

KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU NHÂN GIỐNG CÂY BẮNG (*Ficus callosa* WILLD) LÀM RAU ĐẶC SẢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO

Phạm Thị Kim Hạnh, Nguyễn Thị Tuyết, Nguyễn Hoài Thu,
Nguyễn Thị Mỹ Châu, Hoàng Đình Phi, Nguyễn Thị Ngọc Huệ
Trung tâm Tài nguyên Thực vật

TÓM TẮT

Cây Bắng (*Ficus callosa* Willd) là cây bản địa, thân gỗ lưu niên, có ngọn lá non được sử dụng làm rau đặc sản. Ở Việt Nam nhân giống cây Bắng chủ yếu bằng chiết cành nên chậm, hệ số nhân giống thấp. Vì vậy, ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào để nhân giống cây Bắng là rất cần thiết. Mẫu đưa vào nuôi cấy *in vitro* là cành bánh tẻ, thời điểm lấy mẫu vào tháng 5-6. Kết quả bước đầu nhân giống *in vitro* cây Bắng cho thấy: Mẫu được khử trùng bằng cách tráng cồn 70 - 10% H₂O₂ trong 5 phút - tráng 3 lần nước cất - 0,1% HgCl₂ trong 5 phút, tỉ lệ mẫu sống chỉ đạt 15%. Chồi được bóc tách bỏ lá kèm bỏ bên ngoài trước khi chuyển sang môi trường nhân chồi. Hệ số nhân chồi đạt 1,8 lần khi cấy chồi trên môi trường 2/3MS + 0,5mg/IBAP + 0,5mg/l K, chồi mới màu xanh nhạt, mép lá hình răng cưa. Cây tạo rễ đạt 59% hoặc 55% trên môi trường bổ sung IBA 0,3mg/l hoặc than hoạt tính 1,5g/l. Sau 2 tháng cây hoàn chỉnh được đưa ra bầu ngoài vườn ươm.

Từ khóa: Cây
Bắng, nuôi cấy mô
tế bào, MS, TDZ,
IBA, BAP, K.

Primary results of tissue culture propagation of *Ficus callosa* Willd supporting deployment of species vegetable

Ficus callosa Willd is a native woody plant. It's tip and leaflets are used as special vegetable. Up to now, propagation of Bang was only done by air-laying method with low multiplication rate and affected to mother plants. In this study, cells tissue culture methods were applied to propagate the *Ficus callosa*. The branches were taken in May - June for *in vitro* culture. They were firstly sterilized by 70° alcohol and then 10% H₂O₂ for 5 minutes with 3 times and finally by 0,1% HgCl₂ for 5 minutes. The result was achieved by 15% survivor samples.

Key words:
Ficus callosa
Willd., *in vitro*,
MS, TDZ, IBA,
BAP, K,
propagation

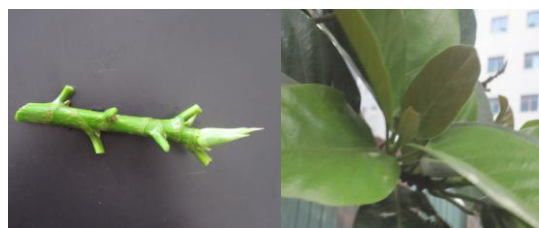
Hard outer leaflets were removed before culturing into the multiplicative medium. Shoot multiplication rate was 1.8 times when buds culture on the medium 2/3MS + 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l K, light green new buds, leaf edges with pinking. Rooting rate was 59% and 55% on medium 2/3MS supplement with IBA 0.3 mg/l or charcoal 1.5 g/l, respectively. After 2 months, *invitro* plantlets were transplanted in to normal plastic pots in the nursery.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Báng (*Ficus callosa* Willd) còn có tên gọi là Gừa hoặc Da chai, thuộc chi Sung (*Ficus*), họ Dâu tằm (*Moraecae*) có nguồn gốc ở Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam (Academy of Royral Socialist History, 1999). Báng là cây thân gỗ bán thường xanh, khả năng sinh trưởng phát triển khỏe trong điều kiện đồi rừng, kháng sâu bệnh tốt. Lá và búp cây báng được sử dụng làm rau ăn đặc sản, vì có thành phần dinh dưỡng cao trong lá non và búp ngọn như các chất khoáng (canxi, sắt, photpho, tro), xơ, vitamin (B1, B2, A, C) và nhiều axit amin không thay thế rất cần thiết cho con người như lizin, treonin, valin, izoloxin, metionin, xittin, phenylalamin, tyrozin,... (Chu Bá Phúc *et al.*, 2003; Nguyễn Thị Ngọc Huệ *et al.*, 2012b). Chất lượng ăn nấu của rau Báng được đánh giá rất ngon với điểm cao nhất (1,5 điểm), cao hơn rau Ngót (2 điểm), rau tai sóc (2,2 điểm), rau Bướm trắng (2,3 điểm) (Nguyễn Thị Ngọc Huệ *et al.*, 2012a). Đây là loài cây bản địa, mới chỉ có một số nghiên cứu đánh giá về đặc điểm nông sinh học, nhân giống bằng phương pháp chiết cành lớn, gieo hạt chín (Nguyễn Thị Ngọc Huệ *et al.*, 2012a). Tuy nhiên, những phương pháp này chỉ cho hệ số nhân rất thấp, do cây có mũ loăng dễ bị mất khi chặt cành hoặc hạt nhỏ li ti gieo dễ bị sâu bệnh. Vì vậy, nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô để nhân giống rau Báng là cần thiết, góp phần bảo tồn và phát triển hàng hóa nguồn gen cây rau bản địa quý.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu: Cành Báng bánh tẻ (sau khi bật chồi 1, 2, 3, 4, 5 tháng) chứa các chồi ngủ và chồi đỉnh (hình 1).



Hình 1. Cành bánh tẻ - lá cây Báng

2.2 Phương pháp

Chọn mẫu và xử lý: Chọn cành mới ra chứa chồi nách và chồi đỉnh có kích thước từ 5-12cm để chuẩn bị đưa vào nuôi cấy. Mẫu được xử lý bằng H₂O₂ với nồng độ 5%, 10%, 15% và 20% trong 10 phút; và HgCl₂ với nồng độ 0,1% trong 5, 10, 15 phút.

Phương pháp nuôi cấy: Mẫu cành bánh tẻ được sát khuẩn bằng xà phòng loăng, sau đó tách lấy chồi đỉnh và chồi nách. Các chồi này được khử trùng và cấy vào môi trường để ổn định trong vòng 20 ngày. Sau 7 ngày, những mẫu không bị nhiễm nấm khuẩn được cấy chuyển sang môi trường nuôi chồi, sau 6 tuần chồi được cấy chuyển sang môi trường phù hợp để tái sinh. Các chồi mới này là vật liệu cho các thí nghiệm tái sinh và hoàn thiện cây con *in vitro* và ngoài vườn.

- **Điều kiện nuôi cấy:** Mẫu nuôi ngoài sáng 12h/ngày, cường độ ánh sáng 2.400 - 2.600lux, nhiệt độ phòng nuôi 25±2°C; pH môi trường 5,8. Môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 18 phút.

- **Bố trí thí nghiệm**

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của chất khử trùng đến tỉ lệ sống của mẫu nuôi cấy *in vitro*: mẫu được khử trùng bằng: H₂O₂ với nồng độ khác nhau (5, 10, 15, 20%) trong 10 phút và HgCl₂ với nồng độ 0,1% trong khoảng thời gian khác nhau (5, 10, 15 phút); sau đó

được cấy trên môi trường ổn định mẫu MS1 ($\frac{1}{2}$ MS + 10% nước dừa + 2% than hoạt tính + 5mg/l PVP + 5g/l agar) (MS là viết tắt của môi trường cơ bản Murashige & Skoog, 1962).

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của mùa sinh trưởng đến tỉ lệ sống của mẫu nuôi cấy: mẫu được lấy vào các thời điểm cây sinh trưởng khác nhau (tháng 1, tháng 4, tháng 5-6 và tháng 7-8).

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của phương pháp lấy chồi nuôi cấy tạo chồi trong *in vitro*: mẫu là các chồi đỉnh, chồi nách nuôi cấy bằng 2 phương pháp bóc tách và không bóc tách.

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy đến quá trình phát sinh hình thái và tạo chồi *in vitro*: môi trường (MS2): $\frac{2}{3}$ MS + 20% đường + 10% Nước dừa + 0-2% than hoạt tính + 5g/l agar + chất điều hòa sinh trưởng Thidiazuron (TDZ) (0 - 0,15mg/l), BAP (0 - 1,5mg/l), Kinetin (0-1,5 mg/l).

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của môi trường đến sự hình thành cây con *in vitro*: môi

trường (MS2): $\frac{2}{3}$ MS + 20% đường + 10% Nước dừa + 0-2% than hoạt tính + 5g/l agar, bổ sung IBA (0-0,5mg/l) và than hoạt tính (0,5-2g/l).

Các chỉ tiêu đánh giá và phân tích số liệu

- Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) = Tổng số (TS) mẫu nhiễm \times 100/TS mẫu cấy.
- Tỷ lệ mẫu sống sót (%) = TS mẫu sống sót \times 100/TS mẫu cấy.
- Tỷ lệ tạo chồi (%) = TS chồi tái sinh \times 100/TS mẫu cấy.
- Tỉ lệ tạo rễ (%) = TS cây tạo rễ/TS cây.
- Hệ số nhân (%) = TS chồi nhân \times 100/TS mẫu cấy ban đầu.

Số liệu được xử lý thống kê theo chương trình Excel.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của chất khử trùng đến tỉ lệ sống sót của mẫu nuôi cấy *in vitro*

Thí nghiệm sử dụng môi trường nuôi cấy là MS1. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng đến sinh trưởng của mẫu nuôi cấy từ chồi được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng đến sinh trưởng của mẫu chồi

Hóa chất	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Số mẫu ban đầu	Chồi mới bật (sau 20 ngày)		
				Mẫu sống (%)	Mẫu chết (%)	Mẫu nhiễm (%)
H ₂ O ₂	5	10	30	3	0	97
	10	10	30	6	10	83
	15	10	30	0	33	67
	20	10	30	0	73	27
HgCl ₂	0,1	10	30	3	3	93
	0,1	15	30	10	36	53
	0,1	20	30	0	67	33
Tráng cồn 70%, 10% H ₂ O ₂ trong 5 phút + HgCl ₂	0,1	5	30	15	23	63
	0,1	10	30	0	73	27
	0,1	15	30	0	77	23

Khử trùng riêng rẽ H₂O₂ hoặc HgCl₂, tỉ lệ mẫu nhiễm và mẫu chết cao. Tỉ lệ mẫu sống đạt cao nhất chỉ 10% ở công thức 0,1% HgCl₂ trong 15 phút. Khử trùng kết hợp tráng cotten 70%, sau đó khử trùng bằng 10% H₂O₂ trong 5 phút, tráng 3 lần nước cất sau đó khử trùng bằng 0,1% HgCl₂ trong 5 phút thì hiệu quả khử trùng tốt hơn. Số mẫu sống đạt 15% trong các lần thí nghiệm (bảng 1). Tuy nhiên, kết quả mẫu sống và bật chồi còn tùy thuộc vào tuổi sinh lý mẫu và độ sạch của mẫu.

3.2 Ảnh hưởng của mùa sinh trưởng đến tỉ lệ sống của mẫu nuôi cấy *in vitro*

Theo tác giả Pierik (1987) thời điểm lấy mẫu rất quan trọng, 1 phần quyết định tốc độ sinh trưởng và tỉ lệ mẫu vô trùng trong *in vitro*. Trong nghiên cứu nhân giống cây Bàng ở bài báo này, mẫu được lấy vào các thời điểm: tháng 1 cây rụng lá 1 phần, mất

ngủ sâu và chồi đỉnh già; tháng 4 cây bắt đầu bật chồi mới (chồi mới bật có màu xanh hơi đỏ, nhựa đặc); tháng 5-6 chồi vào bánh tẻ (đoạn chồi đã cứng, màu xanh, nhựa loãng); và tháng 7-8 cây bắt đầu hình thành quả, lá màu xanh thẫm. Phương pháp khử trùng là tráng cotten 70%, H₂O₂ 10% 5 phút, 0,1% HgCl₂ trong 5 phút. Môi trường nuôi cấy là MS1. Kết quả về tỉ lệ sống và sinh trưởng của mẫu sau khi đưa vào *in vitro* cho thấy lấy mẫu vào thời điểm cành bánh tẻ (tháng 5-6), giai đoạn chồi mới bật của cây mẹ được 1-1,5 tháng và tiếp tục chuẩn bị bật chồi lần 2. Khi khử trùng mẫu ở giai đoạn này thì tỉ lệ sống đạt được 15% và sinh trưởng của mầm bật lần 2 nhanh hơn so với các công thức khác. Có thể khi đó các chồi đã tích lũy đủ dinh dưỡng và xenlulo, cứng cáp để khi đưa vào khử trùng, mẫu ít bị tổn thương và nhanh bật mầm mới.

Bảng 2. Ảnh hưởng của mùa sinh trưởng đến tỉ lệ sống của mẫu nuôi cấy *in vitro*

Tháng lấy mẫu	Đặc điểm cây mẹ	Tỉ lệ sống (%)	Nhận xét (sau 15 ngày nuôi cấy)
1	Cây nuôi quả, mất ngủ sâu, chồi đỉnh già	7	Mẫu bật mầm chậm, thời gian ngủ dài, dễ nhiễm khuẩn
4	Chồi mới bật, lá xanh hơi đỏ	1	Mẫu sau khử trùng 3 ngày bị thâm và chết
5-6	Chồi bánh tẻ, lá chuyển xanh thẫm	15	Mẫu bật mầm nhanh sau 1 tuần xuất hiện chồi mới, chồi khỏe
7-8	Cây có quả, lá xanh thẫm, cứng	8	Mẫu bật mầm chậm, thời gian ngủ dài, dễ nhiễm khuẩn

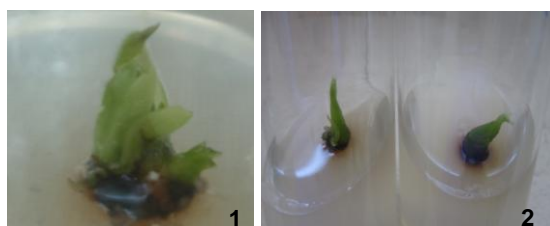
3.3 Ảnh hưởng của phương pháp lấy chồi nuôi cấy đến khả năng tạo chồi

Chồi sau nuôi cấy 6 tuần được cấy chuyển sang môi trường tái sinh. Cây Bàng là cây thân gỗ nên tốc độ sinh trưởng rất chậm. Nếu để nguyên chồi cây (hình 2 - ảnh 1)

chuyển sang môi trường mới thì sau 2 tháng chồi hầu như không phát triển được, thậm chí bị chết. Vì vậy thí nghiệm đã bóc tách bỏ phần lá kèm bọc bên ngoài chồi (hình 2 - ảnh 2) và đưa vào nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy đến sinh trưởng của mẫu *in vitro*

Nguồn mẫu	Số mẫu cấy	Số mẫu sống	Nhận xét (Sau 30 ngày nuôi cấy)
Chồi đỉnh không bóc tách	30	10	Chồi không phát triển, một số chồi chuyển màu xanh đen sau 2 tháng bị chết
Chồi đỉnh bóc tách	30	17	Chồi phát triển chậm, sau 2 tháng một số chồi chuyển màu xanh non, tươi biểu hiện sinh trưởng
Chồi nách không bóc tách	30	15	Chồi phát triển chậm, sau 1 tháng chuyển màu xanh tươi biểu hiện sinh trưởng
Chồi nách bóc tách	30	23	Chồi phát triển nhanh, sau 1 tháng xuất hiện chồi mới

**Hình 2.** Chồi

(1) bóc tách, (2) không bóc tách

Kết quả cho thấy các chồi có bóc tách phần lá bên ngoài đã sinh trưởng tốt, sau 2 tháng cây đã chuyển màu xanh và bật chồi mới nhanh hơn so với những chồi không bóc tách (bảng 3).

3.4 Ảnh hưởng của môi trường đến quá trình tạo chồi *in vitro*

Chồi *in vitro* mới tạo thành được cấy trên môi trường MS2 (2/3MS + 20% đường + 10% Nước dừa + 0-2% than hoạt tính + 5g/l agar) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng TDZ; BAP và BAP kết hợp Kinetin để nhân chồi. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến quá trình tạo chồi được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thành phần môi trường và chất BAP đến sinh trưởng của chồi

Chất ĐHST	Nồng độ (mg/l)	Tổng số mẫu	Hệ số nhân	Nhận xét (Sau 90 ngày nuôi cấy)
TDZ	0,00	30	1,0	Chồi xanh nhạt +
	0,05	30	1,3	Chồi xanh nhạt +
	0,10	30	1,4	Chồi xanh nhạt ++
	0,15	30	1,2	Chồi xanh nhạt+ mọng nước nhẹ, lá hơi xoắn, sùi gốc
CV (%)			0,8	
LSD _{0,05}			0,1	
BAP	0,5	30	1,4	Chồi xanh nhạt +
	1,0	30	1,4	Chồi xanh nhạt +
	1,5	30	1,1	Chồi xanh+, gốc sùi màu trắng
CV (%)			1,0	
LSD _{0,05}			0,1	
BAP 0,5mg/l + Ki	0,5	30	1,8	Chồi xanh nhạt +
	1,0	30	1,3	Chồi xanh nhạt ++
	1,5	30	1,0	Chồi lá dày quăn, mọng nước
CV (%)			0,9	
LSD _{0,05}			0,4	

Quan sát cây trong thí nghiệm cho thấy: Không tạo thêm chồi mới trên môi trường 2/3MS. Môi trường bổ sung TDZ 0,1mg/l đã kích thích nhân chồi tốt hơn, chồi mới bật có màu xanh nhạt. Tăng nồng độ TDZ lên 0,15mg/l, gốc bị sùi mủ kém phát triển hơn. Môi trường 2/3 MS bổ sung 0,5-1,0mg/l BAP cũng kích thích nhân chồi, đạt hệ số nhân 1,4, chồi mới bật có màu xanh và sắc xanh kém hơn so với môi trường bổ sung chất TDZ. Môi trường 2/3MS bổ sung kết hợp 0,5mg/IBA và 0,5mg/l K đã cải thiện rõ rệt sinh trưởng của chồi, hệ số nhân tăng lên đạt 1,8 lần,

chồi xanh. Có thể TDZ có tác dụng kép kích thích tạo chồi và rễ (hệ số nhân = 1,5) nên hệ số nhân kém hơn, kinetin kích thích quang hợp tốt hơn so với BAP (1,6) nên cây sinh trưởng trên môi trường có (BAP và Ki) có lá xanh hơn so với bổ sung đơn lẻ BAP.

3.5 Ảnh hưởng của môi trường đến sự hình thành cây con in vitro

Chồi trưởng thành trên môi trường nhân được chuyển sang môi trường tạo rễ. Thí nghiệm sử dụng môi trường MS2 có bổ sung IBA và than hoạt tính (THT).

Bảng 5. Ảnh hưởng của môi trường đến sự hình thành cây con in vitro

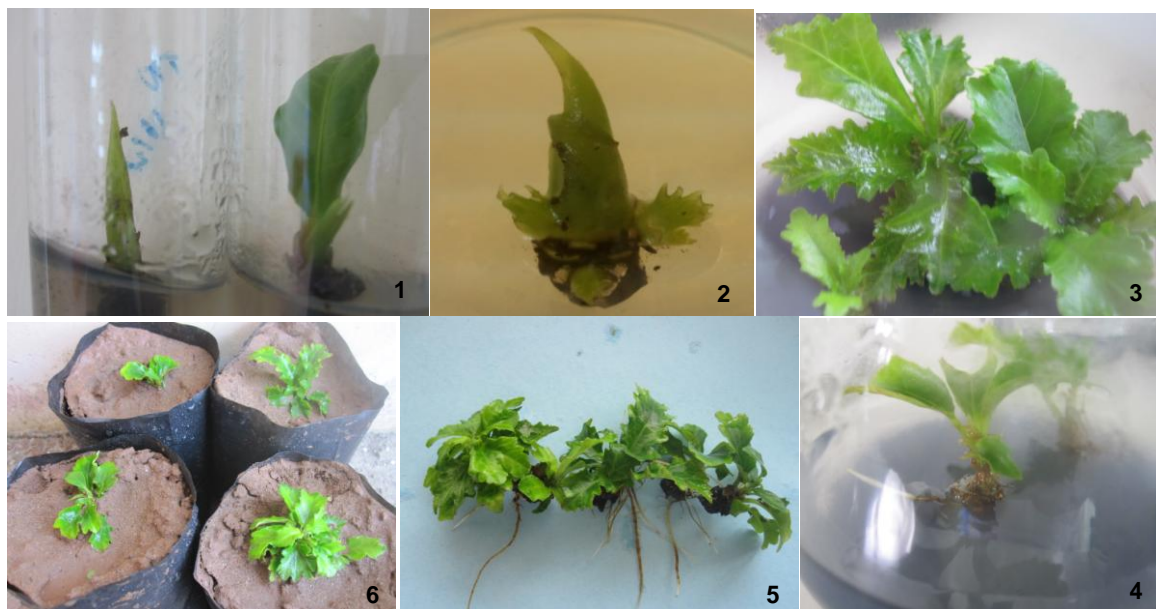
Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng	Tỉ lệ cây tạo rễ (%)	Số rễ/cây	Nhận xét (Sau 60 ngày nuôi cấy)
Đ/C	1,0	1,0	Lá xanh nhạt +
IBA (0,2mg/l)	48	1,2	Lá xanh nhạt +, rễ ngắn đơn
IBA (0,3mg/l)	59	1,8	Lá xanh nhạt +, rễ dài, có rễ phụ
IBA (0,5mg/l)	53	1,5	Lá xanh nhạt +, rễ dài, có rễ phụ, gốc sùi màu trắng
CV (%)	1,0	0,8	
LSD _{0,05}	6,0	0,3	
THT 0,5g/l	15	1,0	Lá xanh bóng ++
THT 1g/l	23	1,1	Lá xanh bóng ++, rễ ngắn, có rễ phụ
THT 1,5/l	55	1,5	Lá xanh bóng +++, rễ ngắn dài, có rễ phụ
THT 2g/l	44	1,6	Lá xanh bóng +++, rễ dài, có rễ phụ, một số rễ chết
CV (%)	0,9	0,9	
LSD _{0,05}	9,0	0,2	

Than hoạt tính và IBA ở nồng độ thích hợp đều kích thích ra rễ nhưng chỉ ra 1-2 rễ/cây (bảng 5). Lá mới ra trong in vitro đều có mép lá hình răng cưa khác so với lá ở cây trưởng thành ngoài tự nhiên, điều này đúng theo mô tả hình thái lá non ở cây non mọc từ hạt (Phạm Hoàng

Hộ, 2002). Cây cấy trên môi trường bổ sung IBA 0,3mg/l có tỉ lệ tạo rễ cao nhất 59% và 1,8 rễ/cây, trên môi trường bổ sung 1,5g/l than hoạt tính tỉ lệ tạo rễ là 55% và 1,5 rễ/cây. Tuy nhiên, cây sinh trưởng trên môi trường bổ sung than hoạt tính có lá xanh đậm hơn hẳn so với

môi trường bổ sung IBA, độ xanh của lá cũng tăng dần theo lượng than hoạt tính bổ sung từ 0,5g/l đến 1,5g/l.

Cây có rễ được đưa ra bầu ở vườn ươm trên đất phù sa, tưới giữ ẩm thường xuyên, sau 1 tháng ra lá mới.



Hình 3. (1) Chồi đưa vào nuôi *in vitro*, (2) Sinh trưởng chồi, (3) Nhân chồi, (4) Tạo rễ, (5,6) Đưa cây ra ngoài vườn ươm

IV. KẾT LUẬN

Mẫu cành bánh tẻ (tháng 5-6) làm vật liệu nuôi cấy *in vitro*. Khử trùng mẫu cành bằng cách tráng cồn 70 - 10% H₂O₂ trong 5 phút - tráng 3 lần nước cất - 0,1% HgCl₂ trong 5 phút, mẫu sống 15%. Chồi sau nuôi cấy 6 tuần bóc tách lá kèm bao bên ngoài và cấy trên môi trường tái sinh (2/3MS +

0,5mg/IBAP + 0,5mg/l K) đạt hệ số nhân 1,8 lần, chồi xanh nhạt, mép lá có hình răng cưa. Cây tạo rễ đạt 59% hoặc 55% trên môi trường bổ sung IBA 0,3mg/l hoặc than hoạt tính 1,5g/l. Cây có rễ được đưa ra bầu ở vườn ươm trên đất phù sa, tưới giữ ẩm thường xuyên, sau 1 tháng ra lá mới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Academy of Royral Socialist History (1999). *Ficus callosa* Willd. in China, S.Yunnan, Xishuangbanna, june 1999. Description in Mem. Acad. Berl. (1798). 102 trang.
2. Chu Bá Phúc, Phạm Thị Kim Hạnh, Phạm Thị Liên, Phạm Thị Trang, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Bảo Ngọc, Đỗ Năng Vịnh (2003). Nghiên cứu nhân nhanh một số cây thân gỗ thông qua hệ thống tái sinh mô sẹo phối hóa và nhân chồi *in vitro* (Tếch, Trâm, thông, Hồng, bạch đàn). Báo cáo khoa học, Hội nghị sinh học toàn quốc (1993-2003). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, năm 2003. Tr: 939-943.

3. Nguyễn Thị Ngọc Huệ, Hoàng Đình Phi, Lã Tuấn Nghĩa (2012b). Bảo tồn và sử dụng rau bản địa tại Việt Nam, thực trạng, thách thức và kiến nghị. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, tháng 12, trang 70-76.
4. Nguyễn Thị Ngọc Huệ, Hoàng Đình Phi, Vũ Quang Huy, Nguyễn Thị Hằng (2012a). Nghiên cứu đặc điểm nông sinh học cây Báng (*Ficus callosa* Willd.) làm rau đặc sản tại Ba Vì. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, tháng 12, trang 77-83.
5. Pierik R. L. M (1987). In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff publisher, Dordrecht, Netherlands.
6. Phạm Hoàng Hộ (2002). *Cây cỏ Việt Nam*, Quyển II, NXB trẻ, tr.563
7. Zimmerman, R., (1985). Application of tissue culture propagation to woody plants. pp. 165-177. In: llenke, R.R., Hughes, K.W., Constantin, M.J., Hollaendra, A. (eds.): K.W. Tissue Culture in Forestry and Agriculture, Plenum Press. New York.

Người thẩm định: TS. Phí Hồng Hải