

HIỆU QUẢ CỦA CÁC CHẤT ĐIỀU HOÀ SINH TRƯỞNG BA, NAA VÀ IBA TRÊN SỰ TẠO CHỒI VÀ RỄ CÂY MAI VÀNG (*OCHNA INTEGRIRIMA* (LOUR.) MERR.) *IN VITRO*

Lâm Ngọc Phương¹ và Mai Vũ Duy¹

ABSTRACT

The aim of this research was investigated the optimum concentrations of plant growth regulators (BA, NAA, IBA) for shoot establishment, shoot multiplication and rooting of *Ochna integerrima* in vitro. The results showed that a) initial stage, the sterilized shoot tip or nodal explants were cultured on the MS medium supplemented with BA (4 mg/l) gave the optimum of shoot formation; b) rooting stage on 1/2 MS medium supplemented with NAA (6 mg/l) formed more and normal roots.

Keywords: Shoot multiplication, rooting, *Ochna integerrima* (Lour.) Merr., BA, NAA, IBA

Title: Effects of plant growth regulators (BA, NAA and IBA) on shoot formation and rooting of *Ochna integerrima* (Lour.) Merr.) in vitro

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu tìm ra nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng (BA, NAA, IBA) thích hợp cho sự tạo chồi, nhân chồi và tạo rễ cây mai vàng. Kết quả cho thấy: a) Giai đoạn tạo chồi với môi trường MS bổ sung BA (4 mg/l) ở mẫu cấy ngọn hay thân đều cho kết quả số chồi cao nhất; b) Giai đoạn tạo rễ trên môi trường 1/2 MS bổ sung NAA (6 mg/l) cho rễ hình thành nhiều và phát triển bình thường.

Từ khóa: nhân chồi, tạo rễ, mai vàng, BA, NAA, IBA

1 MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam, cây mai vàng (*Ochna integerrima* (Lour.) Merr.) là một loại cây có hoa đặc trưng từ Huế trở vào Nam. Ở những vùng chuyên trồng mai như Chợ Lách (Bến Tre), Thủ Đức (TP. Hồ Chí Minh), Bình Định... việc kinh doanh mai Tết đem lại nguồn thu nhập khá cho các nhà vườn. Việc nhân giống mai có thể thực hiện bằng các phương pháp truyền thống như nhân giống hữu tính, gieo hạt hay nhân giống vô tính bằng cách giâm, chiết hoặc ghép cành,... Tuy nhiên, hiện nay nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô đã được ứng dụng rộng rãi, và trở thành một công cụ chủ yếu trên thế giới; nhằm cung cấp một lượng lớn cây giống đồng đều trong một thời gian ngắn (Lê Trần Bình *et al.*, 1997). Ma *et al.* (2010), cho thấy có thể nhân giống thành công cây mai vàng với các mẫu cấy từ lá và đoạn thân *in vitro* có nguồn gốc từ hạt bằng phương pháp nuôi cấy mô, với số lượng lớn nhằm bảo vệ loại cây được xem là quý hiếm và có nguy cơ tuyệt chủng này ở Trung Quốc.

Đề tài “Hiệu quả của các chất điều hoà sinh trưởng BA, NAA và IBA trên sự tạo chồi và tạo rễ cây mai vàng (*Ochna integerrima* (Lour.) Merr.) *in vitro*” được thực hiện với mục tiêu tìm nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng (BA, NAA, IBA) thích hợp cho sự nhân chồi, tạo rễ mai vàng *in vitro*, góp phần xây dựng quy trình

¹ Khoa Nông nghiệp & SHUD, Trường Đại học Cần Thơ

nhân giống cây mai vàng bằng phương pháp nuôi cấy mô; phục vụ nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong lai tạo giống.

2 PHƯƠNG TIỆN - PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

Vật liệu

Chồi mai vàng sinh trưởng tốt, 4 tuần tuổi, không sâu bệnh được trồng để lấy mẫu tại nhà lưới thuộc Bộ môn Sinh lý - Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp và SHUD, Trường Đại học Cần Thơ.

Thiết bị thí nghiệm

Các trang thiết bị của phòng nuôi cấy mô thực vật, bộ môn Sinh lý-Sinh hoá được sử dụng trong thí nghiệm gồm tủ cấy vô trùng, tủ sấy, nồi thanh trùng (autoclave), máy đo pH, cân điện tử, tủ lạnh; các dụng cụ thủy tinh như bình tam giác, ống nghiệm, ống đong, keo,...

Chuẩn bị môi trường

Khoáng đa lượng, vi lượng theo công thức MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung thiamin, pyridoxin, acid nicotinic với nồng độ 1 mg/l, myo-inositol (100 mg/l), nước dừa (100 ml/l), thạch (7 g/l), đường (20-30 g/l). Trong đó Fe-NaEDTA được thay thế bằng 100 mg/l Fe-EDDHA. Tùy theo các thí nghiệm có bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng thực vật. Môi trường được điều chỉnh pH đến 5,8. Thể tích môi trường được rót vào ống nghiệm và keo tương ứng là 12 ml và 40 ml và được thanh trùng ở nhiệt độ 121⁰C, áp suất 1 atm. trong 20 phút.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Khử trùng bề mặt mẫu cây

Các chồi non được cắt từ cây mẹ ở nhà lưới đem vào phòng thí nghiệm để khử trùng. Cắt bỏ lá và ngâm chúng trong xà phòng 5 phút, rửa sạch dưới vòi nước chảy, sau đó đem vào tủ cấy, rửa nhanh bằng cồn 70⁰ trong 5 giây; sau đó, ngâm trong dung dịch HgCl₂ 0,1% (12 phút) và HgCl₂ 0,1% (10 phút); sau cùng rửa sạch 3-4 lần bằng nước cất vô trùng.

2.2.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Hiệu quả của BA và loại mẫu cây trên sự tạo chồi mai vàng

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số 2 nhân tố. Nhân tố 1, 3 nồng độ BA (0, 2 và 4 mg/l) và nhân tố 2, hai loại mẫu cây (thân và ngọn). Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức, 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 3 ống nghiệm, mỗi ống nghiệm cấy một mẫu. Mẫu cây gồm những chồi ngọn có chiều cao từ 1,5-2 cm và đoạn thân với 2-3 mắt lá được cấy vào môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường saccharose và BA với các nồng độ khác nhau.

Thí nghiệm 2: Hiệu quả của NAA và IBA trên sự tạo rễ của chồi mai vàng in vitro

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số 2 nhân tố gồm 3 nồng độ NAA (2; 4 và 6 mg/l) và 3 nồng độ IBA (4; 8 và 10 mg/l). Thí nghiệm gồm 9 nghiệm thức, 6 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo, mỗi keo cấy 4 mẫu.

Mẫu cấy gồm những chồi có chiều cao 1,2-1,5 cm, 3-5 lá, cấy sang môi trường 1/2 MS bổ sung 20 g/l đường glucose và NAA kết hợp IBA với các nồng độ khác nhau.

2.2.3 Các chỉ tiêu theo dõi

Số chồi trên mẫu, chiều cao chồi gia tăng (cm), tỷ lệ tạo rễ (%), số rễ, chiều dài rễ (cm). Thời gian lấy chỉ tiêu: 8 tuần sau khi cấy.

2.3 Xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê MSTATC. Phân tích phương sai (ANOVA), so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5% hoặc 1%.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**3.1 Hiệu quả của BA và loại mẫu cấy trên sự tạo chồi mai vàng****3.1.1 Số chồi được tạo thành**

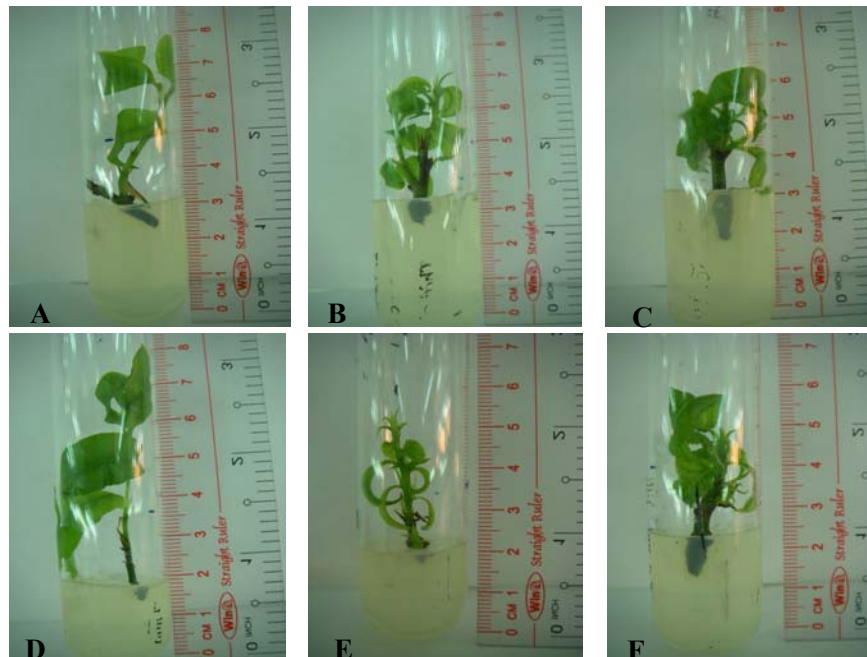
Ở thời điểm 8 TSKC cho ta thấy, nhân tố mẫu cấy không ảnh hưởng đến số chồi tạo thành. Nồng độ BA ảnh hưởng đến số chồi được tạo thành khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%. Bảng 1 và cho thấy, ở môi trường có nồng độ BA 4 mg/l cho số chồi tạo thành cao nhất là 2,2 chồi, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với môi trường không có BA, cho số chồi thấp nhất là 1,0 chồi, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nồng độ BA 2 mg/l có 1,4 chồi (Hình 1). Không có sự tương tác giữa nồng độ BA và mẫu cấy đến số chồi được tạo thành ở các nghiệm thức.

Như vậy, kết quả thí nghiệm sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy sử dụng BA 4 mg/l có hiệu quả kích thích sự tạo chồi ở cây mai vàng. Điều này cho thấy việc sử dụng BA là loại cytokinin có hiệu quả cao trong sự tạo chồi. Theo Nguyễn Đức Lượng và Lê Thủy Tiên (2002), khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chồi thì cytokinin sẽ phá vỡ trạng thái hưu miên của chồi ngọn và kích thích sự hoạt động của chồi bên. Nhiều kết quả nghiên cứu tương tự như Purohit and Kukda (2006), trong giai đoạn tạo chồi từ đoạn thân cây lòng mức nhuộm (*Wrightia tinctoria*), môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA đạt hiệu quả cao. Để tạo chồi từ chồi ngọn ở giống hoa gạo rừng (*Bombax ceiba* L), Chand and Singh (1999) đã bổ sung 2 mg/l BA vào môi trường nuôi cấy MS. Trên giống hoa hồng (*Rosa hybrida* L. cv. Rafaela) Azadi *et al.* (2007) đã sử dụng môi trường MS bổ sung 8 mg/l BA để tạo với số chồi cao nhất là 4,7 chồi.

Bảng 1: Số chồi được tạo thành trong môi trường có nồng độ BA và mẫu cây khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy

| Nồng độ BA (mg/l) | Mẫu cây | | Trung bình |
|-----------------------|---------|------|------------|
| | Ngọn | Thân | |
| 0 | 0,9 | 1,0 | 1,0 b |
| 2 | 1,7 | 1,2 | 1,4 ab |
| 4 | 2,3 | 2,1 | 2,2 a |
| Trung bình | 1,6 | 1,4 | |
| F (mẫu cây) | | | ns |
| F (nồng độ) | | | ** |
| F (mẫu cây x nồng độ) | | | ns |
| CV (%) | | | 31,6 |

Ghi chú: Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD; ns: không khác biệt thống kê; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%.



Hình 1: Chồi mai vàng trong môi trường nuôi cấy sau 8 tuần A: không có BA (Thân), B: BA 2 mg/l (Thân), C: BA 4 mg/l (Thân), D: Đối chứng với BA 0 mg/l (Ngọn), E: BA 2 mg/l (Ngọn), F: 4 mg/l BA (Ngọn)

3.1.2 Chiều cao chồi gia tăng

Ở thời điểm 8 TSKC, Bảng 2 cho thấy nhân tố mẫu cây không ảnh hưởng đến chiều cao chồi, không có tương tác giữa nồng độ BA và mẫu cây trên chiều cao chồi gia tăng. Nồng độ BA ảnh hưởng đến chiều cao chồi gia tăng ở mức ý nghĩa 1%. Môi trường không có BA cho chiều cao chồi gia tăng cao nhất là 4,3 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% so với môi trường có BA nồng độ 4 mg/l, cho chiều cao chồi gia tăng thấp nhất là 2,0 cm, nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với BA 2 mg/l (2,9 cm).

Kết quả này cho thấy, chiều cao của các chồi có sự gia tăng theo thời gian ở các nồng độ. Ở môi trường không có BA cho sự phát triển chiều cao chồi cao nhất so

với môi trường có BA 4 mg/l cho sự phát triển chiều cao chồi thấp hơn, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Theo George (1993), khi sử dụng cytokinin ở nồng độ cao để kích thích tạo chồi bên có thể làm cản trở sự gia tăng chiều cao của chồi.

Bảng 2: Chiều cao gia tăng (cm) của chồi mai vàng trong môi trường có các nồng độ BA khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy

| Nồng độ BA (mg/l) | Mẫu cây | | Trung bình |
|-----------------------|---------|------|------------|
| | Ngọn | Thân | |
| 0 | 4,6 | 4,1 | 4,3 a |
| 2 | 3,5 | 2,3 | 2,9 ab |
| 4 | 2,1 | 2 | 2,0 b |
| Trung bình | 3,4 | 2,8 | |
| F (mẫu cây) | | ns | |
| F (nồng độ) | | ** | |
| F (mẫu cây x nồng độ) | | ns | |

Ghi chú: Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD; ns: không khác biệt thống kê; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%.

Tóm lại, kết quả thí nghiệm vào 8 TSKC cho thấy nồng độ BA 4 mg/l cho kết quả tốt với số chồi được tạo thành là 2,2 chồi, nhưng ức chế sự phát triển chiều cao chồi cho chiều cao chồi gia tăng thấp nhất là 2 cm. Như vậy, việc sử dụng BA 4 mg/l để tạo chồi là thích hợp ở mẫu ngọn hay đoạn thân.

3.2 Hiệu quả của nồng độ NAA với IBA trên sự tạo rễ của chồi mai vàng

3.2.1 Tỷ lệ tạo rễ

Kết quả ở bảng 3 cho ta thấy, nồng độ IBA không ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo rễ chồi mai vàng. Nồng độ NAA ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo rễ, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%, ở nồng độ NAA 6 mg/l cho tỷ lệ tạo rễ cao nhất là 37,5%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nồng độ NAA 2 mg/l cho tỷ lệ tạo rễ thấp nhất là 16,7%, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nồng độ NAA 4 mg/l là 25,0%) (Hình 2). Theo Farooq *et al.* (2008), auxin có vai trò trong việc tạo rễ ở môi trường tạo rễ *in vitro*, thông qua ảnh hưởng của nó đến sự phân chia tế bào và hình thành rễ đầu tiên. Thí nghiệm tương tự ở loài hoa giấy, khi sử dụng NAA 5 mg/l cho tỉ lệ tạo rễ là 67,5%. Đây là kết quả tốt nhất trong giai đoạn tạo rễ (Javed *et al.*, 1996). Không có sự tương tác giữa nồng độ NAA và IBA đến tỷ lệ tạo rễ.

Bảng 3: Tỷ lệ tạo rễ (%) của chồi mai vàng trong môi trường có các nồng độ NAA và IBA khác nhau ở 8 tuần sau khi cấy

| Nồng độ NAA (mg/l) | Nồng độ IBA (mg/l) | | | Trung bình (NAA) |
|--------------------|--------------------|------|------|------------------|
| | 4 | 8 | 10 | |
| 2 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 b |
| 4 | 20,8 | 12,5 | 41,7 | 25,0 ab |
| 6 | 29,2 | 41,7 | 41,7 | 37,5 a |
| Trung bình (IBA) | 22,2 | 23,6 | 33,3 | |
| F (IBA) | | | ns | |
| F (NAA) | | | * | |
| F (IBA x NAA) | | | ns | |

Ghi chú: Các số liệu đã được chuyển sang arcsin√x trước khi phân tích thống kê. Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD; ns: không khác biệt có ý nghĩa thống kê.; *: khác biệt có ý nghĩa 5%



Hình 2: Sự tạo rễ mai vàng ở 8 tuần sau khi cấy trong môi trường có các nồng độ NAA và IBA khác nhau (A) 2 mg/l NAA + 4 mg/l IBA; (B) 2 mg/l NAA + 8 mg/l IBA; (C) 2 mg/l NAA + 10 mg/l IBA; (D) 4 mg/l NAA + 4 mg/l IBA (E) 4 mg/l NAA + 8 mg/l IBA; (F) 4 mg/l NAA + 10 mg/l IBA; (G) 6 mg/l NAA + 4 mg/l IBA (H) 6 mg/l NAA + 8 mg/l IBA; (I) 6 mg/l NAA + 10 mg/l IBA

3.2.2 Số rễ

Ở 8 TSKC, bảng 4 cho ta thấy nồng độ IBA ảnh hưởng đến số rễ không có ý nghĩa thống kê. Nồng độ NAA ảnh hưởng đến số rễ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Ở nồng độ NAA 6 mg/l cho số rễ cao nhất (1,6 rễ), khác biệt có ý nghĩa so với nồng độ NAA 2 mg/l cho số rễ thấp nhất (0,5 rễ), nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nồng độ NAA 4 mg/l (0,6 rễ). Ở các môi trường có bổ sung nồng độ NAA, các mẫu cây có sự xuất hiện mô sẹo ở vùng mặt cắt, kích thước mô sẹo càng lớn khi nồng độ NAA càng cao. Trong thí nghiệm ra giống Ôi *in vitro*, Manoj *et al.* (2009) cho thấy, sử dụng NAA sẽ tạo mô sẹo ở vùng mặt cắt của chồi. Không có sự tương tác giữa nồng độ IBA và NAA đến tỷ lệ tạo rễ.

Bảng 4: Số rễ của chồi mai vàng trong môi trường có các nồng độ NAA và IBA khác nhau ở 8 tuần sau khi cấy

| Nồng độ NAA (mg/l) | Nồng độ IBA (mg/l) | | | Trung bình (NAA) |
|-------------------------|--------------------|-----|-----|------------------|
| | 4 | 8 | 10 | |
| 2 | 0,4 | 0,8 | 0,4 | 0,5 b |
| 4 | 0,6 | 0,2 | 1,0 | 0,6 ab |
| 6 | 1,4 | 1,6 | 1,9 | 1,6 a |
| Trung bình (IBA) | 0,8 | 0,9 | 1,0 | |
| F (IBA) | | | ns | |
| F (NAA) | | | ** | |
| F (IBA x NAA) | | | ns | |

Ghi chú: Các số liệu đã được chuyển sang $\log(x+2)$ trước khi phân tích thống kê. Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD; ns: không khác biệt có ý nghĩa thống kê; **: khác biệt có ý nghĩa 1%.

3.2.3 Chiều dài rễ

Kết quả phân tích tại thời điểm 8 TSKC, Bảng 5 cho thấy nồng độ NAA và IBA không ảnh hưởng đến chiều dài rễ. Không có sự tương tác giữa nồng độ NAA và IBA đến chiều dài rễ.

Bảng 5: Chiều dài rễ (cm) của chồi mai vàng trong môi trường có các nồng độ NAA và IBA khác nhau ở 8 tuần sau khi cấy

| Nồng độ NAA (mg/l) | Nồng độ IBA (mg/l) | | | Trung bình (NAA) |
|-------------------------|--------------------|------|------|------------------|
| | 4 | 8 | 10 | |
| 2 | 0,31 | 0,36 | 0,14 | 0,27 |
| 4 | 0,23 | 0,06 | 0,61 | 0,30 |
| 6 | 0,35 | 0,55 | 0,61 | 0,51 |
| Trung bình (IBA) | 0,29 | 0,32 | 0,46 | |
| F (IBA) | | | ns | |
| F (NAA) | | | ns | |
| F (IBA x NAA) | | | ns | |

Ghi chú: ns: không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3.2.4 Chiều cao gia tăng

Kết quả phân tích ở 8 TSKC, bảng 6 cho thấy, nồng độ IBA không ảnh hưởng đến sự gia tăng chiều cao chồi mai vàng. Nồng độ NAA có ảnh hưởng đến chiều cao chồi gia tăng, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Ở nồng độ NAA 2 mg/l cho chiều chồi gia tăng cao nhất là 0,51 cm và khác biệt có nghĩa thống kê so với 2 nồng độ NAA còn lại là 0,23-0,28 cm ở mức ý nghĩa 1%. Theo George (1993), NAA ở nồng độ cao trong môi trường tạo rễ đã gây hạn chế về sinh trưởng chiều cao, nhất là khi chồi có khuynh hướng tạo mô sẹo ở vùng mặt cắt. Không có sự tương tác giữa các nồng độ NAA và IBA đến chiều cao chồi gia tăng.

Bảng 6: Chiều cao gia tăng của chồi mai vàng (cm) trên môi trường có các nồng độ IBA và NAA khác nhau ở 8 tuần sau khi cấy

| Nồng độ NAA (mg/l) | Nồng độ IBA (mg/l) | | | Trung bình (NAA) |
|-------------------------|--------------------|------|------|------------------|
| | 4 | 8 | 10 | |
| 2 | 0,40 | 0,60 | 0,52 | 0,51 a |
| 4 | 0,20 | 0,23 | 0,26 | 0,23 b |
| 6 | 0,31 | 0,36 | 0,18 | 0,28 b |
| Trung bình (IBA) | 0,31 | 0,40 | 0,32 | |
| F (IBA) | | | ns | |
| F (NAA) | | | ** | |
| F (IBA x NAA) | | | ns | |
| CV (%) | | | 8,59 | |

Ghi chú: các số liệu đã được chuyển sang $\log(x+2)$ trước khi phân tích thống kê. Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD; ns: không khác biệt có ý nghĩa thống kê; **: khác biệt có ý nghĩa 1%.

Tóm lại, kết quả thí nghiệm sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy, nồng độ NAA 4-6 mg/l cho hiệu quả cao về tỉ lệ tạo rễ, số rễ nhưng đã gây ức chế chiều cao của chồi mai

vàng so với nồng độ NAA 2 mg/l. Ở nồng độ NAA 6 mg/l, các mẫu cây có sự xuất hiện mô sẹo to ở vùng mặt cắt.

4 KẾT LUẬN

Môi trường MS có bổ sung BA 4 mg/l với mẫu cây ngọn hay thân đều thích hợp để tạo chồi. Trong giai đoạn tạo rễ, môi trường 1/2 MS bổ sung NAA 6 mg/l thích hợp để tạo rễ *in vitro* chồi mai vàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Azadi, P.; M. Khosh-Khui; E. Beyramizadeh and H. Bagheri. 2007. Optimization of Factors Affecting *in vitro* Proliferation and Rooting of *Rosa hybrid* L. cv. "Rafaela". *Int. J. Agri. Res.*, 2 (7): 626-631.
- Chand, S. and A. K. Singh. 1999. *In vitro* propagation of *Bombax ceiba* L (Silk cotton). *Silvae genetica ISSN 0037-5349 Conden Sigeaq*, 48 (6): 313-317.
- Farooq A, B.B. Mandal, and G. Sandhya. 2008. Effect of some growth regulators on rooting of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) under *in vitro* condition. *Appl. Biol. Res.* 10: 193-201.
- George, E. F. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. Part 1. The technology. 2nd. Edition. England: Exegetic Limited.
- Javed, A.M., H. Said and N. Saima. 1996. *In vitro* propagation of *Bougainvillea spectabilis* through shoot apex culture. *Pak. J. Bot.*, 28: 207-211.
- Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nghị và Lê Thị Muội. 1997. *Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
- Ma, G.; J. Lu; J.T. Silva; X. Zhang and J. Zhao. 2010. Shoot organogenesis and somatic embryo genesis from leaf and shoot explants of *Ochna integerrima* (Lour). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104:157-162.
- Manoj K. R., S. J. Vijai and J. Uma. 2009. Shoot Multiplication and plant regeneration of Guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. Vol.17(1): 29-38.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thuý Tiên. 2002. *Công nghệ tế bào*. TP. Hồ Chí Minh: NXB Đại Học Quốc Gia.
- Purohit, S.D. and G. Kukda. 2006. Micropropagation of an adult tree-*Wrightia tinctoria*. *Indian Journal of Biotechnology*, No. 100.