

Sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo lá cây Hoàn ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Ness) Radlk)

- Trần Thị Tuyết Nhung
- Phan Ngô Hoang
- Nguyễn Du Sanh

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 08 năm 2014, nhận đăng ngày 16 tháng 01 năm 2015)

TÓM TẮT

Cây Hoàn ngọc chứa nhiều hợp chất có giá trị trong lĩnh vực dược phẩm dược liệu. Trong nghiên cứu này, sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo lá cây Hoàn ngọc *in vitro* được thực hiện và phân tích. Mô sẹo được cảm ứng 3 tuần trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/l hay 2 mg/l, phôi thể hệ thu nhận trên môi trường MS theo tiến trình: phôi hình

cầu sau 9 ngày, hình tim sau 13 ngày, hình cá đuối sau 15 ngày và phôi trưởng thành sau 17 ngày. Số lượng phôi thu được trung bình đạt 28,5 phôi/ cm² mô lá. Cường độ hô hấp và hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của mô lá trong quá trình nuôi cấy đã được ghi nhận.

Từ khóa: Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, Hoàn ngọc, mô sẹo, phôi thể hệ

MỞ ĐẦU

Hiện nay, Hoàn ngọc được đánh giá là nguồn dược liệu đa dụng trong điều trị các triệu chứng viêm nhiễm, kháng sự tăng trưởng của vi khuẩn [1]. Các bộ phận thường được khai thác sử dụng trong thực phẩm chức năng hiệu quả nhất gồm có lá và rễ, kết quả phân tích cho thấy lá tươi rất giàu Ca, Mg và Fe [2]. Ngoài ra, nhiều acid amin tự do như lysine, methionine, threonine hiện diện trong lá cùng với những chất có hoạt tính sinh học có giá trị như lupeol, lupenone, belutin, acid pomolic... trong rễ cây Hoàn ngọc cũng được sử dụng để sản xuất các dược phẩm điều trị những bệnh do viêm nhiễm, ung thư...[1,3-5], Petrusa và cs.2013. Ở Việt Nam, những nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* về cây có nhiều giá trị trong y học

này còn khá hạn chế, đặc biệt là các nghiên cứu phôi thể hệ (phôi vô tính/phôi soma). Trong khi đó, việc tìm một phương pháp nuôi cấy thích hợp để có thể thu nhận những cây đồng nhất về số lượng và chất lượng sẽ có ý nghĩa rất lớn trong công nghệ dược phẩm dược liệu. Bên cạnh các nghiên cứu tìm hiểu chồi phát sinh từ lá [6] hay sự phát sinh chồi từ nuôi cấy lông thân [7], nghiên cứu này tập trung tìm hiểu quá trình sinh phôi thể hệ từ mô sẹo lá cây Hoàn ngọc và qua đó phân tích các giai đoạn hình thành và phát triển phôi nhằm mục đích có thể áp dụng vi nhân giống theo qui mô công nghiệp trong tương lai, một ứng dụng quan trọng của công nghệ dược phẩm dược liệu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**Vật liệu**

Các cặp lá thứ 2 (tính từ ngọn, kích thước trung bình 2x1cm) của cây Hoàn ngọc in vitro 6 tuần tuổi trên môi trường MS [8] có bổ sung nước dừa 10%.

Phương pháp**Cảm ứng phôi thể hệ.**

Các mảnh lá được tạo những vết thương ngang qua gân chính và đặt úp trên các môi trường:

Nghiệm thức 1. MS có bổ sung 2,4-D1 mg/l

Nghiệm thức 2. MS có bổ sung 2,4-D2 mg/l

Nghiệm thức 3. MS có bổ sung 2,4-D2 mg/l và BA 0,5 mg/l

Nghiệm thức 4. MS có bổ sung IAA 1 mg/l, và BA 0,5 mg/l

Nghiệm thức 5. MS có bổ sung IAA 2 mg/l và BA 0,5 mg/l

Tất cả các môi trường đều được bổ sung sacarose 30 g/l, agar 5 g/l, pH 5,8. Các mẫu cây được theo dõi sự phát sinh hình thái thực vật ở 22 ± 2 °C, trong tối, ẩm độ không khí 65 ± 10 %.

Sự phát sinh phôi thể hệ.

Cô lập các khối mô sẹo 3 tuần tuổi có kích thước 1x1cm và cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung sacarose 30 g/l, agar 5 g/l, pH 5,8. Theo dõi sự phát sinh phôi thể hệ theo thời gian ở 22 ± 2 °C, $3,000 \pm 500$ x (12/12), ẩm độ không khí 65 ± 10 %.

Phân tích hình thái giải phẫu

Hình thái của quá trình phát sinh mô sẹo và phôi thể hệ được theo dõi dưới kính hiển vi soi nổi theo thời gian nuôi cấy. Các cấu trúc phôi thể hệ được phân tích thông qua sự giải phẫu, nhuộm hai màu và quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Xác định cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của hệ thống mô sẹo trong giai đoạn cảm ứng sinh phôi thể hệ trên những môi trường nuôi cấy khác nhau theo thời gian được xác

định nhờ máy Warburg ở 25 °C, trong tối. Kết quả thể hiện bằng lượng oxygen hấp thu của khối mô theo thời gian ($\mu\text{O}_2/\text{g}/\text{giờ}$).

Phân tích hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của khối mô sẹo trên những môi trường cảm ứng sau 3 tuần được ly trích dựa vào sự sử dụng các dung môi hữu cơ và thay đổi pH thích hợp. Kỹ thuật sắc ký bản mỏng silicagel (F₂₅₄ – 1,0554 Merck) được sử dụng để cô lập các chất này. Hoạt tính IAA, ABA, Zea và GA₃ được xác định nhờ sinh trắc nghiệm.

Xử lý số liệu

Số liệu thu được từ các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm SPSS (phiên bản 11.5) dùng cho Windows. Sự phân hạng, chia nhóm theo công thức Duncan, Dunnett, những khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$ (p: probability) của các giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo.

KẾT QUẢ**Cảm ứng sự sinh phôi thể hệ**

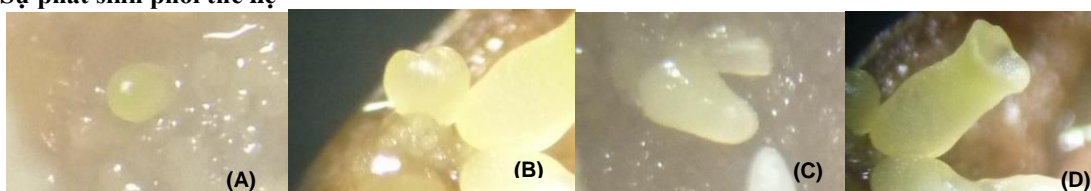
Trên các môi trường có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 1 hay 2 mg/l, mô sẹo xuất hiện tại vị trí các vết thương sau 1 tuần. Các mảnh lá dần chuyển từ màu xanh sang màu vàng nâu, khối mô sẹo bắt đầu tăng trưởng. Sau 3 tuần nuôi cấy, ghi nhận mô sẹo xuất hiện dưới hai dạng: dạng chắc có màu nâu đen và dạng bở, màu vàng (Hình 1A).

Trong khi đó, trên môi trường có bổ sung 2,4-D 2 mg/l và BA 0,5 mg/l, mô sẹo phát triển tốt hơn nhưng mô sẹo bở hơn và có màu nâu vàng (Hình 1B). Trên môi trường có bổ sung IAA 1 mg/l và BA 0,5 mg/l, mô sẹo xuất hiện từ tuần lễ thứ 2, mô sẹo tăng trưởng chậm, mẫu lá vẫn giữ màu xanh (Hình 1C). Tất cả mảnh lá trên các môi trường cảm ứng này đều không ghi nhận được cấu trúc phôi thể hệ xuất hiện trong suốt quá trình nuôi cấy.



Hình 1. Mẫu mô sẹo sau 3 tuần cảm ứng trên môi trường có bổ sung 2,4-D 2 mg/l (A); 2,4-D 2 mg/l và BA 0,5 mg/l (B); IAA 1 mg/l và BA 0,5 mg/l (C)

Sự phát sinh phôi thể hệ

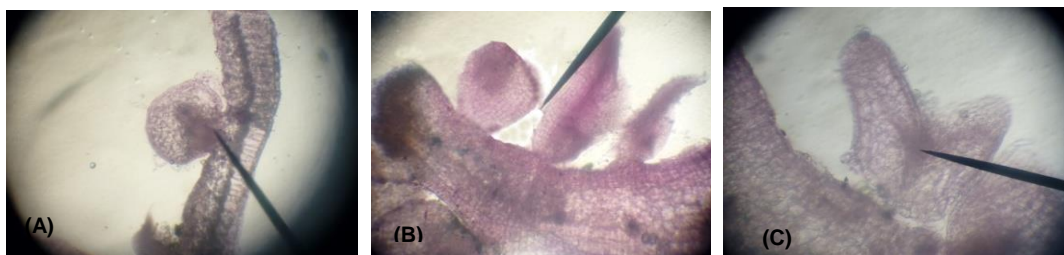


Hình 2. Phôi thể hệ phát sinh qua các giai đoạn:

hình cầu (A), hình tim (B), hình cá đuôi (C) và phôi trưởng thành (D)

Lát cắt dọc qua mẫu cấy cho thấy cấu trúc phôi ở các giai đoạn rất đặc trưng: hình cầu với biểu bì hóa rõ ràng, phôi hình tim với sự hiện

diện của sự phân cực chồi và rễ; phôi trưởng thành với hai tử diệp và mô phân sinh ngọn chồi (Hình 3).



Hình 3. Lát cắt dọc phôi qua các giai đoạn: hình cầu (A), hình tim (B), phôi trưởng thành với hai tử diệp (C)

Nhìn chung, số lượng khối mô sẹo trên môi trường có bổ sung 2,4-D 2 mg/l có phôi thể hệ phát sinh đạt 12,5 %, luôn nhiều hơn so với trên môi trường với 2,4-D 1 mg/l chỉ có 8 %. Trong đó, số phôi hoàn chỉnh ghi nhận được là 28,5/cm² mô lá trên môi trường có 2,4-D 2 mg/l so với 11,75/ m² mô lá trên môi trường với 2,4-D 1

mg/l. Tất cả những khác biệt này đều có ý nghĩa thống kê khi phân tích ANOVA T-test.

Cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của khối mô sẹo gia tăng theo thời gian cảm ứng sinh phôi thể hệ. Ở các nghiệm thức chỉ sử dụng 2,4-D, cường độ hô hấp tăng mạnh vào tuần thứ 2, trong đó những mẫu

trên môi trường nồng độ 2,4-D 2 mg/l cường độ hô hấp cao hơn so với các mẫu trên môi trường có nồng độ 2,4-D 1 mg/l.

Đối với các nghiệm thức có IAA kết hợp BA, hô hấp tăng mạnh ở tuần thứ 3; các nghiệm thức trên môi trường bổ sung 2,4-D kết hợp BA, cường độ hô hấp tăng đều qua các tuần (Bảng 1).

Bảng 1. Cường độ hô hấp của mô sẹo trên các môi trường cảm ứng theo thời gian

	Cường độ hô hấp ($\mu\text{O}_2/\text{g}/\text{giờ}$)		
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
MS bổ sung 2,4-D 1 mg/l	213,4 \pm 10,7 ^a	674,8 \pm 72,1 ^a	807,1 \pm 35,9 ^a
MS bổ sung 2,4-D 2 mg/l	262,7 \pm 28,6 ^b	706,8 \pm 74,9 ^a	824,7 \pm 92,1 ^a
MS bổ sung 2,4-D 2 mg/l và BA 0,5 mg/l	99,8 \pm 7,1 ^{cd}	171,5 \pm 10,2 ^b	302,2 \pm 24,5 ^b
MS bổ sung IAA 1 mg/l và BA 0,5 mg/l	56,1 \pm 8,5 ^e	91,4 \pm 2,9 ^b	311,5 \pm 15,6 ^b
MS bổ sung IAA 2 mg/l và BA 0,5 mg/l	69,5 \pm 5,3 ^{ce}	123,3 \pm 15,6 ^b	396,6 \pm 55,1 ^b

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh

Hoạt tính IAA, ABA, GA3, zeatin có sự khác biệt rõ trong các mẫu mô sẹo 3 tuần tuổi. Mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 2 mg/l, hoạt tính IAA và zeatin đều cao hơn hẳn so với môi

trường có 2,4-D 1 mg/l. Ngược lại, acid abscisic trong mô sẹo trên môi trường có 2,4-D 2 mg/l thấp hơn hẳn so với mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 1 mg/l. Trong khi đó, ở thời điểm 3 tuần tuổi, tỉ lệ IAA/zeatin của các mẫu giảm nhẹ trên môi trường có 2,4-D 2 mg/l (Bảng 2).

Bảng 2. Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của mô sẹo trên môi trường cảm ứng sau 3 tuần

Môi trường	Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh (mg/l)				Tỉ lệ IAA / Zea
	IAA	ABA	GA ₃	Zea	
MS có 2,4-D 1mg/l	1,70 \pm 0,39	3,89 \pm 1,32	0,44 \pm 0,07	1,28 \pm 0,30	1,32
MS có 2,4-D 2mg/l	2,21 \pm 0,14	2,35 \pm 0,30	0,32 \pm 0,04	2,07 \pm 0,87	1,06
ANOVA T-test	+	+	-	-	

THẢO LUẬN

Trong mọi quá trình phát sinh hình thái thực vật, bản chất và nồng độ của chất điều hòa tăng trưởng thực vật cũng như tỷ lệ giữa các loại chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau có vai trò quan trọng định hướng phát sinh hình thái bao

gồm: phát sinh mô (histogenesis), phát sinh cơ quan (organogenesis) và phát sinh phôi (embryogenesis). Trong nghiên cứu này, những nghiệm thức có bổ sung 2,4-D ở cả hai nồng độ 1 hay 2mg/l đều có sự phát sinh phôi thể hệ sau khi

chuyển mô sẹo đã cảm ứng sau 3 tuần sang môi trường MS, trong khi những nghiệm thức còn lại chỉ có sự phát sinh và tăng trưởng của mô sẹo. Như vậy, trên đối tượng lá non cây Hoàn ngọc, 2,4-D riêng lẻ có hiệu quả hơn trường hợp có phối hợp với BA trong việc cảm ứng tạo phôi thể hệ. Thông thường, khả năng đáp ứng khác nhau của mô cấy đối với các loại auxin khác nhau do sự khác nhau trong kiểu gen của thực vật [9, 10]. Nồng độ cao 2,4-D 2 mg/l thúc đẩy tốt hơn sự phát sinh phôi thể hệ so với nồng độ thấp 1mg/l (28,5 phôi/ cm² mô lá so với 11,75 phôi/ cm² mô lá).

Mỗi sự kết hợp khác nhau của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật sẽ cảm ứng một chương trình phát sinh hình thái khác nhau. Ngoài ra, sự phát sinh hình thái cũng tùy thuộc vào tỷ lệ khác nhau của auxin và cytokinin [11-14]. Khi chỉ sử dụng 2,4-D riêng lẻ, mô sẹo được cảm ứng phát sinh phôi thể hệ, khi kết hợp thêm với BA, chúng chỉ giúp tăng sinh sẹo mà không thể biệt hóa thành phôi. 2,4-D là một loại auxin nhân tạo có hoạt tính sinh học mạnh, có khả năng hoạt động độc lập trong sự cảm ứng tạo phôi thể hệ, đóng vai trò là chất cảm ứng có hiệu quả trong sự phát sinh phôi ở nhiều loài thực vật [9, 15, 16]. Hơn nữa, sự phát sinh hình thái còn tùy thuộc loài thực vật, loại cơ quan và độ tuổi của mẫu cấy. Đối với sự tạo mô sẹo và phát sinh cơ quan ở cây Hoàn ngọc *in vitro* cho thấy các cặp lá thứ 2 (tính từ ngọn) sẽ tạo được mô sẹo và phát sinh cơ quan dễ dàng và nhanh chóng hơn các cặp lá thứ 3 trong nghiên cứu trước đó của [6]. Sự hô hấp tế bào cung cấp nguồn năng lượng giúp cho sự phân chia tế bào. Cường độ hô hấp của mô sẹo tăng qua các tuần tương ứng với hoạt động tạo và tăng trưởng sẹo đang diễn ra (Bảng 1). Ngay từ tuần 1, mô sẹo trên nghiệm thức chỉ sử dụng 2,4-D có cường độ hô hấp mạnh hơn hẳn so với các nghiệm thức còn lại. Có thể do mô lá đã bắt đầu

xuất hiện sẹo ngay từ tuần này, sớm hơn môi trường sử dụng 2,4-D kết hợp với BA hoặc IAA kết hợp với BA; đến tuần 2, mô sẹo này có sự gia tăng cường độ hô hấp cao nhất; qua tuần 3, cường độ hô hấp vẫn tăng song không chênh lệch bằng tuần trước đó.

Điều này cho thấy các mẫu mô sẹo đã tập trung hoạt động sinh lý mạnh ở tuần thứ 2 để chuẩn bị cho quá trình phát sinh phôi thể hệ của mô sẹo ở tuần thứ 3 sau đó. Số lượng phôi thể hệ tỷ lệ thuận với sự gia tăng cường độ hô hấp. Hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật ở mô sẹo ở các nghiệm thức có sinh phôi thể hệ đều cao hơn so với mẫu không có sự sinh phôi thể hệ. Hoạt tính cao của các nhóm chất điều hòa tăng trưởng thực vật có thể do tế bào đang bước vào giai đoạn chuyên hóa và tích trữ các chất cần thiết chuẩn bị cho sự phát sinh phôi tiếp theo. Nhu cầu về chất điều hòa tăng trưởng thực vật ngoại sinh phụ thuộc vào hàm lượng hormone nội sinh đặc trưng của từng loài thực vật [10, 12, 13]. Tác động hỗ trợ giữa auxin và cytokinin nội sinh đã tạo ra số lượng phôi thể hệ cao hơn ở môi trường MS bổ sung 2,4-D 2mg/l. Ở môi trường này, mô sẹo có hoạt tính auxin và cytokinin đều cao hơn so với MS bổ sung 2,4-D 1mg/l (Bảng 2). Khi IAA nội sinh tương tác với 2,4-D được bổ sung từ môi trường, sự cân bằng của hai yếu tố này tạo ra cơ chế *auxin-feedback*, dẫn đến IAA nội sinh được duy trì ở mức cao thúc đẩy sự phát sinh phôi thể hệ. Điều này cho thấy rõ hơn vai trò quan trọng của auxin nội sinh trong mô cấy, tương tự như những kết quả nghiên cứu sự sinh phôi thể hệ ở *Cucumis sativus* [10]. Auxin và cytokinin đều là những chất chủ chốt có vai trò quyết định trong quá trình tạo phôi thể hệ, đặc biệt là auxin tác động trong giai đoạn cảm ứng sự phát sinh. Theo nhiều tác giả, phôi thể hệ sau khi được cảm ứng phát sinh trên những môi trường thích hợp sẽ được tiến hóa thành cấu trúc phôi

hoàn chỉnh trên những môi trường có sự loại bỏ auxin cùng với sự bổ sung một lượng nhỏ cytokinin nào đó [9, 16]. Trên đối tượng Hoàn ngọc, việc chuyển khối mô sẹo 3 tuần tuổi sang môi trường MS đã tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiến hóa và hoàn thiện cấu trúc của một phôi song tử diệp đặc trưng ở ngày thứ 9 (phôi hình cầu với biểu bì rất rõ), ngày thứ 13 (phôi hình tim với sự phân hóa định hướng cực chồi và cực rễ), ngày thứ 15 (phôi hình cá đuối) và phôi trưởng thành sau 17 ngày với đầy đủ hai tử diệp và mô phân sinh ngọn chồi (Hình 2 và Hình 3).

KẾT LUẬN

Sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo lá cây Hoàn ngọc chịu ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật ngoại sinh, mô sẹo cảm ứng 3 tuần trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/l hay 2 mg/l sẽ phát sinh phôi thể hệ sau khi chuyển sang môi trường MS.

Quá trình phát sinh phôi theo tuần tự: 9 ngày phôi hình cầu, 13 ngày phôi hình tim, phôi hình cá đuối sau 15 ngày và phôi trưởng thành sau 17 ngày. Trong quá trình này, cường độ hô hấp tăng mạnh theo thời gian và sự giảm IAA cùng với sự tăng zeatin là điều kiện thuận lợi cho sự phát sinh phôi thể hệ từ mô lá cây Hoàn ngọc 2 tuần tuổi.

Somatic embryogenesis from Hoàn ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Ness) Radlk) leaf callus

- Tran Thi Tuyet Nhung
- Phan Ngo Hoang
- Nguyen Du Sanh

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Pseuderanthemum palatiferum contains many compounds which have pharmaceutical and medicinal values. In this study, the *in vitro* somatic embryogenesis of callus formed from *Pseuderanthemum palatiferum*'s leaves was performed and analyzed. The calli were induced in three weeks in MS medium with 1 mg.l⁻¹ or 2 mg.l⁻¹ of 2,4-D. The somatic embryos were developed as follows: the globular

embryos formed after 9 days, the heart embryos formed after 13 days, the torpedo embryos formed after 15 days and the cotyledonary embryos formed after 17 days. The mean number of obtained embryos was 28.5 embryos/cm² of leaf tissue. The intensity of respiration and biological activity of endogenous plant growth regulators of leaf tissue during culture were recorded.

Keywords: Callus, plant growth regulators, *Pseuderanthemum palatiferum*, somatic embryogenesis

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. H.K. Dieu, C.B. Loc, S. Yamasaki, Y. Hirata. The Ethnobotanical and Botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam. *JARQ*, 39, 191-196 (2005).
- [2]. H.K. Diêu. Khảo sát thành phần hóa học của lá cây Xuân hoa (*Pseuderanthemum palatiferum*). *Tạp chí Khoa học Trường ĐH Cần Thơ*, 9, 232–240 (2008).
- [3]. P.M. Giang, H.V. Bao and P.T. Son. Phytochemical study on, *Pseuderanthemum palatiferum*. *Journal of Chemistry*, 41, 115-118 (2003).
- [4]. P.Padee, S. Nualkaew, C.Talubmook, S. Sakuljaitrong. Hypoglycemic effect of a leaf extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacol* 132, 491 – 496 (2010).
- [5]. E. Petrusa, E. Braidot, M. Zancani, C. Peresson, A. Bertolini, S. Patui, A. Vianello. Plant flavonoids biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International journal of molecular sciences*, 14(7): 14950-14973 (2013).
- [6]. V.Đ. Trúc, P.N. Hoang. Sự phát sinh chồi từ mô lá cây Hoàn ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk). *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc khu vực phía Nam tại TP Hồ Chí Minh*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 312 – 316 (2009).
- [7]. N.T.T. Hằng, P.N. Hoang. Phát sinh chồi từ sự nuôi cấy lỏng thân cây Hoàn Ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk). *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc tại ĐH Thái Nguyên*, 109-112 (2009).
- [8]. T. Murashige, F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiology Plant* 15, 73-97 (1962).
- [9]. D.T. Nhựt. Công Nghệ Sinh học thực vật. Tập 2. NXB Nông Nghiệp TP. Hồ Chí Minh, 9-31 (2009).
- [10]. H. Lou, S.Kako. Effects of auxin combination on somatic embryogenesis in *Cucumis sativus* L.J. *Japan. Soc. Hort. Sci*, 64, 571–579 (1995).
- [11]. Chaudhury A. and Rongda Q. Somatic embryogenesis and plant regeration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenin in callus induction medium. *Plant cell Tissue and Organ Culture*, 60: 113–120 (2000).
- [12]. I. Machakova, E. Zazimalova, E.F.George. Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. edited by george EF, Hall MA, Geert-Jan De Klerk. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume 1. The Background*. Published by Springer: 175-204 (2008).
- [13]. J. Staden, E. Zazimalova, F.F. George. Plant growth regulators II: cytokinin, their analogues and antagonists. george EF, Hall MA, Geert-Jan De Klerk, eds. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume 1. The Background*. Published by Springer: 205-226 (2008).
- [14]. T.N. Nam, N.D. Sanh. Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hoà tăng trưởng thực vật lên sự phát sinh phôi thể hệ cà tím (*Solanum melongena* L.). *Tạp chí Phát triển Khoa học & công nghệ ĐH Quốc gia TP Hồ Chí Minh*, 12 , 71-80 (2009).

- [15].K. Nomura, A. Komamine. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. Edited by Trevor A. Thorpe. *In vitro Embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 249 - 265 (1995).
- [16].R. Yasmin, F. Javed, M.Arfa. Somatic embryogenesis in callus of wheat (*Triticumaestivum* L.) accession 235/2. *International Journal of Agriculture & Biology*, 3, 163-166 (2001).