 DOI: 10.31276/VJST.65(12).56-63

Nghiên cứu nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16) thông qua phát sinh phôi soma và sử dụng công nghệ Bioreactor

Khổng Ngân Giang*, Lê Thị Như

Viện Di truyền Nông nghiệp, đường Phạm Văn Đồng, phường Cổ Nhuế 1, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/11/2022; ngày chuyển phản biện 2/12/2022; ngày nhận phản biện 23/12/2022; ngày chấp nhận đăng 27/12/2022

Tóm tắt:

Trong bài báo này, nghiên cứu tập trung vào việc xác định một số thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy nhằm tối ưu 4 bước chính của quá trình tạo phôi soma và tái sinh phôi bằng Bioreactor của 2 giống cà phê *Arabica* F1 Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16), bao gồm: hình thành mô sẹo phôi, nhân tế bào phôi, biệt hóa phôi và tái sinh phôi soma trong Bioreactor ngâm tạm thời RITA 1L. Kết quả cho thấy, sử dụng Kinetin 2 mg/l và Phytagel 4 g/l cho tỷ lệ hình thành mô sẹo từ mẫu lá các giống cà phê nghiên cứu đạt 94,2% ở giống H1 và 92,1% ở giống H16. Bên cạnh đó, việc bổ sung Glycine 20 mg/l vào môi trường nuôi cấy làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa lên 58,1% ở cả 2 giống. Thử nghiệm ảnh hưởng của Trichostatin A (TSA) 0,03 mg/l trong 7 ngày đầu nuôi cấy đến quá trình biệt hóa phôi cho thấy số lượng phôi ngư lôi tạo ra từ 1 g mô sẹo ban đầu đạt 1287 phôi ở giống H1 và 1635 phôi ở giống H16. Cuối cùng, sử dụng Bioreactor 1L-RITA, ngâm 1 phút trong khoảng thời gian 6 giờ cho hiệu quả tái sinh chồi từ phôi ngư lôi đạt 75,02% ở giống H1 và 82,03% ở giống H16.

Từ khóa: ***Arabica*, Bioreactor, *in vitro*, mô sẹo phôi hóa.**

Chỉ số phân loại: **4.6**

1. Đặt vấn đề

Coffea Arabica được trồng chủ yếu ở khu vực Mỹ Latinh và theo chiếm hơn 80% sản lượng cà phê thế giới theo Tổ chức Cà phê quốc tế (International Coffee Organization). Cây cà phê *Arabica* có tính đa dạng di truyền thấp và trước áp lực của biến đổi khí hậu các giống cà phê chè đang mất dần khả năng kháng các stress sinh học và phi sinh học, có sức sống yếu và năng suất thấp [1]. Do đó, từ những năm 1990, Trung tâm Quốc tế nghiên cứu nông nghiệp và phát triển của Pháp (CIRAD) phối hợp cùng Công ty Thương mại Cà phê ECOM (Thuỵ Sĩ) đã lai tạo giữa các dòng giống cà phê *Arabica* của Mỹ với các giống cà phê *Arabica* hoang dã từ Ethiopia và Sudan để tạo ra các giống lai F1 có tính đa dạng di truyền cao hơn [2]. Năng suất và chất lượng của các giống cà phê F1 đã được đánh giá trong khuôn khổ của dự án BREEDCAFS (Nghiên cứu lai tạo các giống cà phê cho các hệ thống nông lâm kết hợp) tại 4 quốc gia khác nhau, trong đó có Việt Nam. Kết quả cho thấy, 2 trong số các giống lai F1 bao gồm Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16) được đánh giá là có năng suất cao hơn 10-20% so với các giống địa phương. Hơn nữa, khả năng kháng bệnh gỉ sắt của các giống này cũng cao hơn, giúp giảm việc sử dụng thuốc trừ sâu 15-20%. Đặc biệt, các giống này có hương vị thơm ngon hơn các giống địa phương (https://cordis.europa.eu/article/id/435693-climate-change-resilient-hybrid-coffee-with-added-profits). Tuy vậy, các con lai mang cấu trúc di truyền dị hợp tử phải được nhân giống vô tính để bảo tồn tất cả các đặc tính của cây mẹ. Do vậy, nhân giống từ phôi vô tính (Somatic embryogenesis - SE) được coi là công cụ hứa hẹn nhất để đảm bảo việc phổ biến rộng rãi các giống lai [3].

Từ những nghiên cứu tiên phong của G. Staritsky (1970) [4], M.R. Söndhal và cs (1977) [5], E.S. Pierson và cs (1983) [6] và P. Dublin (1981) [7], công nghệ tạo phôi soma (SE) đã được đề xuất như một phương pháp thay thế để nhân giống các giống cà phê ưu tú từ 2 loài cà phê *Coffea arabica* và *C. canephora*. Nuôi cấy mô của 2 loài cà phê này thể hiện tiềm năng tạo phôi cao. Sự phát triển phôi soma trực tiếp từ mẫu lá cà phê đã được báo cáo lần đầu tiên bởi G. Staritsky (1970) [4] và tỷ lệ tạo phôi từ mô sẹo cao được ghi nhận trong nghiên cứu của M.R. Söndhal và cs (1977) [5]. Các đặc điểm hình thái và mô học của cả mô sẹo có phôi và không có phôi cũng như các sự kiện mô học dẫn đến sự tái sinh phôi trong các công nghệ tạo phôi vô tính trực tiếp và gián tiếp đã được nhiều tác giả mô tả chi tiết. Ngoài ra, các nghiên cứu cũng cho thấy một số vấn đề vốn gây cản trở sự phát triển của phôi vô tính ở các loại cây trồng khác như: khó tái tạo các mô sinh phôi và hiệu ứng kiểu gen mạnh lại rất hạn chế ở cà phê [8-10].

Trong quá trình biệt hóa phôi, những khó khăn trong việc kéo dài sự phát triển của phôi đến giai đoạn hình thành phôi ngư lôi trong môi trường lỏng đã được báo cáo đối với hầu hết các loài, kể cả cà phê [11, 12]. K. Boutilier và cs (2002) [13] đã chỉ ra rằng, việc biệt hóa tạo phôi đơn bội ở thực

*Tác giả liên hệ: Email: ngangiang.khong2010@gmail.com

Study on rapid multiplication of two hybrid *Arabica* coffee varieties F1 Centroamericano (H1) and Mundo Maya (H16) through somatic embryogenesis and Bioreactor technology

Ngan Giang Khong*, Thi Nhu Le

Agricultural Genetics Institute, Pham Van Dong Street, Co Nhue 1 Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

Received 29 November 2022; revised 23 December 2022; accepted 27 December 2022

Abstract:

In this paper, the research focuses on determining some components and culture conditions in order to optimise the 4 main steps of somatic embryogenesis and embryo regeneration by Bioreactor of two *Arabica* F1 coffee varieties H1 and H16, including: (1) formation of embryogenic callus, (2) multiplication of embryogenic cells, (3) embryonic differentiation, and (4) regeneration of somatic embryo using the temporary immersion Bioreactor RITA 1L. The results showed that on the medium supplemented with Kinetin 2 mg/ll and Phytagel 4 g/l, the callus formation rate reached 94.2 and 92.1% for 2 varieties H1 and H16, respectively. Besides, the addition of Glycine 20 mg/l to the culture medium increased the embryogenic callus rate by 58.1% in both varieties. Adding Trichostatin A 0.03 mg/l in the embryo differentiation medium in the first 7 days of culture showed that the number of torpedo embryos was scored from 1g of initial callus up to 1287 in H1 and 1635 in H16. Finally, using Bioreactor 1L-RITA, soaking for 1 min every 6 hours, the regeneration efficiency reached 75.02% in H1 and 82.03% in H16.

Keywords: ***Arabica*, Bioreactor, *in vitro*, somatic embryogenesis.**

Classification number: **4.6**

vật được kiểm soát bởi hoạt động của Histone deacetylase (HDAC). Ngăn chặn hoạt động của HDAC bằng chất ức chế HDAC (HDACi) dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ phôi biệt hóa [12]. R. Awada và cs (2020) [14] đã thử nghiệm ảnh hưởng của chất ức chế hoạt động của HDAC-TSA đến quá trình biệt hóa phôi ở *Arabica*, kết quả cho thấy số lượng phôi ngư lôi tạo ra tăng gấp 3 lần so với môi trường đối chứng không bổ sung TSA.

Nuôi cấy mô thực vật bằng công nghệ Bioreactor (lò phản ứng sinh học) là cách mở rộng quy mô hứa hẹn nhất cho quy trình vi nhân giống, đặc biệt là thông qua quá trình phát sinh phôi soma. 20 dòng vô tính của *C. Arabica* lai F1 đã được nhân giống thành công bằng cách sử dụng lò phản ứng sinh học ngâm tạm thời 1 L-RITA® [15]. Tùy thuộc vào kiểu gen, sản lượng dao động từ 15.000 đến 50.000 phôi soma trên mỗi gram huyền phù phôi. Việc điều chỉnh thời gian ngâm là rất quan trọng với loại lò phản ứng sinh học này. J. Albarrán và cs (2005) [16] đã báo cáo rằng, việc tăng tần suất ngâm trong thời gian ngắn (ngâm 1 phút sau mỗi 24, 12 và 4 giờ) đã kích thích quá trình sản xuất phôi và cải thiện chất lượng phôi ngư lôi. Mặt khác, việc tăng thời gian ngâm (1, 5 và 15 phút) đã ức chế quá trình tái tạo phôi và ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng hình thái của chúng.

Ở Việt Nam, quy trình nhân nhanh cà phê bằng phôi soma đã được nghiên cứu hoàn thiện cho một số giống cà phê Robusta [17, 18]. Trong khi đó, các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi vô tính nuôi cấy trong hệ thống Bioreactor - RITA cũng đã được nghiên cứu cho giống cà phê *Arabica* TN1, tuy nhiên hệ số nhân phôi chỉ đạt 1-2 lần, quy trình nhân nhanh cho giống cà phê *Arabica* TN1 bằng công nghệ Bioreactor hoàn thiện vẫn chưa được báo cáo [18].

Trong bài báo này, các thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố như chất điều hòa sinh trưởng, thành phần môi trường nuôi cấy, bình nuôi cấy hay mật độ nuôi cấy đến việc tạo mô sẹo và phôi, nhân nhanh, biệt hóa và tái sinh phôi, cung cấp thông tin cần thiết cho việc hoàn thiện một quy trình nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* F1 tiềm năng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, địa điểm, thời gian nghiên cứu

Hai giống cà phê *Arabica* lai F1: Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16) được lai tạo bởi CIRAD và Công ty Thương mại Cà phê ECOM và được nhập nội trong khuôn khổ dự án BREEDCAFS (2017-2021), hiện đang lưu giữ tại Viện Di truyền Nông nghiệp.

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp từ tháng 7/2021 đến 9/2022.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu lá và khử trùng mẫu

Cây cà phê *Arabica* lai F1 H1 và H16 1 năm tuổi được trồng trong vườn thí nghiệm của Viện Di truyền Nông nghiệp. Các cặp lá thứ 2 hoặc 3 tính từ đỉnh chồi được sử dụng làm vật liệu thí nghiệm. Rửa lá dưới vòi nước, sau đó tiến hành khử trùng bằng 100 ml dung dịch Javen NaClO 2% bổ sung 2 giọt Tween 20%, trong thời gian 20 phút, rửa nhanh và ngâm trong nước cất vô trùng trong 20 phút.

2.2.2. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo

Mẫu lá sau khi khử trùng được cắt thành các mẩu hình vuông có kích thước 0,5-1 cm^2, đặt vào đĩa Petri (ø6 cm) chứa 10 ml môi trường tạo mô sẹo T1 [1/2 MS + đường 30 g/l + D-Myo inositol 0,1 g/l + Malt extract 0,4 g/l + 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic axit) 0,5 mg/l + Agar 5,5 g/l] bổ sung 2-iP (6-(γ,γ-Dimethylallylamino)-Purine) (2 mg/l) hoặc Kinetin (2-3 mg/l) [17, 19]. Mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 28°C, trong điều kiện tối. Khả năng tạo mô sẹo của các mẫu ở các công thức khác nhau được đánh giá sau 1 tháng nuôi cấy: Tỷ lệ tạo mô sẹo = Số mảnh lá xuất hiện mô sẹo/Tổng số mảnh lá thí nghiệm x 100%.

2.2.3. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất làm đặc môi trường đến khả năng tạo mô sẹo

Các mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường T1 với chất điều hòa sinh trưởng tối ưu từ thí nghiệm trước. Tiến hành đánh giá các chất làm đặc môi trường khác nhau bao gồm Agar 5,5 g/l, Gelrite 3,2 g/l hoặc Phytagel 4,0 g/l. Các mẫu được nuôi cấy trong cùng điều kiện như trên và đánh giá khả năng tạo mô sẹo của các mẫu sau 1 tháng nuôi cấy.

2.2.4. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của một số axit amin đến khả năng tạo mô sẹo phôi hóa

Sau 1 tháng nuôi cấy trên môi trường T1, những mẫu lá tạo mô sẹo được chuyển sang bình nuôi cấy chứa 50 ml môi trường tạo mô sẹo phôi hóa T2 (1/2 MS + đường 30 g/l + Cysteine 40 mg/l + D-Myo inositol 0,2 g/l + Malt extract 0,8 g/l + BAP (6-Benzylaminopurine) 4 mg/l + 2,4-D 1 mg/l) bổ sung axit amin Glycine (20 mg/l) hoặc Proline (20 mg/l) hay kết hợp cả 2 loại (Glycine 20 mg/l + Proline 20 mg/l). Mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 28°C, trong điều kiện tối. Sau 5-6 tháng nuôi cấy, đánh giá khả năng tạo mô sẹo phôi hóa thông qua: Tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa = Số mô sẹo phôi hóa/Số mô sẹo nuôi cấy x 100%.

2.2.5. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của bình nuôi cấy và mật độ nuôi cấy đến khả năng nhân phôi

Các mô sẹo phôi hóa là những mô sẹo hình thành trên bề mặt mô sẹo sơ cấp, có hình tròn, nhẵn, màu sắc từ vàng đến nâu nhạt khi quan sát dưới kính hiển vi. Các mô sẹo phôi hóa được chọn lọc để tiếp tục nhân lên trong môi trường lắc lỏng M (1/4 MS + đường 30 g/l + D-Myo inositol 0,1 g/l + BAP 1 mg/l + 2,4-D 0,3 mg/L). Tiến hành thử nghiệm nuôi cấy phôi ở 3 nồng độ 10-15-20 g/l với 2 loại bình: bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường M hoặc đĩa nuôi cấy 24 giếng, mỗi giếng chứa 1 ml môi trường M. Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, tối, tần số lắc 120 vòng/phút. Cấy chuyển phôi sang môi trường mới 3 tuần/lần. Hệ số nhân phôi được đánh giá sau 3 tháng nuôi cấy :

Hệ số nhân phôi = Khối lượng tươi của phôi sau quá trình nuôi cấy/Khối lượng tươi của phôi ban đầu.

2.2.6. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất ức chế tăng sinh tế bào TSA đến sự phân hóa phôi

Sau 3 tháng nuôi cấy trong môi trường nhân nhanh, phôi được chuyển sang bình tam giác 250 ml, chứa 100 ml môi trường phân hóa phôi DIF (MS + đường 30 g/l + D-Myo inositol 0,1 g/l + BAP 1 mg/l), mật độ phôi 1 g/l. Nhằm ức chế sự tăng sinh và thúc đẩy sự biệt hóa của tế bào, tiến hành bổ sung vào môi trường hoạt chất TSA (Sigma) ở các nồng độ 0,03-0,3-3 mg/l trong thời gian 7 ngày hoặc 14 ngày đầu nuôi cấy, sau đó phôi được chuyển trở lại nuôi cấy trong môi trường DIF. Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, tối, tần số lắc 120 vòng/phút. Cấy chuyển mẫu 3 tuần/lần trong vòng 3-4 tháng, sau đó tiến hành đánh giá và đếm số phôi ngư lôi được hình thành từ 1 g mô sẹo phôi hóa. Phôi ngư lôi được xác định có hình dạng thon dài về phía hai đầu, với một đầu phân chia thành hai phần rõ rệt, có hình dạng giống chiếc ngư lôi.

2.2.7. Nghiên cứu đánh giá chu kỳ sục khí đến sự tái sinh phôi

Phôi được nuôi cấy tái sinh chồi trong hệ thống nuôi cấy bán ngập chìm Bioreactor RITA 1L (Sigma) chứa 200 ml môi trường tái sinh "DEV" (MS + Cysteine 10 mg/l + đường 30 g/l + BAP 0,5 mg/l). Mật độ nuôi cấy 500 phôi/bình RITA, thử nghiệm 4 tần suất bán ngập chìm khác nhau: 1 phút/6 giờ, 1 phút/8 giờ, 1 phút/10 giờ và 1 phút/12 giờ ở điều kiện nuôi cấy như trên. Sau 3 tháng nuôi cấy, tiến hành đánh giá tỷ lệ tái sinh của phôi: số phôi tái sinh/tổng số phôi nuôi cấy ban đầu x 100%.

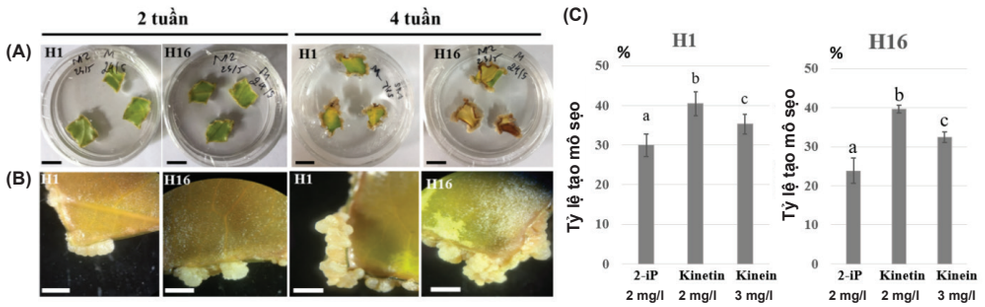
2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Mỗi thí nghiệm lặp lại 5 lần, số liệu được xử lý thống kê bằng phương pháp kiểm định phương sai ANOVA, sử dụng phần mềm R.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo

Mẫu lá cà phê được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo T1, bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng 2-iP 2 mg/l hoặc Kinetin 2-3 mg/l. Sau 2 tuần nuôi cấy, mô sẹo đã bắt đầu xuất hiện tại các cạnh của mảnh lá. Sau 4 tuần, số lượng mô sẹo tăng lên, kích thước đạt khoảng 3-5 mm (hình 1A và 1B). Tỷ lệ tạo mô sẹo trên môi trường bổ sung 2-iP (2 mg/l) là 29,99 và 23,88%, tương ứng với giống H1 và H16. Trên môi trường chứa Kinetin 2 mg/l, tỷ lệ tạo mô sẹo ở H1 và H16 lần lượt là 40,44 và 39,67%. Khi tăng nồng độ Kinetin lên 3 mg/l, tỷ lệ tạo mô sẹo giảm xuống còn 35,29 và 32,45%, tương ứng với 2 giống H1 và H16. Sự khác



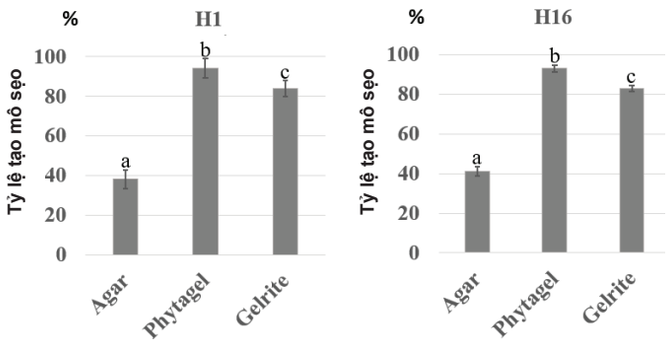
Hình 1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo của 2 giống cà phê H1 và H16. (A) Mẫu lá cà phê H1, H16 trên môi trường tạo mô sẹo T1 bổ sung Kinetin 2 mg/l sau 2 tuần và 1 tháng nuôi cấy; thước: 1 cm; **(B)** Hình ảnh mô sẹo quan sát dưới kính hiển vi; thước: 1 mm; **(C)** Tỷ lệ tạo mô sẹo của 2 giống H1 và H16 trên các môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Trong cùng một giống, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức thí nghiệm cho từng giống (hình 1C). Như vậy, sử dụng Kinetin ở nồng độ 2 mg/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo tốt nhất đối với cả 2 giống cà phê nghiên cứu. Trong nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo của nhóm tác giả N.T. Hau và cs (2013) [17] đã báo cáo sử dụng kết hợp 2,4-D (2 mg/l) và 2-iP (2 mg/l) cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất (33%) ở giống cà phê vối cao sản. Còn trong nghiên cứu trên giống cà phê chè TN1, nhóm tác giả N.V. Thuong và cs (2017) [19] đã cho thấy công thức bổ sung 2,4-D 1 mg/l và Kinetin 2 mg/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo tốt nhất (47,8%). Các tác giả cũng chỉ ra rằng, không bổ sung Kinetin vào môi trường nuôi cấy thì tỷ lệ tạo mô sẹo chỉ đạt 14,2-16,3%.

3.2. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất làm đặc môi trường đến khả năng tạo mô sẹo

Một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến các đặc tính hóa học và vật lý của môi trường nuôi cấy mô thực vật là các chất làm đặc môi trường. Các chất này làm cho môi trường cứng lại và ảnh hưởng đến các đặc tính khuếch tán của môi trường. Do đó, các chất làm đặc có tác động đáng kể đến phản ứng, sự tăng trưởng và phát triển của nguyên liệu nuôi cấy mô [20]. Hơn nữa, chúng có thể góp phần vào sự xuất hiện của hiện tượng cường nước (còn được gọi là quá trình thủy tinh hóa), là một rối loạn sinh lý phổ biến khiến lá trở nên giòn [21]. 2 loại chất tạo gel thường được sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật là Agar và Gellan gum. Agar là một loại polysacarit được chiết xuất từ rong biển, trong khi Gellan gum (như Gelrite và Phytagel) là một loại polysacarit của vi khuẩn. Do đó, tác động của các chất làm đặc môi trường đối với các quy trình nuôi cấy mô từ giai đoạn hình thành mô sẹo cho đến giai đoạn tái sinh chồi và ra rễ là khác nhau [22].

Sau khi chọn được chất điều hòa sinh trưởng tốt nhất cho việc phát sinh mô sẹo là Kinetin 2 mg/l, tiến hành thử nghiệm các chất làm đặc môi trường khác nhau: Agar 5,5 g/l, Phytagel 4 g/l và Gelrite 3,2 g/l. Quan sát cho thấy, trên môi trường sử dụng Agar 5,5 g/l, mô sẹo chỉ được hình thành ở vết cắt gân lá và một số điểm rải rác của vết cắt bản lá, số lượng mô sẹo ít, nhỏ, mảnh lá bắt đầu xuất hiện các đốm nâu sau 2 tuần nuôi cấy và sau 1 tháng các đốm nâu đã lan rộng ra phần lớn diện tích bản lá. Ngược lại, sử dụng phytagel 4 g/l hoặc Gelrite 3,2 g/l, mô sẹo được hình thành ở toàn bộ vết cắt bản lá, số lượng mô sẹo nhiều và lớn, mảnh lá ít bị hóa nâu. Tỷ lệ tạo mô sẹo trên môi trường sử dụng Gelrite 3,2 g/l là 83,75 và 83,04%, tương ứng với giống H1 và H16. Trên môi trường bổ sung Phytagel 4 g/l tỷ lệ mô sẹo đạt cao nhất tới 94,2% đối với giống H1 và 92,1% cho giống H16, không có lần lặp nào có tỷ lệ thấp hơn 85%. Trên môi trường sử dụng Agar 5,5 g/l, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo thấp nhất, ở H1 là 38% và H16 là 41% (hình 2). Sự khác biệt về tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.



Hình 2. Tỷ lệ tạo mô sẹo của 2 giống cà phê H1 và H16 trên các môi trường sử dụng các chất làm đặc khác nhau. Thước: 1 cm. Trong cùng một giống, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

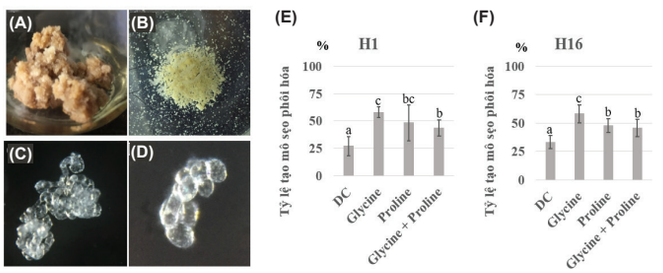
Trong số các chất làm đặc môi trường, Agar thường tạo ra môi trường gel ổn định trong thời gian dài và không liên kết quá mức với các thành phần môi trường, tuy nhiên thường có nhiều tạp chất. Mặt khác, Gelrite/Phytagel tạo ra gel cứng ở nồng độ thấp hơn nhiều so với Agar, gần như trong suốt, giúp dễ dàng xác định sự lây nhiễm ở giai đoạn đầu. Gelrite/Phytagel không chứa các hợp chất Phenolic [23] và đã được báo cáo là mang lại kết quả tốt hơn Agar

trong: tái sinh và nhân chồi [24], sản xuất phôi soma và sự phát triển của mô sẹo [25, 26]. Kết quả từ thí nghiệm này đã củng cố sự tin cậy cho các kết luận này.

Như vậy, kết quả đánh giá ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng và chất làm đặc môi trường đến khả năng tạo mô sẹo của 2 giống cà phê H1 và H16 cho thấy, sử dụng chất điều hòa sinh trưởng Kinetin 2 mg/l và chất làm đặc môi trường Phytagel 4 g/l cho hiệu quả tạo mô sẹo tốt nhất đối với cả 2 giống nghiên cứu, tỷ lệ tạo mô sẹo đạt trên 90% ở cả 2 giống H1 (94,2%) và H16 (92,1%).

3.3. Đánh giá ảnh hưởng của một số axit amin đến khả năng tạo mô sẹo phôi hóa

Tạo mô sẹo phôi hóa là bước quan trọng để tạo dịch huyền phù tế bào. Tiêu chí để chọn lọc mô sẹo phôi hóa là: mô sẹo tơi xốp, màu sắc từ vàng đến nâu nhạt và có một số phôi soma quan sát được trên bề mặt của nó (hình 3A). Các cụm mô sẹo sẽ nhanh chóng tách rời trong dung dịch lỏng (hình 3B). Quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy các mô sẹo phôi hóa có hình dạng tròn, nhân nổi rõ, tỷ lệ nhân/tế bào chất cao, không bào nhỏ, trong tế bào chất có nhiều dạng cấu trúc hình cầu nhỏ (hình 3C và 3D).

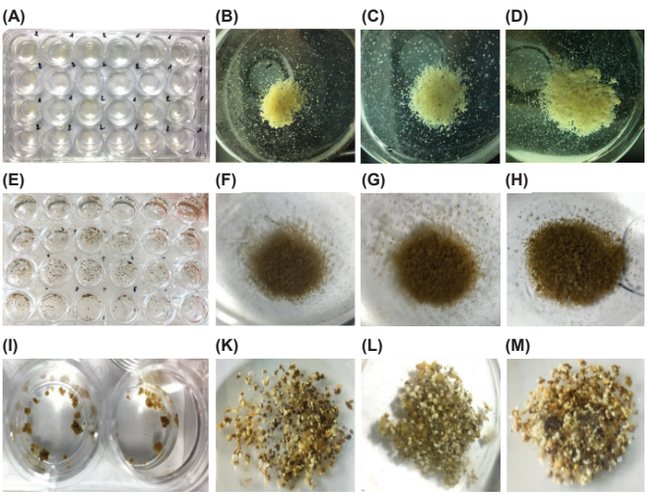


Hình 3. Hình ảnh mô sẹo phôi hóa và tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa của 2 giống cà phê H1 và H16 trên môi trường bổ sung các axit amin khác nhau. (A) Mô sẹo của giống H16 trên môi trường tạo mô sẹo phôi hóa T2, bổ sung Glycine 20 mg/l, sau 6 tháng nuôi cấy; **(B)** Mô sẹo phôi hóa của giống H16 được phân tách ngay sau khi chuyển sang môi trường nhân nhanh lỏng M; **(C, D)** Mô sẹo phôi hóa của giống H16 quan sát dưới kính hiển vi, 10X (C), 70X (D); **(E, F)** Tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa của 2 giống H1 và H16 trên các môi trường bổ sung các axit amin khác nhau. DC: đối chứng (môi trường T2 không bổ sung axit amin). Trong cùng một hình các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Đánh giá khả năng phôi hóa mô sẹo trên các môi trường thử nghiệm cho thấy, trên môi trường đối chứng T2 không bổ sung axit amin, tỷ lệ phôi hóa mô sẹo đạt 27,1 và 33,2%, tương ứng cho 2 giống H1 và H16. Trong khi đó, việc bổ sung các axit amin làm tăng tỷ lệ mô sẹo phôi hóa ở cả 2 giống thí nghiệm. Đối với môi trường bổ sung Proline, tỷ lệ phôi hóa đạt 43,7 và 45,7%, lần lượt ở giống H1 và H16. Trên môi trường chỉ bổ sung Glycine, tỷ lệ mô sẹo phôi hoá của giống H1 và H16 đều đạt 58,1%. Khi sử dụng kết hợp Proline và Glycine, tỷ lệ mô sẹo phôi hóa lần lượt là 48,5 và 48,1% ở 2 giống H1 và H16 (Hình 3E, 3F). Như vậy có thể thấy, sử dụng Glycine 20 mg/l hay Proline 20 mg/l đơn lẻ hoặc kết hợp đều mang lại hiệu quả tốt hơn trong việc tạo mô sẹo phôi hóa, tỷ lệ phôi hóa đạt cao nhất trên môi trường bổ sung Glycine 20 mg/l ở cả 2 giống nghiên cứu.

3.4. Đánh giá ảnh hưởng của bình nuôi cấy và mật độ nuôi cấy đến khả năng nhân phôi

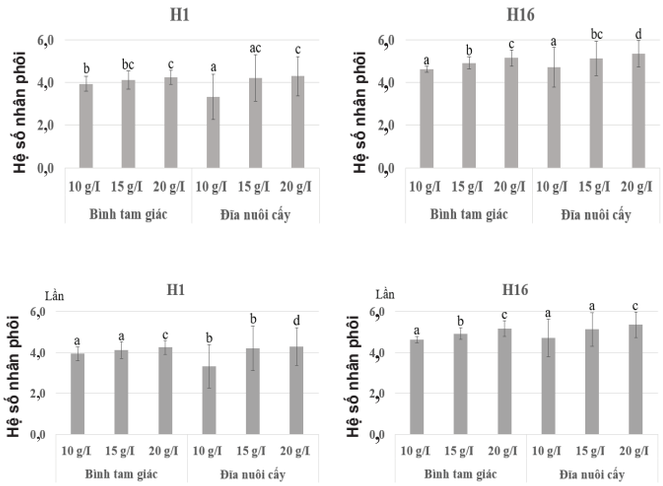
Các mô sẹo phôi hóa được chọn lọc và nuôi cấy trong môi trường nhân phôi lắc lỏng M, sử dụng bình tam giác 250 ml hoặc đĩa 24 giếng. Mật độ nuôi cấy 10, 15, 20 g/l mô sẹo (hình 4A-4D). Sau 3 tuần nuôi cấy, các tế bào chuyển sang màu nâu sẫm và bắt đầu nhân lên (hình 4E-4H). Sau 3 tháng nuôi cấy trong môi trường nhân nhanh M, các tế bào mới được hình thành và tăng lên về kích thước. Các tế bào mới có màu vàng hoặc vàng nhạt, có hoặc không bám vào các phôi màu nâu tối (hình 4I-4M).



Hình 4. Hình ảnh nhân nhanh phôi của giống cà phê H16 trong bình tam giác hoặc đĩa 24 giếng. (A, E, I) Phôi nuôi cấy trong đĩa 24 giếng lần lượt ở các thời điểm 0 ngày, 1 tháng và 3 tháng; **(B-D)** Phôi nuôi cấy trong bình tam giác ở thời điểm 0 ngày với các mật độ nuôi cấy 10 **(B)**, 15 **(C)** và 20 g/l **(D)**; **(F-H)** Phôi nuôi cấy trong bình tam giác sau 1 tháng nuôi cấy với các mật độ nuôi cấy 10 **(F)**, 15 **(G)** và 20 g/l **(H)**; **(K-M)** Phôi nuôi cấy trong bình tam giác sau 3 tháng nuôi cấy với các mật độ nuôi cấy 10 **(K)**, 15 **(L)** và 20 g/l **(M)**.

Phân tích kết quả cho thấy hiệu quả nhân nhanh của mô sẹo trong môi trường lắc lỏng có xu hướng tăng lên khi mật độ tế bào nuôi cấy càng cao ở cả 2 giống H1 và H16. Đối với giống H1, khi nuôi cấy trong bình tam giác 250 ml, hiệu quả nhân nhanh của mô sẹo phôi hóa đạt 3,94, 4,12 và 4,25 lần tương ứng với 3 nồng độ nuôi cấy tế bào 10, 15, 20 g/l, còn ở trong đĩa 24 giếng lần lượt là 3,32, 4,21 và 4,29 lần, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 2 nồng độ nuôi cấy 15 và 20 g/l ở cả 2 loại bình nuôi cấy. Ở giống H16, hiệu quả nhân nhanh mô sẹo phôi hóa 4,62, 4,92 và 5,16 lần trong bình

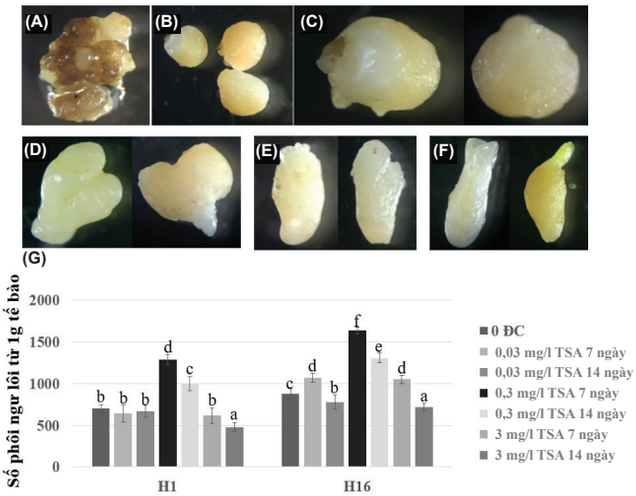
tam giác và 4,72, 5,12 và 5,35 lần khi sử dụng đĩa 24 giếng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mật độ nuôi cấy khi so sánh trong cùng bình nuôi cấy (hình 5)... Tuy nhiên, sử dụng đĩa 24 giếng đòi hỏi nhiều thao tác và khả năng lây nhiễm cao hơn. Việc nhân nhanh các mô sẹo phôi hóa trong bình tam giác 250 ml có thể áp dụng với quy mô lớn hơn mà không làm giảm hiệu quả tăng sinh và tạo phôi.



Hình 5. Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy và bình nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh phôi của 2 giống cà phê H1 và H16. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05 trong cùng một giống.

3.5. Đánh giá ảnh hưởng của chất ức chế tăng sinh tế bào TSA đến sự phân hóa phôi

Sau quá trình nhân nhanh, các tế bào được chuyển sang môi trường phân hóa phôi DIF có bổ sung TSA, chất được biết đến là có khả năng ức chế sự tăng sinh của các tế bào và thúc đẩy quá trình biệt hóa của tế bào [14]. Tiến hành thử nghiệm 3 nồng độ TSA khác nhau: 0,03, 0,3, 3 mg/l bổ sung vào môi trường nuôi cấy DIF trong thời gian 7 ngày và 14 ngày đầu nuôi cấy, mật độ nuôi cấy phôi 1 g/l, sau đó phôi được tiếp tục nuôi cấy trong môi trường DIF có TSA. Sau 3 tuần đầu tiên, hỗn hợp tế bào nuôi cấy chuyển màu từ nâu sang vàng hoặc vàng nhạt, quan sát dưới kính hiển vi thấy các tế bào phát triển thành các phôi hình cầu (hình 6A-6C). Ba tuần tiếp theo các phôi hình tim được hình thành, với kích thước lớn hơn và hầu hết có màu vàng sáng hoặc vàng trắng (hình 6D). Sau một tháng nuôi cấy trong môi trường DIF, các phôi tiếp tục phân hóa sang dạng phôi ngư lôi với 2 cụm mô phân sinh phình to và tách biệt từ một đầu, trục phôi kéo dài hơn và có màu tối hơn (hình 6E). Đến cuối giai đoạn phân hóa, 2 lá mầm đã hình thành từ 2 cụm mô phân sinh và chuyển dần từ màu vàng trắng sang màu xanh nhạt, trục phôi to hơn và có màu vàng sẫm hơn hoặc vàng xanh (hình 6F).

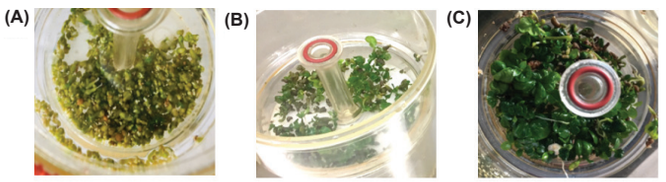


Hình 6. Qúa trình phân hóa của phôi và ảnh hưởng của chất ức chế tăng sinh tế bào TSA đến khả năng tạo phôi ngư lôi ở 2 giống cà phê H1 và H16. (A-F) Hình ảnh biệt hóa của phôi H16 trong môi trường DIF bổ sung TSA 0,3 mg/l với thời gian xử lý 7 ngày. A: phôi tế bào H16 thời điểm bắt đầu nuôi cấy; B, C: phôi có dạng hình cầu sau 3 tuần nuôi quan sát dưới kính hiển vi 1X (B) và 4X (C); D: phôi có dạng hình tim sau 3 tháng nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi 1X; E: phôi ngư lôi với 2 cụm mô phân sinh phình to và tách biệt từ một đầu sau 4 tháng nuôi cấy; F: phôi tái sinh lá mầm hình thành từ 2 cụm mô phân sinh; G: số phôi ngư lôi từ 1 g tế bào ở các công thức bổ sung nồng độ TSA khác nhau sau 3 tháng nuôi cấy. Thước: 1 mm. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05 trong cùng một giống.

Kết quả cho thấy, việc bổ sung TSA trong thời gian ngắn 7 ngày có tác động tốt hơn đến quá trình biệt hóa của phôi so với thời gian xử lý 14 ngày. Tương tự việc tăng nồng độ TSA cũng có xu hướng làm giảm số lượng phôi ngư lôi tạo ra ở cả 2 giống nghiên cứu (hình 6G). Cụ thể, bổ sung TSA ở nồng độ thấp 0,03 mg/l ở cả 2 thời điểm xử lý hầu như không gây ra sự thay đổi có ý nghĩa thống kê về số lượng phôi ngư lôi tạo ra so với môi trường đối chứng không bổ sung TSA đối với cả 2 giống H1 (699 phôi) và H16 (879 phôi). Khi tăng nồng độ TSA lên 0,3 mg/l, số phôi ngư lôi tạo ra đã tăng lên đạt 1287 (thời gian xử lý 7 ngày) và 998 phôi (thời gian xử lý 14 ngày) đối với giống H1 và 1635 và 1306 phôi đối với giống H16. Tuy nhiên, ở nồng độ TSA 3 mg/l, số phôi ngư lôi tạo ra đã giảm xuống còn 614 và 487 phôi đối với giống H1 và 1051 và 717 đối với giống H16 (hình 6G). Như vậy bổ sung TSA 0,3 mg/l trong 7 ngày đầu nuôi cấy phôi trong môi trường biệt hóa DIF mang lại hiệu quả tạo phôi ngư lôi tốt nhất cho cả 2 giống H1 và H16. Kết quả này cũng đã được kiểm chứng ở các giống *Arabica*, việc đáp ứng TSA trong thời gian ngắn (7 ngày) làm tăng khả năng phân hóa phôi soma của các giống *Arabica* lên gấp 3 lần, đạt gần 10000 phôi ngư lôi từ 1g phôi ban đầu [14].

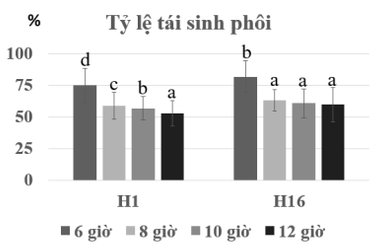
3.6. Đánh giá ảnh hưởng của chu kỳ sục khí đến sự tái sinh phôi trong bình RITA 1L.

Các phôi ngư lôi được chuyển sang tái sinh trong trong Bioreactor RITA 1L, sử dụng môi trường DEV (MS + cysteine 10 mg/l + đường 30 g/l + BAP 0,5 mg/l). Sau 1 tháng nuôi cấy, phôi phát triển 2 lá mầm rõ ràng có màu xanh đậm (hình 7A). Sau 2 tháng, 2 lá mầm tăng lên về kích thước, trục phôi kéo dài ra và có màu xanh nhạt (hình 7B). Cuối giai đoạn tái sinh, có thể quan sát được cây non với một cặp lá thật màu xanh đậm, thân được hình thành từ trục phôi có màu xanh nhạt hơn và có thể xuất hiện rễ giả màu trắng (Hình 7C).



Hình 7. Hình ảnh tái sinh từ phôi của giống H16 trong Bioreactor RITA 1L. Phôi tái sinh trong môi trường tái sinh DEV với tần suất ngập 1 phút/6 giờ, sau thời gian nuôi cấy: 1 tháng (A), 2 tháng (B) và 3 tháng (C).

Với việc tái sinh phôi trong môi trường bán ngập chìm, tần suất ngập là một trong những yếu tố quan trọng tác động trực tiếp đến sự tái sinh. Khi tần số ngập quá lớn có thể làm tăng tốc độ tái sinh nhưng cũng làm tăng tỷ lệ úng cây non, tần số ngập quá nhỏ lại làm giảm hiệu quả tái sinh và kéo dài thời gian tái sinh. Đánh giá các tần số ngập 1 phút mỗi 6, 8, 10 và 12 giờ cho thấy, 2 giống cà phê nghiên cứu thể hiện sự đáp ứng tốt hơn trong điều kiện ngập 1 phút mỗi 6 giờ với tỷ lệ tái sinh đạt 75,02 và 82,03% tương ứng ở H1 và H16 (hình 8). Trong khi đó, với tần suất ngập mỗi 1 phút trong 8 giờ, tỷ lệ tái sinh phôi là 59,04% và 63,45% lần lượt ở H1 và H16. Kết quả ghi nhận khi tần suất ngập 1 phút mỗi 10 giờ, tỷ lệ tái sinh ở H1 và H16 giảm còn 57,04% và 60,87%; tỷ lệ này chỉ còn 52,89% và 59,98% tương ứng khi tần suất ngập 1 phút/12 giờ. Như vậy, việc tăng tần suất bán ngập chìm lên 1 phút mỗi 6 giờ cho tỷ lệ tái sinh phôi cao nhất đối với cả 2 giống H1 và H16.

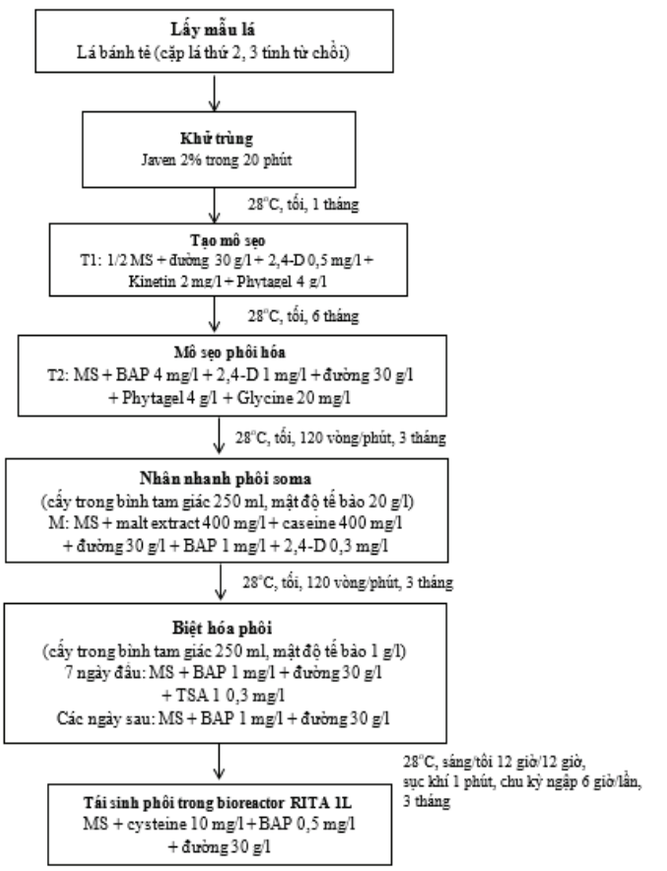


Hình 8. Hiệu quả tái sinh của phôi trong Bioreactor RITA 1L. Tỷ lệ tái sinh của phôi giống H1 và H16 trong các tần suất bán ngập chìm khác nhau 1 phút mỗi 6, 8, 10 và 12 giờ mỗi phút. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05 trong cùng một giống.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã hoàn thiện quy trình nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 H1 và H16 bằng công nghệ Bioreactor. Kết quả thu được cụ thể như sau: sử dụng chất điều hòa sinh trưởng Kinetin 2 mg/l và chất làm đặc Phytagel 4 g/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 94,2 và 92,1% ở 2 giống H1 và H16 tương ứng; bổ sung axit amin Glycine 20 mg/l vào môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa đạt 58,1% ở cả 2 giống; nuôi cấy các phôi cà phê với mật độ 20 g/l trong bình tam giác 250 ml cho hệ số nhân phôi là 4,25 và 5,16 lần tương ứng ở H1 và H16. Đánh giá ảnh hưởng của TSA trong quá trình biệt hóa phôi cho thấy bổ sung TSA 0,3 mg/l trong 7 ngày đầu nuôi cấy cho số lượng phôi ngư lôi tạo ra cao nhất là gần 1287 và 1635 phôi ngư lôi/g phôi nuôi cấy ban đầu với giống H1 và H16; hiệu quả tái sinh phôi ngư lôi của 2 giống đạt được tốt nhất trên môi trường DEV khi nuôi cấy trong Bioreactor với tần suất ngập 1 phút mỗi 6 giờ, cho tỷ lệ tái sinh cây đạt 75,02 và 82,03%, tương ứng với giống H1 và H16.

Sơ đồ tóm tắt quy trình nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 H1 và H16 được thể hiện ở hình 9.



Hình 9. Quy trình nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 H1 và H16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P. Lashermes, B. Bertrand, H. Etienne (2009), "Breeding coffee (*Coffea arabica*) for sustainable production", *Breeding Plantation Tree Crops*: *Tropical Species*, pp.525-543.

[2] H.V.D. Vossen, B. Bertrand, A. Charrier (2015), "Next generation variety development for sustainable production of *Arabica* coffee (*Coffea arabica* L.): A review", *Euphytica*, **204**, pp.243-256, DOI: 10.1007/s10681-015-1398-z.

[3] H. Etienne, D. Breton, J.C. Breitler, et al. (2018), "Coffee somatic embryogenesis: How did research, experience gained and innovations promote the commercial propagation of elite clones from the two cultivated species?", *Front. Plant Sci.*, **9**, DOI: 10.3389/fpls.2018.01630.

[4] G. Staritsky (1970), "Embryoid formation in callus tissues of coffee", *Acta Bot. Neerl.*, **19(4)**, pp.509-514, DOI: 10.1111/j.1438-8677.1970.tb00677.x.

[5] M.R. Söndahl, W.R. Sharp (1977), "High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffee Arabica*", *Z. Plazenphysiol.*, **81(5)**, pp.395-408, DOI: 10.1016/S0044-328X(77)80175-X.

[6] E.S. Pierson, A.A.M.V. Lammern, H.N. Schel, et al. (1983), "*In vitro* development of embryoids from punched leaf dishes of *Coffea canephona*", *Protoplasma*, **115**, pp.208-216, DOI: 10.1007/BF01279811.

[7] P. Dublin (1981), "Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de cafeier arabusta", *Café Cacao*, **25(4)**, pp.237-242.

[8] A.M.G. Arias, G.A. Espinoza, A.M.E. Esquivel (2008), "Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimization of genetic transformation in *Coffea Arabica* L. cvs. caturra and catuaí", *Electron. J. Biotech.*, **11(1)**, pp.1-11, DOI: 10.2225/vol11-issue1-fulltext-9.

[9] M.S. Padua, L.V. Paiva, L.C. Silva, et al. (2014), "Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli", *Ciênc. Rural*, **44(4)**, pp.660-665.

[10] A.T. Silva, D. Barduche, K.G. Livramento, et al. (2014), "Characterization of a putative serk-like ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L.", *Plant Mol. Biol. Rep.*, **32**, pp.176-184, DOI: 10.1007/s11105-013-0632-x

[11] F. Ardiyani, E.S.W. Utami, H. Purnobasuki, et al. (2020), "Development and regeneration of somatic embryos from leaves-derived calli of *Coffea liberica*", *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **21(12)**, pp.5829-5834, DOI: 10.13057/biodiv/d211246.

[12] M.S.D. Ibrahim, C. Tresniawati (2020), "Evaluation of *Arabica* coffee propagation using cell suspension culture", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **418(1)**, pp.1-8, DOI: 10.1088/1755-1315/418/1/012013.

[13] K. Boutilier, R. Offringa, V.K. Sharma, et al. (2002), "Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth", *Plant Cell*, **14(8)**, pp.1737-1749, DOI: 10.1105/tpc.001941.

[14] R. Awada, D. Verdier, S. Froger, et al. (2020), "An innovative automated active compound screening system allows high-throughput optimization of somatic embryogenesis in *Coffea Arabica*", *Scientific Reports*, **10**, DOI: 10.1038/s41598-020-57800-6.

[15] H. Etienne, B. Bertrand, F. Anthony, et al. (1997), "L'embryogenèse somatique: Un outil pour l'amélioration génétique du caféier," *Proceedings of The 17th Colloquium of International Coffee Science Association*, pp.457-465.

[16] J. Albarrán, B. Bertrand, M. Lartaud, et al. (2005), "Cycle characteristics in a temporary immersion Bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **8**, pp.27-36, DOI: 10.3389/fpls.2022.994578.

[17] N.T. Hau, T.V. Minh (2013), "Micropropagation of coffee (*Coffea robusta*) by somatic embryogenesis techniques", *National Conference on Biotechnology 2023* (in Vietnamese).

[18] N.T. Mai, V. Phan, T.V. Tan, et al. (2016), "Study on *in vitro* propagation of some selected *Coffea canephora* clones via callus and somatic embryogenesis", *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **1(13)**, pp.100-103 (in Vietnamese).

[19] N.V. Thuong, T.T.H. Anh, N.V. Phuong, et al. (2017), "Callus formation to reproduce somatic embryos of arabica coffee cultivar TN1", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **59(10)**, pp.37-40 (in Vietnamese).

[20] N. Das, N. Tripathi, S. Basu, et al. (2015), "Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms", *Front. Microbial.*, **6**, DOI: 10.3389/fmicb.2015.00698.

[21] A. Amer, H. Omar (2019) "*In vitro* propagation of the multipurpose Egyptian medicinal plant Pimpinella anisum", *Egypt. Pharm. J.*, **18(3)**, pp.254-262.

[22] P. Venkataiah, P. Bhanuprakash, K.S. Suman, et al. (2016), "Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L.", *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **14(1)**, pp.55-60, DOI: 10.1016/j.jgeb.2016.02.001.

[23] P.A. Scherer, E. Muller, H. Lippert (1988), "Multielement analysis of agar and Gelrite impurities investigated by inductively coupled plasma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or the gellan gum Gelrite", *Acta Hortic.*, **226(91)**, pp.655-658, DOI: 10.17660/ActaHortic.1988.226.91.

[24] M. Welander, G. Maheswaran (1992), "Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks", *J. Plant Physiol.*, **140(2)**, pp.223-228, DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80939-9.

[25] T. Ichi, T. Koda, L. Asai (1986), "Effects of gelling agents on *in vitro* culture of plant tissues", *Agric. Biol. Chem.*, **50(9)**, pp.2397-2399, DOI: 10.1080/00021369.1986.10867756.

[26] L.C. Huang, D.L. Chi (1988), "Pivotal roles of picloram and gelrite in banana callus culture", *Environ. Exp. Bot.*, **28(3)**, pp.249-258, DOI: 10.1016/0098-8472(88)90035-4.