

## NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY *IN - VITRO* CÂY HOA ĐÀO NHẬT TÂN (*PRUNUS PERSICAL*.)

### Study on *In - vitro* Culture of Nhat Tan Peach

Nguyễn Thị Lý Anh<sup>1</sup>, Hồ Thị Thu Thanh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Tấn Hưng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

<sup>2</sup>*Công ty Đầu tư và Phát triển nông nghiệp Hà Nội*

### TÓM TẮT

Lần đầu tiên ở Việt Nam, kỹ thuật nuôi cây mô *in - vitro* cây hoa đào Nhật Tân đã được tiến hành nghiên cứu. Các thí nghiệm bao gồm: xác định chế độ khử trùng mẫu, xác định môi trường nhân nhanh chồi và môi trường tạo cây *in - vitro* hoàn chỉnh. Các kết quả nghiên cứu cho thấy: khử trùng mẫu cấy với cồn 70% trong 5 phút và HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 5 phút rồi nuôi cấy trên môi trường MS lỏng bổ sung 1000 mg/l Cefotaxime cho tỷ lệ mẫu sống và vô trùng cao nhất, đạt 65,0% sau 14 ngày. Ở giai đoạn nhân chồi, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l TDZ (thidiazuron) và 0,1 mg/l  $\alpha$  - NAA cho hiệu quả nhân chồi khá tốt, chồi xanh khỏe. Trên môi trường MS bổ sung 3mg/l IBA (indole - 3 - butyric acid) các chồi đạt tỷ lệ ra rễ 100% sau 3 tuần nuôi cấy. Đây là những kết quả ban đầu có ý nghĩa rất lớn, làm tiền đề cho các nghiên cứu bảo tồn *in- vitro* giống đào Nhật Tân.

Từ khóa: Bảo tồn nguồn gen, đào Nhật Tân, nuôi cấy mô, *Prunus persica*.

### SUMMARY

*In - vitro* culture of Nhat Tan peach (*Prunus persica* L.) has been carried out for the first time in Vietnam. The experiments were conducted in order to study explant sterilization methods, shoot proliferation and intact plant regeneration media. The results showed that the explants sterilized with 70% alcohol for 5 min. followed by 5 minutes in HgCl<sub>2</sub> (0.1%) and then cultured on liquid MS medium supplemented with 1,000 mg cefotaxime per liter yielded highest survival and clean explants (65.0%) 14 days after culture. In propagation stage, an addition of 0.5 mg/l TDZ (thidiazuron) and 0.1 mg/l  $\alpha$  - NAA to MS medium had positive effect on shoot formation. The optimal medium for rooting of shoots was MS medium with 3 mg/l IBA, the rate of rooting was 100% after 3 weeks. These initial results could be regarded as the foundation for *in- vitro* preservation of Nhat Tan peach.

Key words: *In - vitro* culture, Nhat Tan peach, *Prunus persica*, preservation.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đào Nhật Tân là loại hoa đặc trưng cho dịp Tết Nguyên Đán ở Hà Nội nói riêng và miền Bắc nước ta nói chung. Nó có bề dày lịch sử cùng với Hà Nội ngàn năm văn hiến và được coi là một công trình văn hoá sống đang tồn tại. Năm 2006, thương hiệu hoa đào Nhật Tân đã được Cục Bản quyền tác giả Văn hóa và Nghệ thuật công nhận. Hiện nay cùng với quá trình công nghiệp hoá, hiện đại hoá đất nước, tốc độ đô thị hoá ngày càng mạnh mẽ. Nhật Tân là vùng đất ven đô Hà

Nội nên cũng không nằm ngoài vòng xoáy đó. Diện tích trồng đào nơi đây ngày càng bị thu hẹp, thay vào đó là các toà cao ốc, nhà máy, khách sạn... Làng đào Nhật Tân - làng hoa truyền thống đậm nét văn hoá đặc sắc của Hà Nội đang có nguy cơ bị mai một. Do vậy, việc bảo tồn và lưu giữ cây đào Nhật Tân có ý nghĩa rất quan trọng.

Ngoài việc bảo tồn ngoài đồng ruộng, nguồn gene cây trồng còn được bảo quản trong điều kiện nhân tạo (Lê Trần Bình và cs., 1997). Trong đó, nuôi cấy mô *in - vitro*

là một phương pháp đã được áp dụng có hiệu quả đối với nhiều loại cây như chuối, dứa, khoai sọ... (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 2005). Do đó, việc áp dụng phương pháp này là một giải pháp có ý nghĩa và hiệu quả đối với cây đào Nhật Tân. Tuy nhiên, muốn bảo quản nguồn gene *in vitro* cần phải đưa vào nuôi cấy mô và vi nhân giống thành công giống đào này.

Trên thế giới, đã có nhiều công trình nghiên cứu về nuôi cấy mô *in vitro* cây hoa đào, nhưng chủ yếu mới chỉ tiến hành đối với cây đào ăn quả. Nhiều kết quả công bố đã xác định được môi trường nhân chồi cũng như tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh (Kamali và cs., 1995). Ngoài ra, các nghiên cứu tương tự trên các loại cây khác thuộc phân họ mận như mận, mơ, táo tây... cũng được tiến hành rất nhiều và đã thu được những kết quả đáng kể (Paula và Charles, 2006). Nhưng ở Việt Nam hiện nay, ngoài các công trình nghiên cứu về kỹ thuật trồng, chăm sóc, điều khiển ra hoa cũng như lựa chọn và bảo quản hoa đào thì chưa có cơ quan nào nghiên cứu về kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cây hoa đào. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu nhằm bước đầu xác định một số khâu chính trong kỹ thuật nuôi cấy mô cây hoa đào Nhật Tân làm cơ sở cho việc bảo tồn *in vitro* giống đào này.

## 2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu sử dụng cho thí nghiệm là đỉnh chồi, mô lá, đoạn thân mang mắt ngủ của giống đào gốc Nhật Tân, có nguồn gốc từ Công ty Đầu tư và phát triển Nông nghiệp Hà Nội.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp nuôi cấy mô hiện hành, trên nền môi

trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) với 6,2 g/l agar và 30 g/l đường saccharoza, pH = 5,8 - 6,0. Các điều kiện phòng nuôi cấy: nhiệt độ  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ẩm độ 70%, cường độ chiếu sáng 2000 - 2500 lux, thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

Các hóa chất được sử dụng trong giai đoạn khử trùng mẫu bao gồm: cồn 70%, javen 4%,  $\text{HgCl}_2$  0,1%, thuốc diệt nấm khuẩn TP - ZEP - 18EC, kháng sinh cefotaxime. Các chất điều tiết sinh trưởng được sử dụng như BA (benzyl adenin), kinetin,  $\alpha$ -NAA (naphthaleneacetic acid), TDZ (thidiazurone), IBA (indole-3-butyric acid)... được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tùy từng thí nghiệm.

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi công thức 30 mẫu. Giai đoạn khử trùng mẫu cây được bố trí trong ống nghiệm, mỗi công thức 60 ống nghiệm, chia làm 3 lần nhắc lại.

Nghiên cứu tiến hành theo dõi định kỳ 2 tuần một lần các chỉ tiêu về tỉ lệ (TL) mẫu sống, tỉ lệ mẫu nhiễm, chiều cao, số lá, hệ số nhân (HSN), số rễ, chiều dài rễ...

Các số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm IRRISTAT 4.0 và Microsoft Excel. Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng nuôi cấy mô của Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.



Hình 1. Nguồn mẫu ban đầu đưa vào nuôi cấy mô

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu

Giai đoạn khử trùng mẫu có vai trò hết sức quan trọng đối với toàn bộ quá trình

nuôi cấy. Hàng loạt các thí nghiệm với các đơn chất khử trùng mẫu khác nhau được tiến hành nhưng kết quả không như mong muốn. Sau 4 tuần theo dõi, tỉ lệ mẫu sống và vô trùng mới chỉ đạt cao nhất 18,3%. Vì vậy, thí nghiệm tiếp tục tiến hành với chất kháng sinh cefotaxime. Việc bổ sung cefotaxime vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ mẫu sống và vô trùng (Bảng 1).

Ở các công thức có bổ sung kháng sinh không gây ảnh hưởng nhiều đến sức sống của mẫu cấy. Sau 4 tuần theo dõi, tỉ lệ này đạt cao nhất 65,0% ở công thức 4 với nồng độ cồn 70% trong 5 phút và HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 5 phút và 1000 mg cefotaxime/lít môi trường MS lỏng, trong khi công thức đối chứng chỉ

đạt 8,3%. Như vậy, có thể thấy kháng sinh cefotaxime có tác dụng khử trùng rất tốt, đặc biệt đối với cây thân gỗ.

### 3.2. Giai đoạn nhân chồi cây hoa đào

#### 3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA, Ki đến quá trình nhân chồi

Với việc bổ sung đơn chất BA và kinetin vào môi trường nuôi cấy, kết quả thí nghiệm cho thấy: trong 3 loại mô thì chỉ có đỉnh chồi là cảm ứng tốt hơn cả với quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên, cả hai môi trường có bổ sung đơn chất cytokinin này đều ảnh hưởng không tích cực tới mẫu cấy. Sau 4 tuần theo dõi, tỉ lệ bật chồi rất thấp, chồi có xu hướng vàng và lụi dần khi kéo dài thời gian nuôi cấy (Bảng 2 và 3).

**Bảng 1. Ảnh hưởng của kháng sinh cefotaxime và HgCl<sub>2</sub> 0,1 % đến khả năng sống và vô trùng của mẫu cấy**

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống, vô trùng (%)
CT1 (cồn (70%) 5 phút + HgCl <sub>2</sub> (0,1%) 5 phút)	60,0	31,7	8,3
CT2 (CT1 + 500 mg cefotaxime/lít môi trường MS đặc)	28,3	60,0	11,7
CT3 (CT1 + 1000 mg cefotaxime/lít môi trường MS đặc)	31,7	53,3	15,0
CT4 (CT1 + 1000 mg cefotaxime/lít môi trường MS lỏng)	6,3	28,7	65,0

**Bảng 2. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh của mẫu nuôi cấy (sau 4 tuần theo dõi)**

CT	Loại mô	TL sống (%)	TL mẫu nảy chồi (%)	Số chồi /mẫu cấy	Số lá trung bình (lá/chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái
CT1	A	100	0	1,00	4,4	1,1	+
	B	29,2	0	0	0	0	++
	C	54,2	0	0	0	0	+++
CT2	A	100	8,3	1,09	8,0	2,4	+
	B	33,3	0	0	0	0	++
	C	66,7	0	0	0	0	+++
CT3	A	100	8,3	1,04	7,6	1,4	+
	B	29,2	0	0	0	0	++
	C	66,7	0	0	0	0	+++
CT4	A	95,8	4,2	1,05	7,7	2,2	+
	B	0	0	0	0	0	++
	C	41,7	0	0	0	0	+++
CT5	A	83,3	4,2	1,00	4,8	2,3	+
	B	0	0	0	0	0	++
	C	29,2	0	0	0	0	+++
LSD <sub>0,05</sub>					0,63	0,18	
CV (%)					4,9	5,0	

A: (+) Đỉnh chồi: chồi khá mập, lá nhiều nhưng đốt thân ngắn, nồng độ BA càng cao lá càng nhỏ và xoắn lại

B: (++) Đoạn thân mang mắt ngủ: đa số mẫu chết, có màu thâm đen.

C: (+++) Mô lá: gân và mép lá hơi sùi callus màu trắng, xốp.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của Ki đến sự phát sinh hình thái mẫu cấy (sau 4 tuần theo dõi)**

CT	Loại mô	TL mẫu sống (%)	TL nảy chồi (%)	Số chồi /mẫu cấy	Số lá trung bình (lá/chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái
CT1	A	100	0	1,0	4,4	1,1	+
	B	37,5	0	0	0	0	++
CT2	A	87,5	4,2	1,04	5,2	1,5	+
	B	50,0	0	0	0	0	++
CT3	A	83,3	0	1,0	5,0	1,7	+
	B	20,8	0	0	0	0	++
CT4	A	100	0	1,0	5,5	1,2	+
	B	0	0	0	0	0	++
CT5	A	79,2	0	1,0	4,1	1,3	+
	B	0	0	0	0	0	++
LSD <sub>0,05</sub>					0,68	0,33	
CV(%)					4,2	4,9	

A (+): Định ngon: ít thay đổi so với ban đầu, lá nhỏ, mảnh, hơi lụi vàng

B (++) : Đoạn thân mang mắt ngủ: đa số chết, màu thâm đen.

Kết quả nêu trên không trùng hợp với những công bố của Fotopoulos và cộng sự (2005) khi tiến hành thí nghiệm trên cây đào PR 204/84 (*P.persica* × *P.amygdalus*) cũng như công bố của Morini và Concetti trên giống đào P.S.B2. Đối với giống đào PR 204/84 trên môi trường MS bổ sung BA nồng độ 2 - 4 µM cho hiệu quả nhân chồi cao nhất, còn với giống đào P.S.B2 thì trên môi trường WPM + 1,2 mg/l BA cho tỷ lệ chồi tăng gấp 3,5 lần so với trên môi trường MS. Như vậy, có thể nói cây hoa đào Nhật Tân có phản ứng rất khác đối với BA do kiểu gen của nó hoàn toàn khác so với cây đào PR 204/84 (*P.persica* × *P. amygdalus*) và giống đào P.S.B2.

### 3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của thidiazurone đến quá trình nhân chồi

Thidiazurone (TDZ) được xem là cytokinin có tác động rất hiệu quả đến việc nhân chồi của nhiều loại cây, đặc biệt là cây thân gỗ. Một nghiên cứu đã chỉ ra rằng, nồng độ TDZ 0,15 - 0,35 mg/l thích hợp hơn cả cho

sự nhân chồi cây cà phê Arabica (Jesus và cs., 2004). Đối với cây hoa đào Nhật Tân, ảnh hưởng của TDZ đến quá trình nhân chồi như thế nào được thể hiện qua bảng 4.

Sau 4 tuần nuôi cấy, TDZ có tác động rất rõ rệt đến quá trình nhân chồi. Trong đó, nổi bật là CT2 (nồng độ TDZ là 0,5 mg/l) cho tỉ lệ mẫu bật chồi cao hơn cả, đạt 16,7% đồng thời chất lượng chồi cũng khá tốt, chồi xanh mập (Bảng 4). Tuy nhiên, tất cả các công thức có bổ sung TDZ đều xuất hiện callus ở gốc chồi, nồng độ TDZ càng cao, callus càng nhiều làm ảnh hưởng đến sức sống của mẫu cấy.

### 3.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp TDZ và -NAA đến quá trình nhân chồi

Sự phát sinh và phát triển của chồi chịu tác động cân bằng của các chất điều tiết sinh trưởng auxin và cytokinin (Hoàng Minh Tấn và Nguyễn Quang Thạch, 2000). Thí nghiệm với tổ hợp TDZ và α-NAA được tiến hành để cải thiện hệ số nhân và chất lượng chồi tái sinh (Bảng 5).

**Bảng 4. Ảnh hưởng của TDZ đến quá trình nhân chồi (sau 4 tuần nuôi cấy)**

Công thức	Nồng độ TDZ (mg/l)	TL sống (%)	TL nảy chồi (%)	HSN (chồi/mẫu)	Số lá trung bình (lá/chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái
CT1	0	100	0	1,00	4,5	1,1	+
CT2	0,5	100	16,7	1,13	6,2	2,8	+++
CT3	1,5	91,7	4,2	1,04	5,6	1,8	++
CT4	2,5	50,0	0	1,06	6,4	1,5	++
CT5	3,5	83,3	8,3	1,00	5,1	2,1	++
LSD <sub>0,05</sub>				0,12	0,37	0,37	
CV (%)				4,9	5,0	4,1	

+: Chồi sinh trưởng chậm, lá xanh đậm, mảnh, gốc chồi không sùi callus, một số vàng úa.

++: Chồi xanh, mập, lá nhiều, hơi xoắn, lá phát triển theo chiều ngang, gốc chồi sùi callus mạnh, một số chồi có biểu hiện thủy tinh hóa.

+++ : Chồi mập, lá xanh, dày, sùi callus mạnh ở gốc chồi.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của tổ hợp TDZ và  $\alpha$ -NAA đến quá trình nhân chồi (sau 4 tuần theo dõi)**

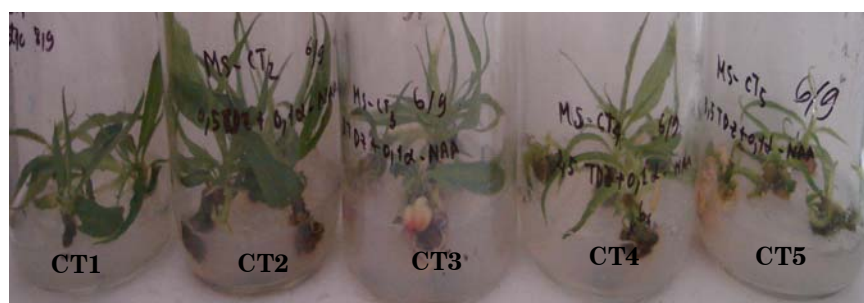
Công thức	Nồng độ TDZ + $\alpha$ -NAA (mg/l)	TL sống (%)	TL nảy chồi (%)	HSN (chồi/mẫu)	Số lá trung bình (lá/chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái
CT1	0	100	0	1,0	4,4	2,8	+
CT2	0,5 + 0,1	100	16,7	1,17	8,4	5,7	+++
CT3	1,5 + 0,1	100	4,2	1,04	7,5	5,3	++
CT4	2,5 + 0,1	100	0	1,0	8,3	4,0	++
CT5	3,5 + 0,1	95,8	8,3	1,09	6,5	3,7	++
LSD <sub>0,05</sub>				0,90	0,61	0,21	
CV (%)				4,5	4,6	2,6	

+: Chồi sinh trưởng chậm, lá xanh đậm, mảnh, gốc chồi không sùi callus, một số vàng úa.

++: Chồi xanh, mập, lá nhiều, hơi xoắn, lá phát triển theo chiều ngang, gốc chồi sùi callus mạnh.

Nồng độ TDZ càng cao chồi càng biểu hiện lục vàng và rụng lá.

+++ : Chồi mập, lá xanh, to, dày, đốt chồi dài, sùi callus mạnh ở gốc chồi.



**Hình 2. Ảnh hưởng của TDZ và  $\alpha$ -NAA đến quá trình nhân chồi cây hoa đào**

Chúng tôi nhận thấy sự tổ hợp giữa hai loại chất điều tiết sinh trưởng này tỏ ra có hiệu quả rất tốt. Ở tất cả các công thức thí nghiệm, tỷ lệ sống đều là 100%, trừ công thức 5 (95,8 %), đã có sự sản sinh chồi mới ở hầu hết các công thức. Trong đó hệ số nhân cũng như sự sinh trưởng của chồi đạt cao nhất ở công thức 2. Đặc biệt, trong thí nghiệm này có sự thay đổi rất đáng kể về mặt hình thái mẫu cấy, chồi xanh mập, đốt chồi dài. Điều này có thể do TDZ ở nồng độ thấp (0,5 mg/l) kết hợp với  $\alpha$  - NAA (0,1 mg/l) đã dẫn đến sự cân bằng về chất điều tiết sinh trưởng nội sinh và ngoại sinh, chúng có tác dụng kích thích tế bào dẫn mạnh hơn, đặc biệt là lá và đốt chồi.

### 3.3. Nghiên cứu môi trường tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Auxin là chất điều tiết ra rễ rất có hiệu quả đối với nhiều loại cây. Tuy nhiên, với mỗi loại cây thì loại và nồng độ các auxin là khác nhau. Ở đây, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm với  $\alpha$ -NAA và IBA bổ sung riêng rẽ với lượng tương tự nhau làm chất điều tiết quá trình ra rễ của chồi cây hoa đào. Tuy nhiên, kết quả lại hoàn toàn trái ngược nhau. Trên các công thức bổ sung IBA, rễ xuất hiện mặc dù sự xuất hiện không đồng thời, trong

khi trên công thức bổ sung  $\alpha$ -NAA chồi vàng và rụng lá rất nhanh, rễ không xuất hiện.

Số liệu ở bảng 6 cho thấy, nồng độ 3 mg/l IBA cho kết quả ra rễ tốt nhất, rễ xuất hiện sớm, chất lượng rễ cũng rất tốt. Sau 4 tuần theo dõi, có 83,3% chồi ra rễ, chiều dài rễ trung bình ở công thức này đạt 8,9 cm, đồng thời hình thái chồi cũng khá đẹp, chồi xanh, mập, đốt chồi dài...



Hình 3. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của chồi

Bảng 6. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của chồi (sau 4 tuần theo dõi)

Công thức	Nồng độ IBA (mg/l)	TL sống (%)	TL ra rễ (%)	Số rễ /chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá TB (lá/chồi)	Hình thái rễ
CT0	0	100	0	0	0	1,1	4,5	
CT1	1	100	12,5	4,7	4,8	3,2	6,3	+
CT2	2	95,8	20,8	4,3	6,4	2,9	6,8	++
CT3	3	100	83,3	5,3	8,9	6,8	8,5	+++
CT4	4	95,8	16,7	4,8	7,3	2,7	7,3	++
CT5	5	91,7	12,5	4,7	5,1	2,8	5,8	+
LSD <sub>0,05</sub>				0,73	0,26	0,28	0,54	
CV(%)				4,9	2,6	4,8	4,6	

+ : Rễ ngắn, mập.

++ : Rễ dài, mảnh, có rễ con.

+++ : Rễ rất dài, mập, nhiều rễ con.

#### 4. KẾT LUẬN

- Chế độ khử trùng mẫu cấy tối ưu cho cây hoa đào được xác định: cồn 70% trong 5 phút + HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 5 phút + cefotaxime 1000 mg/l trong môi trường MS lỏng. Công thức này cho tỷ lệ mẫu sống và vô trùng đạt 65,0% sau 4 tuần theo dõi.

- Công thức tốt nhất cho nhân nhanh chồi là MS + 0,5 ppm TDZ + 0,1 ppm  $\alpha$ -NAA. Công thức này cho HSN chồi là 1,17, chất lượng chồi rất tốt, chồi xanh, mập, lá nhiều, lá to và dày, đốt chồi dài.

- Môi trường tạo cây *in-vitro* hoàn chỉnh là MS + 3 mg/l IBA. Trên môi trường này, sau 4 tuần nuôi cấy chồi có trung bình 5,3 rễ, rễ dài và mập (8,9 cm), chất lượng chồi rất ổn định, chồi xanh và cao.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhị, Lê Thị Muội (1997). Công nghệ sinh học trong công tác cải tiến giống cây trồng. NXB. Nông nghiệp, tr. 154 - 163.

Fotopoulos, S. và Sotiropoulos, T.E., (2005). In vitro rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica*  $\times$  *Prunus amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. *Agronomy Research* 3(1), pp: 3 - 8.

Jesus, A. M. S., Carvalho, S. P. de, Pasqual, M., Carvalho, M., Dutra, L. F. (2004). Effect of BAP concentrations in pre-culture medium and BAP and TDZ in sub-culture medium on coffee micropropagation, <http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=20046798676>.

Kamali, K., Majidi E. and Zarghami R. (1995). Micropropagation of GF-677 rootstocks (*Prunus amygdalus*  $\times$  *P. persica*), <http://resources.ciheam.org/om/pdf/c56/01600172>.

Morini, S., Concetti, S. *In-vitro* propagation of P.S.B2 peach rootstock, [http://www.actahort.org/books/173/173\\_23.htm](http://www.actahort.org/books/173/173_23.htm).

Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.

Paula M. Pijut and Charles H. Michler (2006). Adventitious Shoot Regeneration and rooting of *Prunus serotina* *In-vitro* Cultures. *HortScience* 41 (1), pp: 193- 201.

Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch (2000), Sinh lý thực vật. NXB. Nông nghiệp.

Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Trung tâm Tài nguyên Thực vật (2005). Kết quả bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật giai đoạn 2001-2005, định hướng 2006-2010, [http://www.vaas.org.vn/index.php?option=com\\_content&task=view&id=207&Itemid=77&limit=1&limitstart=2](http://www.vaas.org.vn/index.php?option=com_content&task=view&id=207&Itemid=77&limit=1&limitstart=2).