

Ảnh hưởng của 2,4D và kiểu cắt lớp mỏng tế bào đến sự hình thành và phát triển mô sẹo ở cây gấc (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng)

Trần Nguyên Chất, Bùi Minh Trí, Phạm Đức Toàn*

Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường
Trường Đại học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 12/1/2017; ngày chuyển phản biện 16/1/2017; ngày nhận phản biện 15/2/2017; ngày chấp nhận đăng 24/2/2017

Tóm tắt:

Gấc có tên khoa học là *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng., (2n=28), thuộc họ bầu bí (Cucurbitaceae), có nguồn gốc ở các nước Đông Nam Á và Ấn Độ. Gấc được dùng như thực phẩm và dược liệu ở Việt Nam cũng như các nước Đông Nam Á. Trong dầu gấc có chứa nhiều chất như β -carotene, tiền vitamin A, lycopene và các acid béo không bão hòa. Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát sự ảnh hưởng của 2,4D và kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL) đến sự hình thành mô sẹo của cây gấc trong nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy sau 21 ngày nuôi cấy, tất cả các kiểu cắt lớp mỏng đều hình thành mô sẹo. Tuy nhiên ở kiểu cắt ngang kết hợp với nồng độ 2,4D ở mức 1,5 mg/l có khả năng hình thành, phát triển và cho chất lượng mô sẹo tốt nhất. Kết quả thu được sẽ là những thông tin hữu ích giúp cho công tác nhân giống và cải tiến giống gấc đạt hiệu quả tốt trong tương lai.

Từ khóa: Gấc, *in vitro*, momordica, mô sẹo, lớp mỏng tế bào (TCL).

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Gấc có tên khoa học là *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng., (2n=28), thuộc họ bầu bí (Cucurbitaceae), có nguồn gốc ở các nước Đông Nam Á và Ấn Độ. Gấc được dùng như thực phẩm và dược liệu ở Việt Nam cũng như các nước Đông Nam Á. Gấc là cây có hàm lượng dầu và các acid béo rất tốt cho sức khỏe [1]. Hàm lượng β -carotene, lycopene trong quả gấc rất cao và có hoạt chất sinh học vượt trội so với nhiều loại thực phẩm khác nhờ sự hiện diện của một số acid béo chỉ có trong thành phần của quả gấc [2]. Tuy nhiên, gấc là loại cây đơn tính, có cây đực và cây cái riêng, trồng bằng hạt sau một thời gian mới xác định được cây đực hay cây cái, cây đực thì không cho quả nên sẽ làm tốn thời gian và chi phí nếu tạo giống bằng con đường hữu tính [3]. Chính vì vậy nghiên cứu nhân giống bằng con đường vô tính có một tiềm năng rất lớn. Các kỹ thuật nuôi cấy trong nuôi cấy mô tế bào thực vật luôn được phát triển nhằm mang lại hiệu quả tối ưu trong nghiên cứu và sản xuất. Lớp mỏng tế bào có được các ưu điểm là phản ứng nhanh với môi trường, biệt hóa nhanh và tái sinh cây đồng nhất. Nhiều nghiên cứu sử dụng lớp mỏng tế bào đã được thực hiện trên nhiều loài thực vật khác nhau, đặc biệt là giống cây trồng khó tái sinh khi nuôi cấy *in vitro* như các loài cây

ngũ cốc, cây thân gỗ [4]. Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp kiểu cắt lớp mỏng tế bào và nồng độ 2,4D trong quá trình hình thành mô sẹo. Qua đó, xác định kiểu lớp mỏng tế bào và nồng độ 2,4D phù hợp cho sự hình thành mô sẹo có kích thước và chất lượng tốt nhất cho công tác nhân giống cũng như sản xuất sinh khối từ mô sẹo của cây gấc phục vụ cho công tác cải tiến và nhân giống.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguồn mẫu và cách thức cắt lớp mỏng

Đoạn thân cây gấc *in vitro* được cắt thành các lát mỏng kiểu cắt ngang và cắt dọc. Các mẫu cắt ngang có đường kính khoảng 3-5 mm và dày khoảng 0,5-1 mm, các mẫu cắt dọc có chiều dài khoảng 3-5 mm và dày 0,5-1 mm.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường dùng trong các thí nghiệm tạo mô sẹo là môi trường MS [5] được bổ sung 30 g/l đường sucrose và 8 g/l agar, 2,4D với các nồng độ lần lượt là 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l. Môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 rồi hấp khử trùng trong 20 phút ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm và bảo quản để ở nhiệt độ phòng 3 ngày trước khi cấy. Mẫu cấy tạo sẹo được đặt trong đĩa petri có chứa 20 ml

*Tác giả liên hệ: Email: phamductoan@hcmuaf.edu.vn

Influence of 2,4D and thin cell layer types on callus induction of

Momordica cochinchinensis (Lour.) Spreng

Nguyen Chat Tran, Minh Tri Bui, Duc Toan Pham*

Research Institute for Biotechnology and Environment
Nong Lam University Ho Chi Minh City

Received 12 January 2017; accepted 24 February 2017

Abstract:

Gac (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng., (2n=28), belongs to the Cucurbitaceae. It originates from India and Southeast Asia. Gac has been used for food and pharmaceutical purposes in Vietnam as well as other countries in Southeast Asia. Gac oil contains high amounts of β -carotene, vitamin A, lycopene, and unsaturated fatty acid. The purpose of this study was to observe the influence of 2,4D and thin cell layer types on callus formation in the Gac *in vitro* culture. The results showed that all of the samples had formed calluses after 21 days of culture. However, the results indicated that the best callus formation, development, and structure obtained when the transverse thin cell layer (tTCL) of Gac was treated with 1.5 mg/l of 2,4D. This result could be useful for the propagation of Gac and improvement of Gac varieties in future.

Keywords: Callus, Gac, *in vitro*, momordica, thin cell layer (TCL).

Classification number: 1.6

môi trường. Thí nghiệm hai yếu tố là kiểu cắt lớp mỏng tế bào (cắt dọc và cắt ngang) và nồng độ 2,4D (0,5; 1; 1,5; 2 mg/l), được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi thí nghiệm 3 đĩa petri, mỗi đĩa petri chứa 5 mẫu cấy. Tổng số mẫu cấy trong thí nghiệm là 360 mẫu. Các thí nghiệm được đặt trong phòng tăng trưởng ở nhiệt độ ổn định $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối $70 \pm 10\%$. Các thí nghiệm được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn để tạo sẹo. Các số liệu được tổng hợp, xử lý và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel 2007 và SAS 9.1.

Kết quả và thảo luận

Chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin thường cần thiết cho việc tạo mô sẹo từ mẫu cấy. Việc sử dụng auxin có khả năng thay đổi cơ bản chương trình di truyền sinh lý học sẵn có của toàn bộ mô thực vật. Các tế bào

phản ứng với auxin và quay lại giai đoạn biệt hóa và bắt đầu phân chia. Auxin thường được dùng nhiều nhất cho bắt đầu hình thành mô sẹo là 2,4D. Các thí nghiệm tạo mô sẹo của cây lá rộng thường dùng 2,4D ở nồng độ từ 5-15 μM [6]. Hình thức, kích thước, thời kỳ và loại mẫu cấy được chọn cũng có ảnh hưởng rất lớn tới việc thành công của cả quá trình nuôi cấy. Thông thường sẽ có một kích thước mẫu tối ưu cho việc nuôi cấy mô thực vật, mẫu quá nhỏ sẽ không sống sót tốt trong nuôi cấy, trong khi mẫu quá lớn sẽ khó trong thao tác và dễ bị nhiễm khuẩn.

Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và kiểu cắt lát mỏng đến tỷ lệ hình thành và đường kính mô sẹo từ lớp mỏng tế bào của cây gấc *in vitro*

Các mô khác nhau trên cùng một cây có thể ở mức độ biểu hiện thông tin di truyền khác nhau. Các mô này có thể cho các mô sẹo phát triển khác nhau với khả năng tái sinh chồi, rễ hay cây hoàn chỉnh rất khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy các thí nghiệm đều đạt tỷ lệ hình thành mô sẹo 100% sau 21 ngày nuôi cấy. Kết quả này phù hợp với kết quả khi tiến hành thí nghiệm trên mẫu đốt thân cây gấc kích thước từ 0,5-1 cm ở mức nồng độ 2,4D là 2 mg/l [7]. Mô sẹo hình thành đã được đánh giá bằng nhiều chỉ tiêu để xác định được kiểu lát mỏng và nồng độ 2,4D phù hợp. Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy, xét về yếu tố kiểu lát mỏng thì kiểu cắt dọc cho đường kính mô sẹo lớn nhất, xét về yếu tố nồng độ thì nồng độ 2,4D ở mức 1,5 mg/l cho đường kính lớn nhất. Xét về mặt thống kê có 4 thí nghiệm cho đường kính mô sẹo lớn nhất là T1A3, T2A2, T2A3, T2A4.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và kiểu cắt lát mỏng đến đường kính mô sẹo sau 21 ngày nuôi cấy.

ĐVT: cm

Kiểu cắt TCL	Nồng độ 2,4D (mg/l)				Trung bình theo kiểu cắt lớp mỏng
	A1 (0,5 mg)	A2 (1,0 mg)	A3 (1,5 mg)	A4 (2 mg)	
T1 (cắt ngang)	0,80bc	0,75c	1,06a	0,90b	0,88B
T2 (cắt dọc)	0,77bc	1,07a	1,17a	1,12a	1,03A
Trung bình theo nồng độ 2,4D	0,79D	0,91C	1,12A	1,01B	
	$F_A: 44,18^{**}$	$F_B: 35,18^{**}$	$F_{AB}: 10,28^{**}$	CV (%): 5,98	

Các chữ theo sau khác nhau thì có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê.

** : khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.

Ở kiểu lát mỏng cắt ngang, mức 2,4D 1,5 mg/l tạo được đường kính mô sẹo lớn nhất, kể đến là ở mức 2,4D 2,0 mg/l, 0,5 mg/l và 1 mg/l. Tương tự, ở kiểu lát mỏng cắt dọc, mức 2,4D 1,5 mg/l cho đường kính mô sẹo lớn nhất, tiếp đến là ở các mức 2,0 mg/l, 1 mg/l và cuối cùng là mức 2,4D 0,5 mg/l. Ở cả 2 kiểu cắt, kết quả cho thấy đường kính mô sẹo nhỏ nhất ở mức 2,4D 0,5 mg/l và 1 mg/l, tăng cao nhất ở mức 2,4D 1,5 mg/l và bắt đầu giảm ở mức 2,4D 2 mg/l, có thể do nồng độ 2,4D cao bắt đầu ức chế khả năng tăng đường kính của mô sẹo lớp mỏng tế bào của cây gấc. Qua kết quả có thể nhận định rằng nồng độ 2,4D 1,5 mg/l ở cả 2 kiểu cắt đều cho đường kính mô sẹo tạo thành lớn nhất trong thí nghiệm.

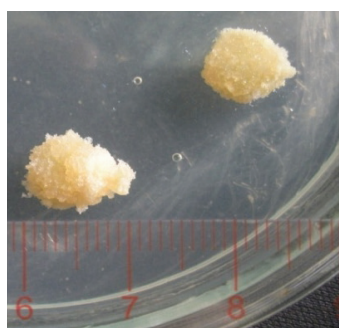
Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và kiểu cắt lát mỏng đến hình thái và màu sắc mô sẹo lớp mỏng tế bào của cây gấc in vitro

Mô sẹo hình thành phải đảm bảo khả năng tái sinh chồi cao, vì vậy các chỉ tiêu chất lượng mô sẹo về hình thái, màu sắc và khối lượng là rất cần thiết để đánh giá và chọn loại mô sẹo cho thí nghiệm phát sinh chồi. Mô sẹo có hình thái và màu sắc bên ngoài thành khối, cứng, chắc, màu vàng xanh có khả năng tái sinh chồi tốt hơn mô sẹo rời rạc, xốp, mềm, dễ vỡ, màu trắng sữa (hình 1).

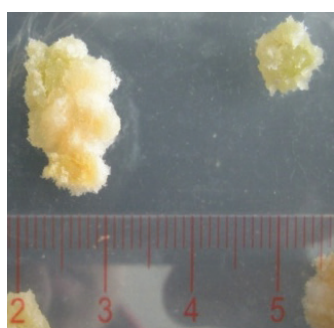
Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và kiểu cắt lát mỏng đến hình thái và màu sắc mô sẹo sau 21 ngày nuôi cấy.

Kiểu cắt TCL	Nồng độ 2,4D (mg/l)	Hình thái và màu sắc
T1 (cắt ngang)	A1 (0,5 mg)	Thành khối, cứng, chắc, màu vàng nhạt
	A2 (1,0 mg)	Thành khối, cứng, chắc, màu vàng xanh
	A3 (1,5 mg)	Thành khối, cứng, chắc, màu vàng xanh
	A4 (2,0 mg)	Xốp, mềm, dễ vỡ, màu trắng sữa
T2 (cắt dọc)	A1 (0,5 mg)	Thành khối, cứng, chắc, màu vàng nhạt
	A2 (1,0 mg)	Xốp, mềm, dễ vỡ, màu trắng sữa
	A3 (1,5 mg)	Xốp, mềm, dễ vỡ, màu trắng sữa
	A4 (2,0 mg)	Xốp, mềm, dễ vỡ, màu trắng sữa

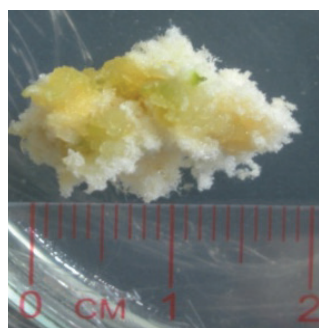
Ở các nghiệm thức kiểu lát mỏng cắt dọc, T2A2 (cắt dọc, 2,4D 1,0 mg/l), T2A3 (cắt dọc, 2,4D 1,5 mg/l), T2A4 (cắt dọc, 2,4D 2,0 mg/l) đều cho chất lượng mô sẹo không tốt, mô sẹo xốp, mềm, dễ vỡ. Tuy nhiên, nghiệm thức T2A1 (cắt dọc, 2,4D 0,5 mg/l) cho mô sẹo có chất lượng tốt, mô sẹo thành khối, cứng, chắc có màu vàng nhạt. Kết quả này cho thấy, ở kiểu cắt dọc mô sẹo hình



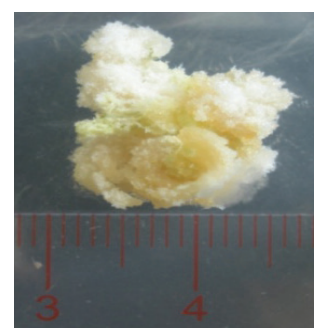
T1: 2,4D 0,5 mg/l



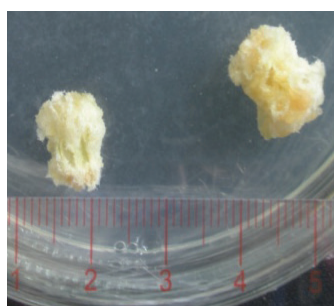
T1: 2,4D 1 mg/l



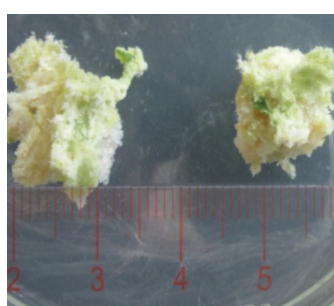
T1: 2,4D 1,5 mg/l



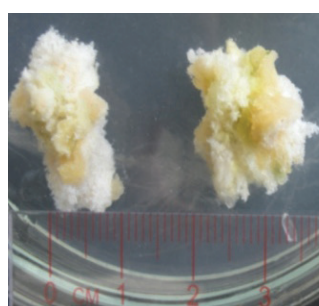
T1: 2,4D 2 mg/l



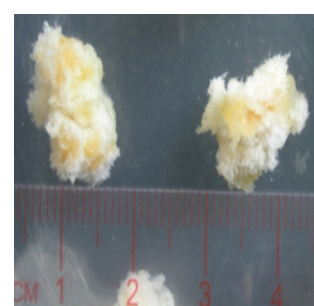
T2: 2,4D 0,5 mg/l



T2: 2,4D 1 mg/l



T2: 2,4D 1,5 mg/l



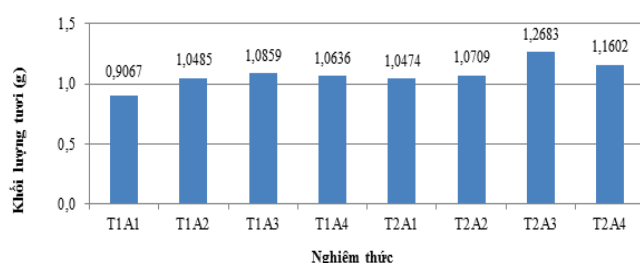
T2: 2,4D 2 mg/l

Hình 1. Mô sẹo hình thành từ tế bào lớp mỏng cắt ngang (T1) và cắt dọc (T2) ở thời điểm 21 ngày sau nuôi cấy.

thành có chất lượng tốt ở nghiệm thức T2A1 có nồng độ 2,4D thấp nhất 0,5 mg/l, ở các nghiệm thức T2A2, T2A3, T2A4 có nồng độ 2,4D cao hơn (1,0 mg/l, 1,5 mg/l, 2,0 mg/l) đều cho chất lượng mô sẹo kém, điều này thể hiện nồng độ 2,4D cao tác động lên các mẫu cắt dọc làm cho mô sẹo chất lượng kém và ít có khả năng tái sinh chồi. Ở các nghiệm thức kiểu lát mỏng cắt ngang T1A4 (cắt ngang, 2,4D 2,0 mg/l) cho chất lượng mô sẹo không tốt, mô sẹo xốp, mềm, dễ vỡ; nghiệm thức T1A1 (cắt ngang, 2,4D 0,5 mg/l) cho mô sẹo có hình thái giống với nghiệm thức T2A1 (cắt dọc, 2,4D 0,5 mg/l) cho mô sẹo thành khối, cứng, chắc, màu vàng nhạt; 2 nghiệm thức T1A2 (cắt ngang, 2,4D 1,0 mg/l) và T1A3 (cắt ngang, 2,4D 1,5 mg/l) cho mô sẹo có chất lượng tốt nhất trong thí nghiệm này, mô sẹo thành khối, cứng, chắc, có màu vàng xanh. Kết quả ở kiểu cắt ngang, mô sẹo hình thành có chất lượng tốt ở nghiệm thức T1A2, T1A3 và chất lượng rất kém ở mức nồng độ 2,4D 2,0 mg/l. Kết quả cũng ghi nhận ở cả 2 kiểu cắt ngang và cắt dọc cho thấy, nồng độ 2,4D có tương quan tỷ lệ với chất lượng mô sẹo, nồng độ 2,4D càng cao làm cho mô sẹo hình thành có chất lượng thấp.

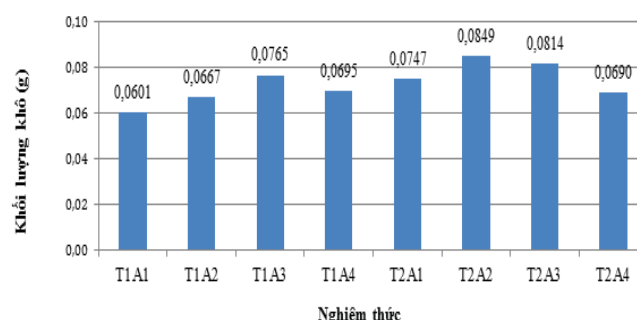
Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và kiểu cắt lát mỏng đến khối lượng tươi, khối lượng khô và tỷ lệ chất khô của mô sẹo từ lớp mỏng tế bào cây gấc in vitro sau 21 ngày nuôi cấy

Ngoài chỉ tiêu đường kính, hình thái và màu sắc của mô sẹo đã được trình bày, chỉ tiêu khối lượng tươi, khối lượng khô và phần trăm tỷ lệ chất khô cũng được khảo sát nhằm đánh giá chất lượng mô sẹo. Aghaei và cs (2013) [8] đã nghiên cứu trên loài *Pistacia atlantica* chỉ ra rằng, nồng độ cũng như sự kết hợp của các chất điều hoà sinh trưởng thực vật khác nhau ảnh hưởng đến khả năng hình thành, khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo. Tương tự, Tran Thanh Van và cs (1974) [9] đã chỉ ra sự khác biệt về dạng mẫu nuôi cấy, tỷ lệ chất điều hoà sinh trưởng cũng ảnh hưởng tới sự hình thành chồi trên cây thuốc lá trong nuôi cấy *in vitro*.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và kiểu cắt lát mỏng đến khối lượng tươi của mô sẹo sau 21 ngày nuôi cấy.

Khối lượng tươi mô sẹo ở các nghiệm thức có sự biến động, các nghiệm thức có chỉ số cao nhất lần lượt là T2A3 (cắt dọc, 2,4D 1,5 mg/l), T2A4 (cắt dọc, 2,4D 2,0 mg/l), T1A3 (cắt ngang, 2,4D 1,5 mg/l), T2A2 (cắt dọc, 2,4D 1,0 mg/l) (hình 2). Các nghiệm thức này tương ứng với 4 nghiệm thức có đường kính mô sẹo lớn nhất và 2 nghiệm thức có khối lượng tươi thấp nhất là T1A1 (cắt ngang, 2,4D 0,5 mg/l), T2A1 (cắt dọc, 2,4D 0,5 mg/l), cũng đồng thời là 2 nghiệm thức có đường kính thấp (bảng 1). Kết quả thể hiện khối lượng tươi và đường kính mô sẹo tỷ lệ thuận với nhau.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và kiểu cắt lát mỏng đến khối lượng khô của mô sẹo sau 21 ngày nuôi cấy.

Kết quả cho thấy, nghiệm thức có khối lượng khô theo thứ tự từ cao tới thấp là T2A2 (cắt dọc, 2,4D 1,0 mg/l) với 0,0849 g, T2A3 (cắt dọc, 2,4D 1,5 mg/l) với 0,0814 g, T1A3 (cắt ngang, 2,4D 1,5 mg/l) với 0,0765 g, T2A1 (cắt dọc, 2,4D 0,5 mg/l), nghiệm thức thấp nhất là T1A1 (cắt ngang, 2,4D 0,5 mg/l), T1A2 (cắt ngang, 2,4D 1,0 mg/l) và T2A4 (cắt dọc, 2,4D 2,0 mg/l), T1A4 (cắt ngang, 2,4D 2,0 mg/l) (hình 3). Khối lượng khô của các nghiệm thức ở nồng độ 2,4D cao nhất (2,0 mg/l) ở cả 2 kiểu cắt đều cho khối lượng khô nhỏ, trong khi nồng độ 2,4D 1,5 mg/l ở cả 2 kiểu cắt lại cho khối lượng khô lớn nhất, nhì. Khối lượng khô tăng dần từ nồng độ 2,4D 0,5 mg/l đến 1,5 mg/l, sau đó giảm ở mức 2,0 mg/l, điều này có thể khối lượng chất khô tăng giảm theo đường kính và khối lượng tươi.

Kết quả thể hiện tỷ lệ chất khô của các lớp mỏng cắt ngang và cắt dọc không có sự khác biệt về thống kê, tương tự cũng không có sự khác biệt về thống kê giữa các mức nồng độ 2,4D (bảng 3). Nhưng các nghiệm thức có tương tác với nhau và khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$. Ở chỉ tiêu này, nghiệm thức lớp mỏng cắt dọc, 2,4D 1,0 mg/l có tỷ lệ chất khô ở cao nhất (7,93%), nghiệm thức lớp mỏng cắt dọc, 2,4D 2,0 mg/l có tỷ lệ chất khô thấp nhất (5,96%), các nghiệm thức còn lại không có

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và kiểu cắt lát mỏng đến tỷ lệ chất khô mô sẹo sau 21 ngày nuôi cấy.

ĐVT: %

Kiểu cắt TCL (Yếu tố A)	Nồng độ 2,4D (mg/l) (Yếu tố B)				Trung bình A
	A1 (0,5 mg)	A2 (1,0 mg)	A3 (1,5 mg)	A4 (2 mg)	
T1 (cắt ngang)	6,66ab	6,37ab	7,07ab	6,54ab	6,66
T2 (cắt dọc)	7,13ab	7,93a	6,43ab	5,96b	6,86
Trung bình B	6,9	7,15	6,75	6,25	
F _A : 0,50 ^{ns} F _B : 1,85 ^{ns} F _{AB} : 3,48* CV (%): 10,07					

Các chữ theo sau khác nhau thì có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê.

ns: không khác biệt về mặt thống kê.

*: khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.

khác biệt về mặt thống kê. Điều này cho thấy nồng độ 2,4D càng cao, tế bào phân chia tạo sẹo càng nhanh và mạnh, làm cho các thành phần cơ bản của tế bào trong mô sẹo không thể tổng hợp hoàn chỉnh, ảnh hưởng tới tỷ lệ chất khô trong mô sẹo.

Kết luận

Từ kết quả thu được thể hiện qua đường kính, hình thái, màu sắc, khối lượng tươi, khối lượng khô và tỷ lệ chất khô mô sẹo lớp mỏng tế bào cây gấc bằng kỹ thuật lớp mỏng tế bào có thể thấy được các nghiệm thức ở mức nồng độ 2,4D 1,5 mg/l có chỉ số về kích thước, khối lượng cao nhất. Về hình thái và chất lượng mô sẹo thì ở kiểu cắt ngang tốt hơn cắt dọc, ở những nghiệm thức cắt ngang tạo ra mô sẹo có màu vàng xanh, chắc, có khối lượng chất khô cao. Vì vậy, kiểu cắt lát mỏng cắt ngang

với nồng độ 2,4D 1,5 mg/l là phù hợp nhất trong các nghiệm thức tạo mô sẹo từ lát mỏng tế bào cây gấc.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Quỹ Nafosted trực thuộc Bộ Khoa học và Công nghệ thông qua đề tài mã số 106-NN.03-2013.15; đồng thời, nhóm tác giả cũng xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp tại Trường Đại học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh đã hỗ trợ hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Burke, C. Smidt and L. Vuong (2005), "Momordica cochinchinensis, Rosa roxburghii, wolfberry, and sea buckthorn-highly nutritional fruits supported by tradition and science", *Current Topics in Nutraceutical Research*, **3**(4), p.259.
- [2] B.K. Ishida, C. Turner, M.H. Chapman and T.A. McKeon (2004), "Fatty acid and carotenoid composition of gac (*Momordica cochinchinensis* (Spreng)) fruit", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(2), pp.274-279.
- [3] Đ.T. Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học Dân tộc, Hà Nội, tr.1294.
- [4] J.A.T. DaSilva (2003), "Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology", *African Journal of Biotechnology*, **2**(12), pp.683-691.
- [5] T. Murashige (1974), "Plant propagation through tissue cultures", *Annual review of plant physiology*, **25**(1), pp.135-166.
- [6] E.F. George, M.A. Hall and G.J. De Klerk (2008), *Plant tissue culture procedure-background*, Plant propagation by tissue culture, Springer, pp.1-28.
- [7] B. Debnath, S. Sinha and R. Sinha (2013), "In vitro differentiation and regeneration of *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng", *Indian Journal of Plant Sciences*, **2**, pp.2319-3824.
- [8] P. Aghaei, B. Bahramnejad and A. Mozafari (2013), "Effect of different plant growth regulators on callus induction of stem explants in '*Pistacia atlantica*' subsp. *Kurdica*", *Plant Knowledge Journal*, **2**(3), p.108.
- [9] M. Tran Thanh Van, N.T. Dien and A. Chlyah (1974), "Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L.", *Planta*, **119** (2), pp.149-159.