

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HOÀ SINH TRƯỞNG THỰC VẬT LÊN SỰ PHÁT SINH PHÔI THỂ HỆ CÀ TÍM (*SOLANUM MELONGENA* L.)

Trịnh Ngọc Nam, Nguyễn Du Sanh
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

TÓM TẮT: Trên môi trường chỉ có sự hiện diện của 2,4-D sự phát sinh mô sẹo xảy ra rất hạn chế, với mô sẹo thường ở dạng xốp và hóa nâu sau 2 tuần nuôi cấy. Khối mô sẹo 3 tuần tuổi cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l kinetin cho thấy có sự xuất hiện phôi thể hệ (phôi soma) dạng hình cầu sau 10 ngày nuôi cấy. Các phôi hình cầu tiếp tục phát triển thành phôi dạng hình tim, sau đó là phôi dạng hình cá đuối và phôi trưởng thành sau 15 ngày nuôi cấy. Các phôi bất thường về hình thái có tỉ lệ 34,3% và không có khả năng nảy mầm thành cây hoàn chỉnh. Trong các môi trường có sự hiện diện của NAA hoặc môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng, khối mô sẹo không phát sinh phôi thể hệ. Sự hiện diện của ethephon có hiệu quả ức chế sự phát sinh phôi từ các khối mô sẹo. Ở nồng độ ethephon 0,3% (w/v), số phôi thể hệ thu nhận không đáng kể. Cây in vitro nảy mầm từ phôi thể hệ được thuần hoá, chuyển ra ngoài vườn ươm đạt tỉ lệ sống 95%.

Từ khóa: tái sinh, chất điều hòa tăng trưởng thực vật, mô sẹo, phôi thể hệ

1. GIỚI THIỆU

Cà tím (*Solanum melongena* L.) thuộc họ *Solanaceae*, là cây trồng xếp vị trí thứ 4 trong những cây rau quả trên thế giới. Đây là cây kinh tế quan trọng ở Đông Nam Á, châu Phi, vùng cận nhiệt đới (Ấn Độ, Trung Mỹ) (FAO, 1999). Ở nước ta, cây cà tím được trồng khá phổ biến do năng suất cao. Cây có thể trồng quanh năm nên góp phần không nhỏ vào tổng sản lượng rau quả của cả nước [1].

Sự phát sinh phôi thể hệ (phôi soma, phôi sinh dưỡng hay somatic embryos) là một con đường quan trọng trong sự tái sinh của thực vật từ những hệ thống nuôi cấy tế bào. Phôi thể hệ trải qua những giai đoạn phát triển căn bản giống phôi hợp tử: phôi dạng hình cầu, phôi dạng hình tim, phôi dạng hình cá đuối (thủy lôi) và phôi trưởng thành [7, 9].

Với mục đích khảo sát quá trình phát sinh phôi thể hệ; khả năng tái sinh cây từ mô, tế bào làm cơ sở và nguồn nguyên liệu cho những nghiên cứu ứng dụng để nâng cao năng suất chất lượng cây cà tím, chúng tôi tiến hành: (1) tìm hiểu quá trình phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo từ diệp cà tím; (2) khảo sát ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo từ diệp cà tím.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây cà tím *Solanum melongena* L. được cung cấp bởi công ty giống Đông Tây. Hạt cà tím được rửa bằng dung dịch xà phòng 10% (v/v). Mẫu hạt này được tiếp tục lãc trong cồn 70° (1 phút), khử trùng trong 3% Ca-hypoclorit (w/v), 10 phút. Sau đó hạt được rửa 4 lần bằng nước cất vô trùng. Hạt sau khi khử trùng, được gieo trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) [5], bổ sung 0,7% agar (w/v), 3% sucrose (w/v). pH môi trường điều chỉnh đến 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ 27±2°C, ánh sáng 2500±500 lux, ẩm độ 55±5%, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Từ diệp cây mầm 12 ngày tuổi được cắt và sử dụng cho những thí nghiệm tạo mô sẹo.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát sự tạo mô sẹo từ từ diệp

Từ diệp từ cây mầm cà tím 12 ngày tuổi được cắt rời. Phần ngọn và cuống được cắt bỏ, giữ lại mảnh từ diệp có kích thước khoảng 0,8±0,1cm. Mảnh mô được cấy lên môi trường MS có chứa 0,7% agar (w/v), 3% sucrose (w/v), pH được điều chỉnh đến 5,8 trước khi khử trùng. Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật được bổ sung theo Bảng 1 để khảo sát sự tạo mô sẹo từ

mảnh từ điệp. Ở các thời điểm 2, 4, 6 ngày nuôi cấy, tiến hành vi cắt lát qua gân chính và nhuộm

màu carmine-veriode các mảnh từ điệp để xác định nguồn gốc mô sẹo.

Bảng 1. Các nghiệm thức môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo từ từ điệp

Nghiệm thức	Thành phần môi trường
D	MS+ 2,4D 1 mg/l
N	MS+ NAA 1 mg/l
DK1	MS+ 2,4-D 1 mg/l, kinetin 0,1 mg/l
DK2	MS+ 2,4-D 2 mg/l, kinetin 0,1 mg/l
DB1	MS+ 2,4-D 1 mg/l, BA 0,1 mg/l
DB2	MS+ 2,4-D 2 mg/l, BA 0,1 mg/l
NK1	MS+ NAA 1 mg/l, kinetin 0,1 mg/l
NK2	MS+ NAA 2 mg/l, kinetin 0,2 mg/l
NB1	MS+ NAA 1 mg/l, BA 0,1 mg/l
NB2	MS+ NAA 2 mg/l, BA 0,2 mg/l

2.2.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của auxin, cytokinine và ethephon lên quá trình phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo

Các khối mô sẹo 1, 2 và 3 tuần tuổi trên môi trường MS bổ sung NAA 2 mg/l, kinetin 0,2 mg/l (nghiệm thức NK2) được cấy chuyển sang các môi trường bổ sung chất điều hoà sinh

trường thực vật theo Bảng 2 để khảo sát sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo. Nguồn cơ chất giải phóng khí ethylen sử dụng là ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) (Mecrk company). Ethephon được lọc qua màng lọc vô trùng, bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã tiệt trùng [8].

Bảng 2. Các nghiệm thức môi trường nuôi cấy khảo sát sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo

Nghiệm thức	Thành phần môi trường
MS0	MS
MS1	MS+ NAA 0,1 mg/l
MS2	MS+ NAA 0,5 mg/l
MS3	MS+ NAA 0,1 mg/l, kinetin 1,0 mg/l
MS4	MS+ NAA 0,5 mg/l, kinetin 1,0 mg/l
MS5	MS+ NAA 0,5 mg/l, kinetin 1,0 mg/l, ethephon 1 mg/l
MS6	MS+ NAA 0,5 mg/l, kinetin 1,0 mg/l, ethephon 3 mg/l

2.2.3. Tái sinh, thu nhận cây hoàn chỉnh từ phôi thể hệ

Phôi thể hệ hình thành trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l và kinetin 1 mg/l, sau 3 tuần tách rời các phôi thể hệ trưởng thành khỏi khối mô sẹo. Các phôi này được cấy chuyển vào môi trường mới. Sau 8 tuần nuôi cấy, cây con được thuần hoá ở điều kiện phòng tăng trưởng có nhiệt độ $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, ánh sáng 5000 ± 100 lux, độ ẩm $60\pm 2\%$. Sau 1 tuần, cây con được gắp ra khỏi ống nghiệm, rửa sạch agar và trồng vào bầu đất. Giá thể sử dụng trồng cây con là hỗn hợp

đất (70%) và tro trấu (30%) được nén vào bầu nhựa 13×10 cm. Giá thể trồng cây được làm ẩm đến độ ẩm $70\pm 5\%$, bầu trồng cây được duy trì ở điều kiện nhà lưới có nhiệt độ $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $60\pm 5\%$.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện ba lần lặp lại. Số liệu thu được từ các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS phiên bản 10.0 dùng cho Window.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Sự tạo mô sẹo từ tử diệp cà tím

Sau 1 tuần nuôi cấy, ở hầu hết các nghiệm thức, trên tử diệp đều có sự xuất hiện của mô sẹo tại những vết cắt ngang gân chính (Bảng 3). Trên các môi trường có nguồn auxin là 2,4-D, mô sẹo hình thành ở dạng xốp hay nhanh chóng hoá nâu sau 10 ngày (Hình 1). Trọng lượng tươi của mô gia tăng không đáng kể. Trên môi trường

với nguồn auxin là NAA, khối mô sẹo hình thành có trọng lượng tươi lớn, có màu hồng nhạt, không hoá nâu. Với sự bổ sung thêm nguồn cytokinin là BA hay kinetin, sự hình thành mô sẹo từ tử diệp xảy ra tốt hơn so với đối chứng (nghiệm thức D, N), nhất là ở nồng độ BA 0,1 mg/l và kinetin 0,2 mg/l (Hình 2).

Bảng 3. Biểu hiện của mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy trên các nghiệm thức

STT	Nghiệm thức	Trọng lượng tươi (mg)	Màu sắc	% mẫu cho rễ	Độ cứng
	D	101,9 ^a ±34,4	nâu đen	30	bờ
	N	325,4 ^a ±74,8	Hồng	80	đặc
1	DK1	758,6 ^c ±211,7	xám nhạt	0	bờ
2	DK2	557,7 ^c ±146,8	xám	0	đặc
3	DB1	744,1 ^c ±97,6	nâu	0	hơi bờ
4	DB2	473,3 ^a ±31,4	nâu	0	hơi bờ
5	NK1	1248,5 ^f ±174,4	vàng nhạt	100	hơi bờ
6	NK2	1557,3 ^g ±51,9	vàng nhạt	0	đặc
7	NB1	670,5 ^d ±35,6	vàng xậm	90	bờ
8	NB2	552,0 ^b ±71,7	vàng xậm	0	bờ

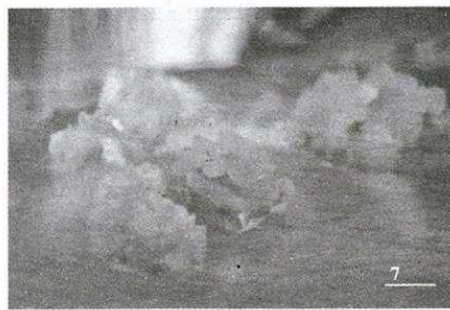
Các chữ đi kèm theo sau các số khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở $p \leq 0,05$.

Các lát cắt ngang qua tử diệp nuôi cấy trên tất cả các nghiệm thức ở thời điểm 2 ngày cho thấy các tế bào nhu mô quanh mạch ở gân chính bắt đầu có sự phân chia mạnh (Hình 3). Sau 4 ngày nuôi cấy, các tế bào tiếp tục phân chia

nhanh chóng, hình thành một khối tế bào phân chia mãnh liệt và được đẩy ra ngoài tạo thành những khối mô sẹo (Hình 4). Như vậy, sự phát sinh mô sẹo từ tử diệp cà tím có thể có nguồn gốc từ những tế bào nhu mô gân mạch.



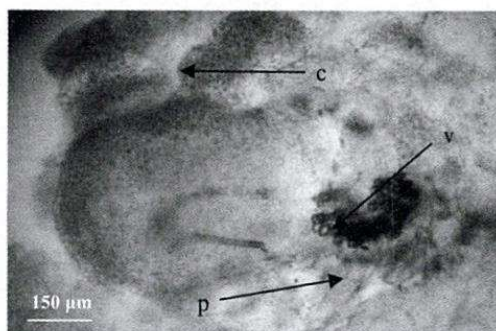
Hình 1. Mô sẹo hoá nâu trên MS bổ sung 2,4-D 2 mg/l, kinetin 0,1 mg/l sau 3 tuần nuôi cấy.



Hình 2. Mô sẹo trên MS bổ sung NAA 2 mg/l, kinetin 0,2 mg/l sau 3 tuần nuôi cấy.



Hình 3. Phẫu thức cắt ngang gân chính từ diệp ở ngày thứ 2. Mũi tên: nhu mô quanh bó mạch của gân chính từ diệp bắt đầu phân chia.



Hình 4. Phẫu thức cắt ngang gân chính từ diệp ở ngày thứ 4. c: khối mô phân chia mảnh liệt từ những tế bào nhu mô gân mạch, p: nhu mô quanh mạch, v: bó mạch

3.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của auxin, cytokinine và ethephon lên quá trình phát sinh hình thái từ mô sẹo

Kết quả khảo sát quá trình phát sinh hình thái trên các nghiệm thức ghi nhận ở Bảng 4.

Bảng 4. Sự phát sinh hình thái (ghi nhận sau 25 ngày) của mô sẹo 3 tuần tuổi trên các nghiệm thức môi trường khác nhau

Nghiệm thức	Thành phần môi trường	Dạng phát sinh hình thái
MS0	MS	Tạo chồi
MS1	MS+ NAA 0,1 mg/l	Tạo rễ
MS2	MS+ NAA 0,5 mg/l	Tạo rễ
MS3	MS+ NAA 0,1 mg/l, kinetin 1,0 mg/l	Phát sinh phôi
MS4	MS+ NAA 0,5 mg/l, kinetin 1,0 mg/l	Phát sinh phôi
MS5	MS+ NAA 0,5 mg/l, kinetin 1,0 mg/l, ethephon 1 mg/l	Không phát sinh phôi
MS6	MS+ NAA 0,5 mg/l, kinetin 1,0 mg/l, ethephon 3 mg/l	Không phát sinh phôi

Ở nghiệm thức MS3, MS4, sau 1 tuần nuôi cấy, có sự xuất hiện của những phôi dạng hình cầu (Hình 5A). Sau 10 ngày nuôi cấy, các phôi tiếp tục phát triển thành phôi dạng hình tim (Hình 5B, 5C), sau đó là phôi dạng hình cá đuôi (thủy lồi) (Hình 5D) và phôi trưởng thành (Hình 5E), biểu hiện bởi những điểm xanh có thể quan sát bằng mắt thường trên khối mô sẹo (Hình 6A). Phôi trưởng thành với cực chồi, cực rễ được nhận thấy sau 15 ngày nuôi cấy (Hình 6B). Sau 25 ngày, các phôi hình thành sơ khởi lá,

tăng trưởng thành cây. Sau 30 ngày, cây con hoàn chỉnh xuất hiện với các rễ kéo dài (Hình 6C). Như vậy, sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo đã xảy ra trên môi trường được bổ sung NAA (0,1-0,5 mg/l) và kinetin (1mg/l).

Ở nghiệm thức MS0, sau 1 tuần nuôi cấy, khối mô sẹo tiếp tục có sự tăng trưởng về kích thước và trọng lượng tươi. Ở tuần thứ 2, khối mô sẹo xuất hiện một số điểm xanh trên bề mặt. Sau 3 tuần, các điểm xanh này phân hoá thành các chồi trên bề mặt khối mô sẹo và không có sự phát sinh phôi.

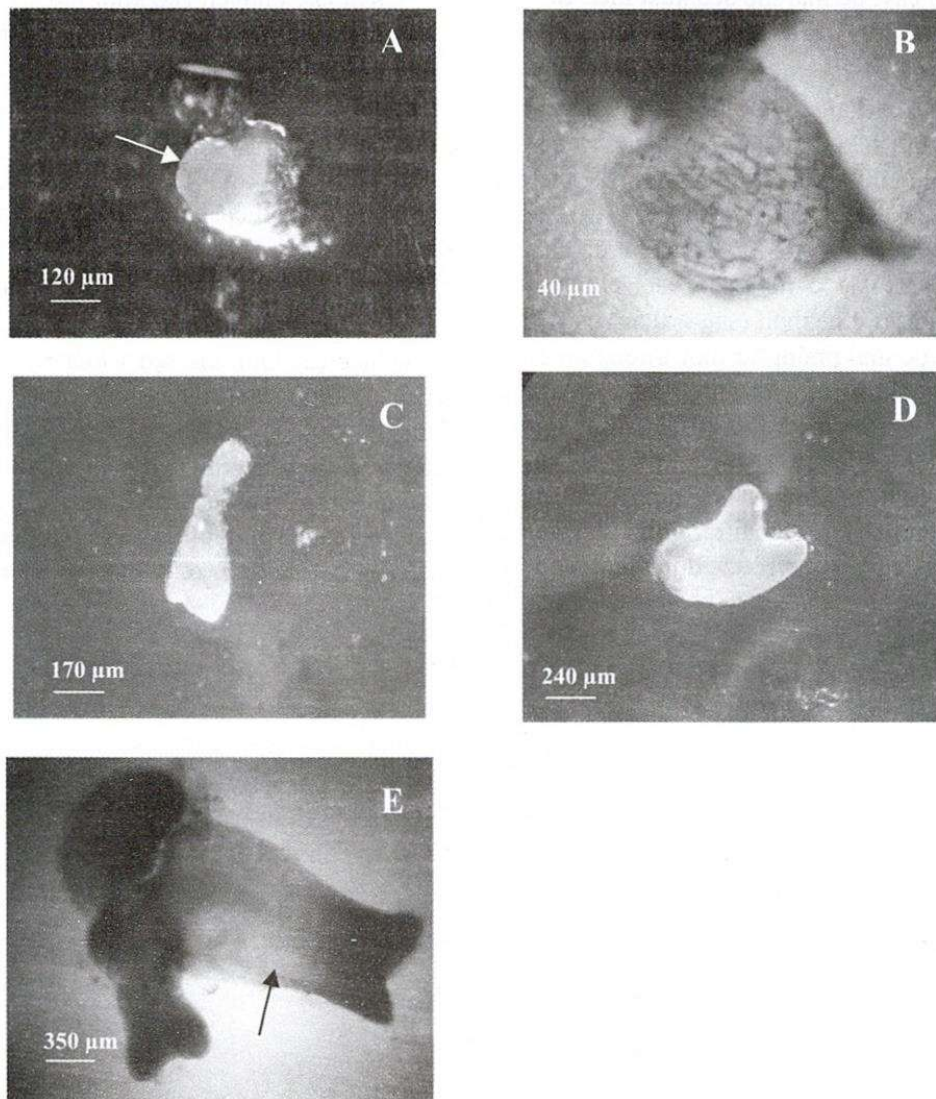
Trên các nghiệm thức MS1, MS2 chỉ bổ sung NAA với nồng độ thấp (0,1 và 0,5 mg/l), sau 1 tuần nuôi cấy, bề mặt mô sẹo xuất hiện các rễ nhỏ, mảnh và không có sự phát sinh phôi.

Trong những nghiệm thức có sự hiện diện của ethephon, số lượng phôi thể hệ thu nhận được giảm dần theo sự tăng của nồng độ ethephon, ở nghiệm thức MS5 số phôi thể hệ thu nhận không đáng kể. Ở nghiệm thức MS6 hầu như không có phát sinh phôi thể hệ nào được ghi nhận (Bảng 4). Có lẽ ở nồng độ cao, ethylen được sản sinh ra từ ethephon (sau 4 tuần, có 22 μ l/l ethylen được giải phóng từ môi trường có 1 mg/l ethephon; 60 μ l/l ethylen được giải phóng từ môi trường có 3 mg/l ethephon) đã làm giảm sự phân chia tế bào, làm gia tăng hàm lượng và tác động của ABA, làm giảm hàm lượng và tác động của gibberellin [3]. Ngoài ra, theo Roustan và cộng sự [6], ethylen còn có tác động kìm hãm pha phân đoạn trong quá trình phát sinh phôi.

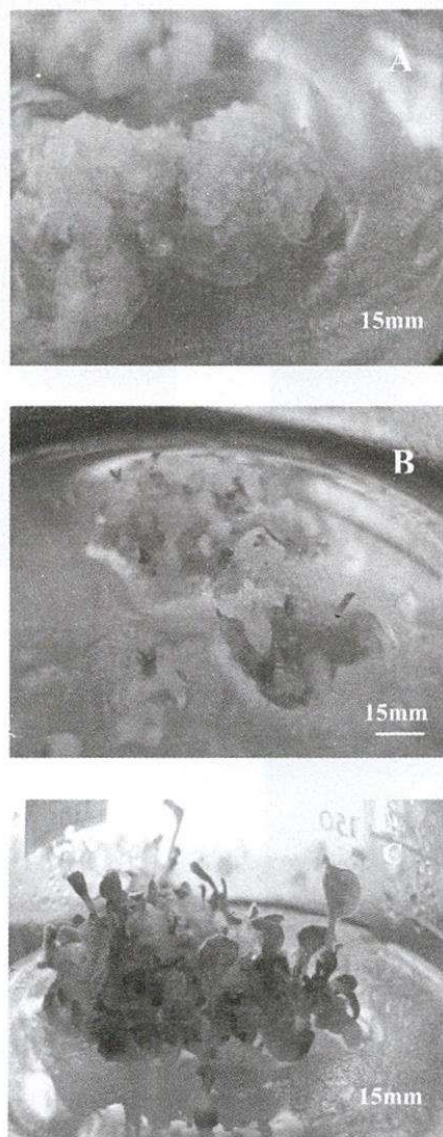
Như vậy, sự bổ sung ethephon vào môi trường nuôi cấy có lẽ đã cản sự phát sinh phôi thể hệ.

Khi cấy chuyển các khối mô sẹo 3 tuần tuổi lên môi trường MS4, bên cạnh những phôi trưởng thành bình thường, còn có sự xuất hiện các phôi bất thường như đa phôi (Hình 7A), phôi dạng không có tử diệp (Hình 7B), phôi dạng 3 tử diệp (Hình 7C), phôi dạng 4 tử diệp (Hình 7D), phôi dạng tử diệp hình miệng tách (cup shape) (Hình 7E)...

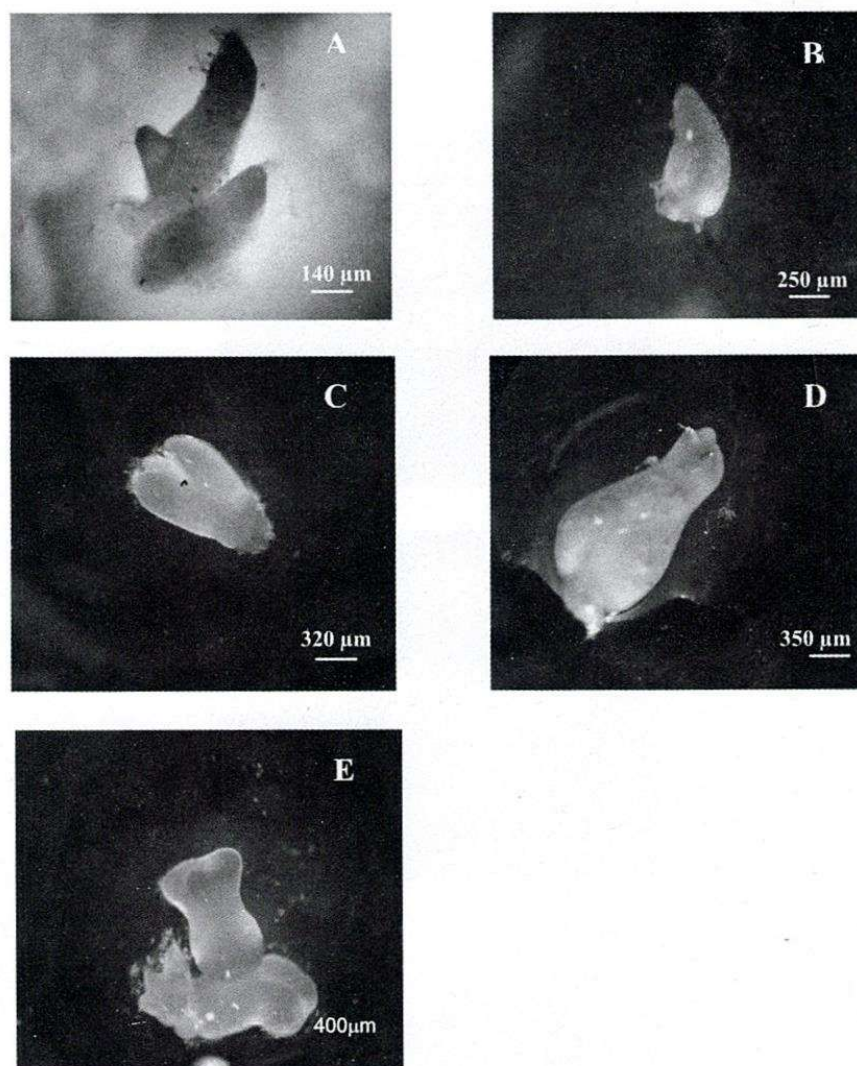
Các phôi bất thường thu được chiếm khoảng 34,3% trên tổng số phôi thu nhận (so sánh với 13,9% ở các khối mô sẹo 1 tuần tuổi và 27,3% ở các khối mô sẹo 2 tuần tuổi) (Bảng 5). Các phôi thể hệ có hình thái bất thường, không có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Như vậy có lẽ, sự nuôi cấy kéo dài khối mô sẹo trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo là nguyên nhân dẫn đến sự bất thường trong quá trình phát sinh phôi [2, 4].



Hình 5. Các giai đoạn phát triển của phôi từ mô sẹo trên MS+ NAA 0,5 mg/l, kinetin 1 mg/l. A. Phôi dạng hình cầu (mũi tên) B. Phôi dạng hình tim sớm; C. phôi dạng hình tim muộn; D. phôi dạng hình thùy lõi; E. phôi dạng trưởng thành (mũi tên).



Hình 6. Các dạng hình thái phát sinh từ mô sẹo. (A) Mô sẹo tạo phôi sau 12 ngày, (B) Phôi trưởng thành sau 20 ngày, (C) Cây con nảy mầm từ phôi thể hệ sau 30 ngày



Hình 7. Các dạng hình thái bất thường ở phôi thể hệ trên MS+ NAA 0,5 mg/l, kinetin 1 mg/l. A. Dạng đa phôi; B. Dạng không có tử diệp (bicpen shape); C. Dạng phôi trưởng thành có 3 tử diệp; D. Dạng phôi trưởng thành có 4 tử diệp; E. Dạng phôi trưởng thành có tử diệp hình tách (cup shape)

Bảng 5. Số lượng phôi thể hệ bình thường và phôi thể hệ bất thường thu nhận được từ các khối mô sẹo có độ tuổi 1, 2 và 3 tuần trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l, kinetin 1 mg/l

Tuổi khối mô sẹo khi cấy chuyển	1 tuần tuổi	2 tuần tuổi	3 tuần tuổi
Số phôi bình thường/ tử diệp	122,3 ^a ±6,9	118,3 ^a ±9,9	143,0 ^a ±7,8
Số phôi bất thường/ tử diệp	17 ^b ±3,6	32,3 ^c ±3,8	49,0 ^d ±4,0
% số phôi bất thường	13,9%	27,3%	34,3%

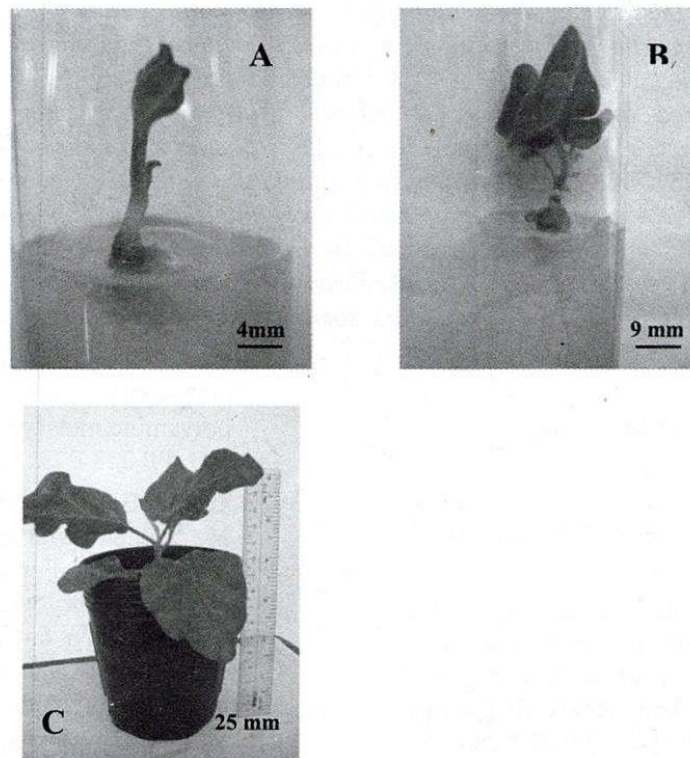
Các chữ đi kèm theo sau các số khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở $p \leq 0,05$.

3.3. Tái sinh cây từ phôi thể hệ

Phôi thể hệ phát sinh từ mô sẹo, sau 4 tuần, tái sinh thành cây hoàn chỉnh, xuất hiện hai lá

đầu tiên và rễ sơ khởi kéo dài (Hình 8A). Sau 6 tuần nuôi cấy, cây con cao từ 5 - 7 cm có từ 2 - 5 lá (Hình 8B), cây con được chuyển vào môi trường thuần hoá. Đối với các phôi trưởng thành có cấu trúc bình thường, tỉ lệ tái sinh thành cây đạt $90\pm 2\%$. Những cây này chuyển ra bầu đất

đạt tỉ lệ sống $95\pm 5\%$ (Hình 8C). Đối với những phôi trưởng thành bất thường về hình thái (không có từ diệp, ba từ diệp, bốn từ diệp, từ diệp hình tách...) không có khả năng nảy mầm thành cây.



Hình 8. Cây cà tím nảy mầm từ phôi thể hệ trên MS bổ sung NAA 0,5 mg/l, kinetin 1 mg/l. (A) Cây con 30 ngày tuổi nảy mầm từ phôi thể hệ. (B) Cây con 6 tuần tuổi. (C) Cây con 70 ngày tuổi trên chậu đất

4. KẾT LUẬN

Sự cảm ứng tạo mô sẹo từ các tế bào nhu mô gần bó mạch ở gân chính của từ diệp cà tím đạt hiệu quả cao trên môi trường MS bổ sung NAA 2 mg/l, kinetin 0,2 mg/l.

Trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l, kinetin 1 mg/l, sự phát sinh phôi thể hệ đã xảy ra. Sau 1 tuần tạo phôi dạng hình cầu. Sau

10 ngày phôi dạng hình tim xuất hiện. Sau 15 ngày phát triển thành phôi trưởng thành với từ diệp hoàn chỉnh.

Ethylen ngoại sinh được giải phóng ra từ ethephon với nồng độ 1 mg/l và 3 mg/l đã ức chế sự phát sinh phôi thể hệ.

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON SOMATIC EMBRYOGENESIS OF EGGPLANT (*SOLANUM MELONGENA* L.)

Trinh Ngoc Nam, Nguyen Du Sanh

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: On the MS medium containing only 2,4-D, callus induction was inhibited. Moreover, these calli were friable and turned brown after two weeks of culture. The three-week old calli were then transferred to the MS medium containing NAA 0.5 mg/l and kinetin 1 mg/l. The somatic embryos with globular shape appeared after 10 days of culture, while the heart_shape, torpedo_shape and cotyledonary_shape embryos appeared successively after 15 days of culture. The abnormal embryos occupied at a rate of 34.3% and rarely germinated to plantlets. On the MS medium without plant growth regulators or only with NAA, somatic embryos could not be induced. On MS medium supplemented with ethephon 3 mg/l somatic embryogenesis from calli was inhibited. Plantlets derived from the eggplant somatic embryos had a survival rate up to 95% when transferred to the pots.

Key words: callus, plant growth regulators, somatic embryos, regeneration

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. FAO, 1999. FAO, 1999. <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>.
- [2]. Juliana A. F., Maria L. C. V., Isaias O. G., Beatriz A. G., 2002. Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. Brazilian archive of Biology and Technology. Vol 45, PP: 277-286.
- [3]. Kumar P. P., Lakshamanan and Thorpe T. A., 1998. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In vitro cellular and developmental Biology-Plant*. Vol 34, PP 94-103.
- [4]. Meiza Z.I.V., 2000. Developmental and Structural patterns of in vitro plants. Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. PP: 235-254.
- [5]. Murashige T, Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. Vol 15, PP 473-497
- [6]. Roustan J.P., Latché A., Fallot J., 1994. Role of ethylene on induction and expression of carrot somatic embryogenesis: relationship with polyamine metabolism. *Plant Science*. Vol 103, PP 223-229.
- [7]. Tarres E., Magioli C., Margis-Pinheiro M., Sachetto-Martins G., Mansur Lygia E. M., Santiago-Fernandes, 2004. In-vitro somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Revista Brasil Botany*. Vol 27, PP 70-84.
- [8]. Tisserat B. and Murashige T., 1977. Effect ethephon, ethylen and 2,4-D on asexual embryogenesis *in vitro*. *Plant physiology*. Vol 60, PP 437-439.
- [9]. West M.A.L. and Harada J.J., 1993. Embryogenesis in higher plant: An overview. *Plant cell*. Vol 5, PP 1361 - 1369