nồng độ và tỷ lệ thích hợp có thể nâng cao hệ số nhân chồi và chất lượng chồi đối với một số cây trồng như cây *Cymbidium faberi* Rolfe (Jun Tao và cs (2011) [8]. Do vậy, TDZ ở nồng độ 1,0 mg/l (nồng độ cho hiệu quả nhân nhanh chồi tốt nhất) đã được sử dụng phối hợp với α NAA nồng độ từ 0,5-3,0 mg/l nhằm tăng hiệu quả nhân nhanh chồi Đảng sâm. Trên môi trường có 0,5 mg/l α NAA và 1,0 mg/l TDZ sau 6 tuần nuôi cấy, số chồi đạt cao nhất là 19,28 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 4,67 cm, chất lượng chồi rất tốt, chồi xanh và mập. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ α NAA lớn hơn 0,5 mg/l thì số chồi có xu hướng giảm dần. Ở nồng độ 3,0 mg/l đã thể hiện ức chế sự phát sinh chồi *in vitro* (chỉ đạt 6,52 chồi/mẫu), chiều cao chồi đạt 3,83 cm, chồi có hiện tượng vàng úa.

Bảng 3: ảnh hưởng của tổ hợp KIN + α NAA, TDZ + α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi

KIN (mg/l)	TDZ (mg/l)	α NAA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0,5	-	0 (Đ/C)	3,38 e	3,91 d
0,5	-	0,2	12,10 a	4,56 a
0,5	-	0,4	7,79 b	4,16 b
0,5	-	0,6	6,15 c	3,81 c
0,5	-	0,8	6,10 c	3,52 d
0,5	-	1,0	5,41 cd	3,20 e
LSD 0,05			0,34	0,2
CV(%)			3,1	4,2
-	1,0	0 (Đ/C)	6,54 d	3,96 de
-	1,0	0,5	19,28 a	4,67 a
-	1,0	1,0	14,03 b	4,45 b
-	1,0	1,5	10,15 c	4,22 c
-	1,0	2,0	9,08 c	4,05 d
-	1,0	2,5	7,02 d	3,98 de
-	1,0	3,0	6,52 d	3,83 e
LSD 0,05			2,0	0,16
CV(%)			4,5	2,3

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Auxin được bổ sung vào môi trường để tăng cường khả năng tạo rễ (Tiwari và cs, 2000) [9]. Tuy nhiên, với các loài cây khác nhau thì loại auxin và nồng độ là khác nhau. Ở đây chúng tôi tiến hành nghiên cứu thí nghiệm với α NAA và IBA. Trong nghiên cứu này, IBA tỏ ra thích hợp hơn trong việc kích thích chồi Đảng sâm tạo rễ so với α NAA. Mặc dù bổ sung α NAA vào môi trường nuôi cấy đã cải thiện được chất lượng bộ rễ Đảng sâm so với đối chứng nhưng chiều cao cây, số lá, tỷ lệ chồi ra rễ vẫn còn thấp.

Trên môi trường có chứa IBA, thời gian xuất hiện rễ và chất lượng bộ rễ Đảng sâm đã được cải thiện rõ rệt. Kết quả nghiên cứu ở bảng 4 cho thấy: sau 4 tuần nuôi cấy, môi trường có bổ sung IBA đã thúc đẩy quá trình hình thành và phát triển rễ từ chồi *in vitro*; số chồi ra rễ đạt từ 5,90 đến 11,17 rễ so với môi trường không bổ sung IBA. Tuy nhiên, ở các mức nồng độ khác nhau thì khả năng cảm ứng tạo rễ *in vitro* cũng khác nhau. Đặc biệt, ở môi trường bổ sung IBA nồng độ 0,5 mg/l, chiều cao chồi, số lá và khả năng hình thành rễ là tốt nhất: chiều cao chồi đạt 7,36 cm, số lá 7,03, số rễ 11,17. Khi tăng nồng độ IBA lớn hơn 0,5 mg/l thì chiều cao chồi, số lá và khả năng hình thành rễ *in vitro* giảm dần.

Bảng 4: ảnh hưởng của α NAA, IBA đến khả năng ra rễ của chồi

α NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi
0 (Đ/C)	-	3,11 c	4,9 c	2,48 d
0,5	-	3,51 c	5,5 a	4,23 c
1,0	-	5,30 a	5,57 a	7,26 a
1,5	-	4,56 ab	5,25 b	6,28 b
2,0	-	4,42 b	4,13 d	6,10 b
LSD 0,05		0,25	0,19	0,23
CV(%)		2,7	3,1	4,0
-	0 (Đ/C)	3,21 d	4,70 d	3,42 e
-	0,5	7,36 a	7,03 a	11,17 a
-	1,0	6,50 b	6,84 a	9,55 b
-	1,5	6,42 b	6,58 b	6,50 c
-	2,0	5,58 c	5,51 c	5,90 d
LSD 0,05		0,22	0,24	0,15
CV(%)		2,1	3,2	2,3

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

Trong nghiên cứu này, IBA ở nồng độ 0,5 mg/l được chứng minh là có hiệu quả nhất cho rễ, dẫn đến rễ dài và khỏe mạnh. Tác dụng kích thích khả năng

hình thành rễ *in vitro* của IBA cũng đã được báo cáo ở nhiều loài cây thuốc khác như: *Ocimum basilicum* (Sahoo và cs, 1997) [10], *Tylophora indica* (Faisal and Anis, 2003) [11].

Kết luận

1. Chế độ khử trùng mẫu thích hợp cho Đảng sâm được xác định là 3% NaOCl trong thời gian xử lý 10 phút. Công thức này cho tỷ lệ mẫu sống và vô trùng cao, đạt 66,5% sau 2 tuần theo dõi.

2. Môi trường tốt nhất cho nhân nhanh chồi Đảng sâm là bổ sung 1,0 mg/l TDZ + 0,5 mg/l α NAA bổ sung vào môi trường SH + 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa. Trên môi trường này sau 6 tuần nuôi cấy cho hệ số nhân chồi cao (19,28 chồi/mẫu), chiều cao chồi (4,67 cm), chất lượng chồi tốt, chồi xanh và mập.

3. Môi trường tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh thích hợp là bổ sung 0,5 mg/l IBA vào môi trường SH + 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa. Trên môi trường này sau 4 tuần nuôi cấy, chiều cao chồi đạt 7,36 cm; số lá: 7,03; số rễ: 11,17, chất lượng chồi cao và xanh.

Tài liệu tham khảo

[1] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập I, NXB Khoa học và Kỹ thuật.

[2] Luo H, Lin S, Ren F, Wu L, Chen L, Sun Y (2007), "Antioxidant and antimicrobial capacity of Chinese medicinal herb extracts in raw sheep meat", *J Food Prot.*, **70**(6), pp.1440-5.

[3] Yongxu S, Jicheng L (2008), "Structural characterization of a watersoluble polysaccharide from the roots of *Codonopsis pilosula* and its immunity activity", *Int J Biol Macromol*, **43**(3), pp.279- 282.

[4] Zhu E, Wang Z, Xu G, Leung H, Yeung H (2001), "HPLC/MS fingerprint analysis of tangshenosides", *Zhong Yao Cai.*, **24**(7), pp.488-90.

[5] Li C.Y, Xu H.X, Han Q.B, Wu T.S (2009), "Quality assessment of *Radix Codonopsis* by quantitative nuclear magnetic resonance", *NCBI*, **1216**(11), pp.2124-9.

[6] Schenk R.H & Hildebrandt A.C (1972), "Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures", *Canadian Journal of Botany*, **50**, pp.199-204.

[7] Gaspar T, Kevers C, Faivre-Rampant O, Crèvecoeur M, Penel C, Gerppin H and Dommes J (2003), "Changing concept in plant hormone action", *In Vitro Cell Dev. Pl.*, **39**(2), pp.85-106.

[8] Jun Tao, Liqin Yu, Fen Kong and Daqiu Zhao (2011), "Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe", *African Journal of Biotechnology*, **10**(69), pp.15639-15646.

[9] Tiwari V, Tiwari K.N and Singh B.D (2000), "Comparative studies of cytokinin on *in vitro* propagation of *Bacopa monnieri*", *Plant Cel., Tissue Organ. Cult.*, **66**(1), pp.9-16.

[10] Sahoo Y, Pattnaik S.K, and Chand P.K (1997), "In vitro clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation", *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **33**, pp.293-296.

[11] Faisal M and Anis (2003), "Rapid mass propagation of *Tylophora indica* Merrill via leaf callus culture", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **75**, pp.125-129.