

NUÔI CẤY ĐỈNH SINH TRƯỞNG CÂY HÀNH ĐỎ (*Allium wakegi*)

Phạm Thị Thu Trang*, Nguyễn Thị Lý Anh, Hồ Thị Thu Thanh

Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

*Email: trangpham211@gmail.com

Ngày gửi bài: 21.03.2012

Ngày chấp nhận: 03.06.2012

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xây dựng quy trình nhân cây hành Đỏ (*Allium wakegi*) sạch virus bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (meristem). Mẫu cấy là đỉnh sinh trưởng với kích thước từ 0,3 - 0,5mm được tách từ các cây hành Đỏ có triệu chứng bệnh điển hình. Môi trường thích hợp để tái sinh chồi từ meristem là môi trường MS₀ bổ sung 0,75mg/l BA và 0,5mg/l IAA, cho tỷ lệ tái sinh đạt 73,3%. Môi trường nhân nhanh in vitro chồi tái sinh từ meristem tốt nhất là môi trường MS₀ bổ sung 1,5mg/l BA (cho hệ số nhân chồi loại 1 là 2,0 và chồi loại 2 là 4,07 lần/tháng). Môi trường ra rễ thích hợp nhất đối với cây tái sinh là môi trường MS₀ bổ sung 0,5mg/l IAA (cho tỷ lệ tạo rễ đạt 100%, số rễ trung bình là 4,33 rễ/cây). Bằng phương pháp RT-PCR với các mồi Clfor/ ClRev đã khẳng định được độ sạch bệnh của cây tái sinh từ meristem.

Từ khóa: *Allium*, *Allium wakegi*, hành Đỏ, nuôi cấy meristem.

Meristem Culture of *Allium wakegi*

ABSTRACT

Research was carried out to produce virus-free plants via meristem culture of *Allium wakegi*. The explants were apical meristems (0.3 - 0.5mm) derived from virus infected plants. The results indicated that MS medium supplemented with 0.75 mg/l BA and 0.5 mg/l IAA was the most suitable medium for *in vitro* shoot regeneration from meristem, the rate of regenerated shoots was 73.33%. The highest rate of shoot propagation was 2.0 times with type I shoot and 4.07 times with type II shoot after 4 weeks, on MS medium containing 1.5 mg/l BA. The shoots were transferred to rooting media by addition of 0.5 mg/l IAA and the rate of root formation was 100%, the average number of root was 4.33. RT-PCR method with primers Clfor/ ClRev showed that the regeneration plants from meristem were virus-free.

Keywords: *Allium*, *Allium wakegi*, De onion, meristem culture.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hành Đỏ (*Allium wakegi*) là cây rau gia vị được trồng khá phổ biến ở vùng đồng bằng sông Hồng, cho thu nhập cao và được thị trường ưa chuộng do có mùi vị thơm ngon khi chế biến, dễ dàng bảo quản và vận chuyển.

Theo Yosuke Tashiro (1984) *Allium wakegi* là một thể lưỡng bội khác loài có bộ genom (2n = 16) gồm 8 nhiễm sắc thể của hành củ (*A. ascalonicum*) và 8 nhiễm sắc thể

của hành hoa (*A. fistulosum*) vì vậy ở cây hành Đỏ (*A. wakegi*) không xảy ra quá trình sinh sản hữu tính (ra hoa kết hạt). Trong sản xuất, người dân thường giữ giống hành Đỏ bằng cách lưu giữ củ giống từ vụ này sang vụ khác, chính vì vậy tỷ lệ hành Đỏ nhiễm các bệnh virus là khá cao và đang có xu hướng tăng lên qua các năm. Ở Việt Nam ba loại bệnh virus OYDV, SYSV và LYSV gây hại mạnh nhất trên hành tỏi, tỷ lệ thiệt

hại lên tới 20-30% số cây giống và 10-20% số cây giống có thể ẩn triệu chứng, có ruộng nặng nhiễm tới 80% (Vũ Triệu Mân và cộng sự, 2001). Do đó, việc tạo mẫu giống ban đầu sạch bệnh để ngăn chặn sự lây lan và giảm tỷ lệ nhiễm bệnh virus trong quá trình sản xuất là hết sức cần thiết.

Cho đến nay, kỹ thuật nuôi cấy meristem đã được ứng dụng rất hiệu quả trong việc làm sạch virus cho nhiều loại cây trồng tạo nên hàng cây giống sạch bệnh, khỏe mạnh cho năng suất cao (Nguyễn Quang Thạch và cộng sự, 2004). Trung tâm nghiên cứu và phát triển rau quả châu Á (AVRDC, 2002) đã tiến hành nuôi cấy meristem của giống hành lá Myanmar thu được những cây sạch bệnh virus tái sinh từ meristem có kích thước 0,5 - 0,8 mm của cây bệnh. Ngoài mục đích tạo cây sạch bệnh, kỹ thuật nuôi cấy meristem còn được sử dụng để bảo tồn nguồn gen ở các giống *Allium* (Haim và cộng sự, 1990), tạo vật liệu ban đầu cho các thí nghiệm đột biến gen và cảm ứng đa bội.

Ở Việt Nam, cây họ hành tỏi vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều, đặc biệt là những nghiên cứu về nuôi cấy meristem trong khi nhu cầu về cây giống sạch bệnh đang được đặt ra rất cấp bách. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng quy trình nuôi cấy meristem cây hành Đẻ (*Allium wakegi*) tạo cây giống hành sạch bệnh phục vụ cho sản xuất và nguồn nguyên liệu sạch cho các nghiên cứu về chọn tạo giống đột biến và cảm ứng đa bội về sau.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vật liệu là mô phân sinh đỉnh (meristem) tách từ những cây hành Đẻ có triệu chứng bệnh virus điển hình.

Cặp mã đặc hiệu cho potyviridae là CIfor/CIRev (Hà Viết Cường, 2008).

CIFor5'GGiVViGTiGGiWSiGGiAARTCiAC-3'CIRev5'ACiCCRTTYTCDATDATRTTiGTiGC-3'.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Kỹ thuật tách meristem

Khử trùng mẫu: mẫu được khử trùng bằng cồn 70° trong 1 phút, rửa bằng nước cất vô trùng 3 lần sau đó được lắc liên tục trong HgCl₂ 1% trong 10 phút rồi tiếp tục rửa lại bằng nước cất 3 lần.

Tách mô phân sinh đỉnh (meristem): Meristem được cắt với kích thước ≤0,5 mm dưới kính lúp soi nổi Nikon Olympus SD 30 có độ phóng đại 30 lần và đưa vào môi trường dinh dưỡng nhân tạo đã chuẩn bị sẵn.

2.2.2. Môi trường nuôi cấy

Tất cả các thí nghiệm sử dụng môi trường nuôi cấy MS cơ bản có bổ sung sucrose, các chất điều tiết sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau tùy từng thí nghiệm, điều chỉnh pH ở mức 5,7.

2.2.3. Đánh giá độ sạch bệnh virus của cây tái sinh từ meristem bằng phương pháp RT-PCR

Phương pháp RT-PCR: được thực hiện với 30 chu kỳ theo chu trình nhiệt ở 42°C trong 30 phút, 94°C trong 5 phút, 94°C trong 45 giây, 42°C trong 45 giây và 68°C trong 1 phút, 68°C trong 5 phút. Các thành phần của phản ứng bao gồm RNA 25ng, buffer 5X, dNTP 0,25 μM, primer CI Forward 1μM, primer CI Reverse 1μM, enzyme 1U, nước cất để ion. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0% và nhuộm ethidium bromide. Hóa chất và dụng cụ sử dụng trong thí nghiệm này do hãng QIAGEN cung cấp.

2.2.4. Điều kiện thí nghiệm

Nuôi cấy ở nhiệt độ: 22 - 27°C; cường độ ánh sáng 2000 lux; thời gian chiếu sáng: 16 giờ sáng/8 giờ tối. Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần, mỗi lần 10 bình, mỗi bình 3 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi định kỳ 1 tuần/lần. Số liệu được xử lý trên phần mềm IRRISTAT 4.0 và Excel, LSD ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 1. Cây hành đẻ nhiễm bệnh virus và cây khỏe

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Quá trình tái sinh chồi từ meristem

Hussey và cộng sự (1978) tiến hành nuôi cấy mẫu meristem của giống hành “Senshyu” trên môi trường MS với BAP và đã nhân nhanh được sau 4 - 6 tuần. Giống “Vsetana” đã cảm ứng nhân chồi trên môi trường BDS với nồng độ BAP và NAA khác nhau. Trong khoảng thời gian nuôi cấy là 14 tuần, cây có thể tái sinh được từ callus (Havel và Novak, 1985). Havel (1982) đã nghiên cứu vai trò của chất điều tiết sinh trưởng trong quá trình tái sinh chồi tỏi từ meristem. Theo tác giả này, trong quá trình nuôi cấy, những chồi đơn phát triển từ đỉnh chồi tỏi phân lập có thể xuất hiện trên môi trường không có chất điều tiết sinh trưởng.

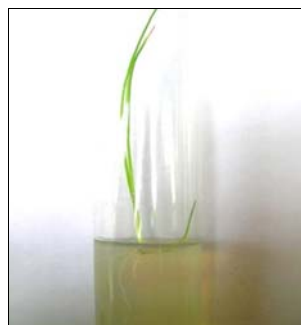
Tuy nhiên, một lượng auxin nhất định sẽ làm tăng tỷ lệ chồi tái sinh từ meristem ngắn (0,1 - 0,5mm). Bhojwani (1980), đã nuôi cấy thành công meristem của cây hành củ (*Allium ampeloprasum*), hành hoa (*A. fistulosum*) và cây tỏi tằm (*A. mananthum*). Meristem được tách ra của các giống trên phát triển nhanh và khỏe mạnh trên môi trường có bổ sung cytokinin.

Các cytokinin (BA, kinetin) và auxin (IAA, α NAA) được sử dụng với các nồng độ và tổ hợp khác nhau trong tái sinh chồi từ meristem (Bảng 1 và 2). Trong quá trình nuôi cấy, meristem đã cảm ứng tạo thành nhiều loại chồi khác nhau. Căn cứ vào đặc điểm hình thái sau 6 tuần nuôi cấy, chồi được chia thành 3 loại sau:

+ Chồi loại 1: Chồi đã hình thành rễ, lá, thường có kích thước lớn, màu xanh đậm. Trong quá trình nuôi cấy mẫu, chồi thường cảm ứng và phát triển từ rất sớm (tuần 1), chồi có kích thước trên 2 cm.

+ Chồi loại 2: Là những chồi ngắn mập (kích thước dưới 2cm), có màu xanh đậm, có từ 1 - 2 rễ, có vùng hình thành rễ màu trắng, khả năng tái sinh cao (tuần 1 - 2) và khả năng nhân lên rất lớn.

+ Chồi loại 3: Là những chồi thường hình thành sau tuần thứ 2, có kích thước dao động lớn, không có vùng rễ màu trắng, chỉ là dạng đoạn chồi màu xanh. Thường mất sức sống và hoá vàng ở tuần thứ 6.



Hình 2. Chồi loại 1



Hình 3. Chồi loại 2



Hình 4. Chồi loại 3

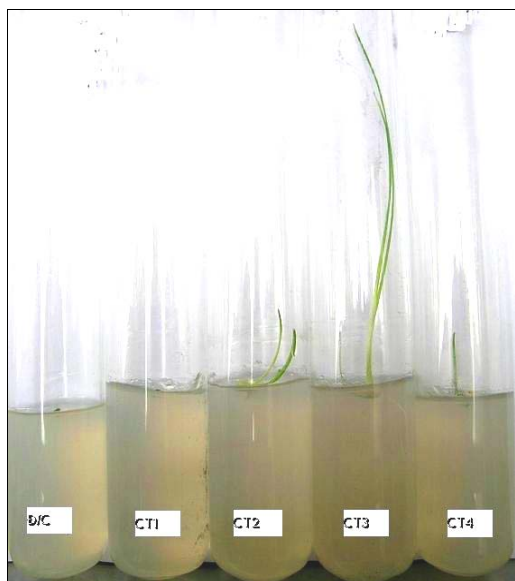
3.1.1. Ảnh hưởng của đơn chất (BA, kinetin và nước dừa) đến sự tái sinh chồi từ meristem

Kết quả thí nghiệm cho thấy BA và nước dừa có tác dụng tốt hơn so với kinetin khi kích thích tái sinh chồi từ meristem (Bảng 1). Tuy nhiên, khi sử dụng BA tỷ lệ chồi loại 1 và loại 2 đều hình thành khá cao, đặc biệt là chồi loại 2 là loại chồi có sức sống và khả năng dễ nhánh mạnh, là nguyên liệu thích hợp trong quá trình nhân nhanh mẫu tái sinh (so với nước dừa chỉ hình thành chồi loại 1). Do đó, môi trường MS₀ bổ sung 0,75mg/l BA là môi trường tốt nhất cho sự tái sinh chồi từ meristem ở cây hành Đẻ (*Allium wakegi*).

3.1.2. Ảnh hưởng của tổ hợp (BA và IAA; BA và αNAA) đến sự tái sinh chồi từ meristem

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA, kinetin và nước dừa đến sức sống và sự tái sinh của chồi từ meristem (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chất bổ sung	Nồng độ	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ các loại chồi (%)			Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)
						Loại 1	Loại 2	Loại 3	
Đ/c		0,00	46,7	53,3	50,0	0,0	0,0	50,0	3,3
CT 1	BA (mg/l)	0,25	46,7	53,3	40,0	3,3	0,0	36,7	13,3
CT 2		0,50	43,3	57,7	50,0	6,7	10	33,3	6,7
CT 3		0,75	26,6	73,4	66,7	13,4	13,3	40,0	6,7
CT 4		1,00	30,0	74,0	60,0	6,7	0,0	53,3	14,0
CT 5	Kinetin (mg/l)	0,25	53,4	46,6	43,3	0,0	0,0	43,3	3,3
CT 6		0,50	50,0	50,0	46,7	0,0	0,0	46,7	3,3
CT 7		0,75	50,0	50,0	46,7	0,0	0,0	46,7	3,3
CT 8		1,00	56,7	56,7	56,7	0,0	0,0	56,7	0,0
CT 9	Nước dừa	5%	30,6	69,4	63,8	19,4	0,0	44,4	5,6
CT 10		10%	44,4	66,8	55,6	5,6	0,0	55,6	5,6
CT 11		15%	20,5	79,5	69,5	2,8	0,0	66,7	0,0



Hình 5. Ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh chồi từ meristem

Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 2 cho thấy tổ hợp BA và IAA có tác dụng tốt hơn trong việc kích thích sự sinh trưởng, phát triển của meristem so với tổ hợp BA và α -NAA, cũng như so với việc sử dụng BA riêng rẽ.

Với mục đích tạo nhiều chồi loại 2 phục vụ cho quá trình nhân nhanh thì công thức môi trường MS₀ bổ sung 0,75mg/l BA và 0,5mg/l IAA là công thức thích hợp nhất cho quá trình tái sinh chồi từ meristem (cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất: 83,3%; tỷ lệ chồi loại 2: 26,6%).

3.2. Quá trình nhân nhanh chồi tái sinh

Trong thí nghiệm này, chồi tái sinh từ meristem được nuôi cấy trên môi trường nền MS₀ bổ sung BA và kinetin với nồng độ biến động từ 0 đến 2mg/l (Bảng 3).

Kết quả thực nghiệm cho thấy rằng BA có tác dụng tốt hơn kinetin trong việc kích thích sự hình thành cụm chồi. Các chồi mới hình thành có kích thước khá đồng đều, có màu xanh đậm, sức sống cao. Trong khi tốc độ phản ứng của chồi ở môi trường có bổ sung kinetin là khá chậm, những chồi mới hình thành thường có kích thước nhỏ, yếu ớt, có màu xanh nhạt. Như vậy, trong quá trình nhân nhanh chồi loại 2 cho hệ số nhân chồi và số lá trung bình/chồi cao hơn

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA-IAA và BA- α NAA đến sức sống và sự tái sinh chồi từ meristem (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ BA mg/l	Chất bổ sung	Nồng độ mg/l	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ các loại chồi (%)			Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)
							Loại 1	Loại 2	Loại 3	
Đ/c	0,75		0,0	30,0	70,0	63,3	10,0	13,3	40,0	6,7
CT 1	0,75		0,1	36,7	63,3	60,0	0,0	20,0	40,0	13,3
CT 2	0,75	IAA	0,25	30,0	70,0	70,0	0,0	20,0	50,0	14,7
CT 3	0,75		0,5	26,7	83,3	80,0	0,0	26,6	53,4	17,3
CT 4	0,75		0,1	52,8	47,2	41,7	5,6	13,9	22,2	16,7
CT 5	0,75	α NAA	0,25	61,1	38,9	38,9	2,8	16,7	19,4	22,2
CT 6	0,75		0,5	55,6	44,4	37,2	0,0	17,8	19,4	33,3

chồi loại 1 và loại 3. Môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi loại 2 là môi trường MS₀ bổ sung BA với nồng độ 1,5mg/l. Sử dụng cytokinin trong nhân nhanh chồi tái sinh của cây hành tỏi đã được một số tác giả đề cập (Havel, 1982, Muhammad & cs., 2003).

Kết quả này cũng phù hợp với công bố của tác giả Muhammad và cộng sự, 2003. Họ đã nhân nhanh thành công giống tỏi địa phương của Bangladesh trên môi trường MS bổ sung 0,5 ppm BA.

3.3. Quá trình tạo rễ của chồi tái sinh

Sau khi tạo được chồi tái sinh việc kích thích cho cây ra rễ là một việc làm rất quan trọng. Nó làm tăng sức sống và khả năng sinh trưởng, phát triển của cây in vitro khi đưa ra vườn ươm.

Theo Novark và cộng sự (1983), môi trường ra rễ tốt nhất đối với cây họ hành tỏi

là môi trường có bổ sung auxin (như IAA) trong một số trường hợp sự thay thế IAA bằng GA₃ cũng có tác dụng kích thích ra rễ. Bên cạnh đó, Việc sử dụng than hoạt tính đối với sự ra rễ của cây đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng như dưa hấu (Krug & cs., 2005; Pirinc & cs., 2003); cói *Juncus effusus* L., (Sarma & cs., 2000).



Hình 6. Kết quả nhân nhanh ở 3 loại chồi

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA và kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi tái sinh (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chất bổ sung	Nồng độ (mg/l)	Chồi loại 1		Chồi loại 2		Chồi loại 3	
			Số lá TB/chồi (lá)	HSN chồi (lần/tháng)	Số lá TB/chồi (lá)	HSN chồi (lần/tháng)	Số lá TB/chồi (lá)	HSN chồi (lần/tháng)
Đ/C		0	2,2	1,13	2,33	1,27	0,2	0,2
CT1	BA	0,5	1,6	1,06	9,4	5,73	0,53	0,53
CT2		1,0	1,8	1,33	9,53	6,33	0,73	0,73
CT3		1,5	1,67	1,4	10,93	7,4	0,73	0,73
CT4		2,0	4,13	2	6,47	4,07	0,8	0,8
CT5	Kinetin	0,5	2,00	1,33	4,40	2,46	0,33	0,33
CT6		1,0	2,33	1,47	6,27	3,80	0,47	0,47
CT7		1,5	2,47	1,60	10,07	5,93	0,20	0,20
CT8		2,0	2,20	1,20	7,20	6,13	0,00	0,00

CV% = 2,6

LSD5% công thức = 0,45

LSD5% loại chồi = 0,35

LSD5% công thức+loại chồi = 0,78

Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 4 cho thấy IAA có tác dụng ức chế sự hình thành chồi, làm tăng số lá và số rễ của mẫu nuôi cấy so với đối chứng. Trong khi đó, than hoạt tính đã ức chế sự sinh trưởng và phát triển của cây tái sinh và không tạo được sự tăng số rễ trung bình trên cây ở mức sai khác ý nghĩa (LSD 5%) với công thức đối chứng (Bảng 5).

Như vậy, ở thí nghiệm này, môi trường tốt nhất cho sự sinh trưởng, phát triển và ra rễ của cây tái sinh là môi trường MS₀ có bổ sung 0,5mg/l IAA.

3.4. Đánh giá độ sạch bệnh của cây tái sinh từ meristem bằng phương pháp phương pháp RT-PCR

Phương pháp RT - PCR là một trong những phương pháp đáng tin cậy nhất,



Hình 7. Ảnh hưởng của IAA đến sự sinh trưởng, phát triển và ra rễ của cây tái sinh

Bảng 4. Ảnh hưởng của IAA đến sự ra rễ của chồi tái sinh (sau 4 tuần nuôi cấy)

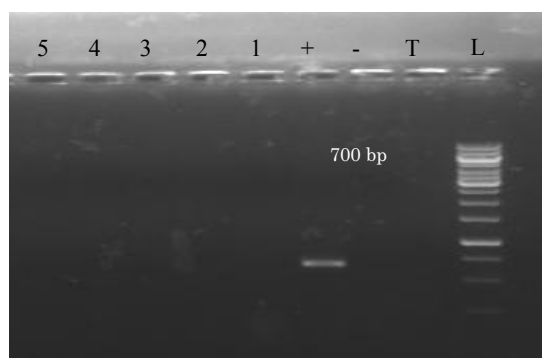
Công thức	Nồng độ IAA (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)	Số chồi/cây (chồi)	Số rễ/cây (rễ)
Đ/C	0	6,84	3,37	2,73	1,67
CT1	0,25	7,55	3,70	2,50	3,17
CT2	0,50	8,44	3,93	2,03	4,33
CV%		0,7	4,4	3,1	3,8
LSD5%		0,99	0,32	0,15	0,23

Bảng 5. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự ra rễ của chồi tái sinh (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ than hoạt tính (g/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)	Số chồi/cây (chồi)	Số rễ/cây (rễ)
Đ/C	0	6,89	3,70	3,03	1,70
CT1	0,5	4,73	2,73	2,37	2,33
CT2	1	4,32	2,20	1,53	3,17
CV%	3,1	1,2	3,5	2,0	
LSD5%	0,32	0,66	0,16	0,94	

vì vậy nó được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán phân tử nhằm phát hiện ra các cây bị nhiễm virus dạng RNA ở mức độ nhẹ hoặc ở giai đoạn nhiễm sớm (Cuong Viet Ha, 2007). Trong thí nghiệm này, phản ứng RT - PCR được thực hiện để kiểm tra sự có mặt của *potyvirus* trên các mẫu hành tái sinh từ meristem.

Kết quả chẩn đoán bằng phương pháp RT - PCR đã cho thấy mẫu hành tái sinh từ meristem cho phản ứng âm tính với sự có mặt của *potyvirus* khi sử dụng 2 đoạn mỗi đặc hiệu CIFor/ CIREv (Hình 8).



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên gelagarose kiểm tra sự có mặt của *potyvirus* với cặp mỗi CIFor và CIREv

Chú thích:

L: Ladder 1Kb

T: ĐCT RNA được thay bằng nước

-: ĐC(-) mẫu hành khỏe

+: ĐC(+) mẫu hành bị bệnh virus

1, 2, 3, 4, 5: các mẫu hành tái sinh từ eristem

4. KẾT LUẬN

Môi trường thích hợp để tái sinh chồi từ meristem là môi trường MS₀ bổ sung 0,75mg/l BA và 0,5mg/l IAA.

Môi trường nhân nhanh in vitro chồi tái sinh từ meristem tốt nhất là môi trường MS₀ bổ sung 1,5mg/l BA.

Môi trường ra rễ thích hợp nhất đối với cây tái sinh là môi trường MS₀ bổ sung 0,5mg/l IAA

Bằng phương pháp RT-PCR với 2 mỗi CIFor và CIREv đã khẳng định các cây tái sinh từ meristem là sạch virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asian Vegetable Research and Development Center (AVRCD) (2002). Virus in *Allium*, pp 92 - 95.
- Bhojwani S.S (1980). *In vitro* propagation of galic by shoot proliferation. Sci.Hortic, pp 13 - 47.
- Cuong Viet Ha (2007). Detection and identification of Potyviruses and Geminiviruses in Vietnam. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy to the Queensland University of Technology, pp 203 - 215.
- Haim D. Rabinowitch, James L. Brevoster, Phil (1990). Onion and Allied crop, CRC Press Inc Boca Raton, Florida, pp 236 - 238.
- Havel, L. and F. J. Novak (1985). Meristem-tip culture of *Allium cepa* L., Sci. Hortic., 27, 209.
- Havel, L. (1982). Plant differentiation in tissue Culture of some species of *Allium* Genus, Ph.D. thesis, Insitute for Experimental Botany, Czechoslovak Academy of Science, Praha.
- Ha C., P. Revill, R. M. Harding, M. Vu, J. L. Dale (2007). Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. Archives of Virology, pp 45-60.
- Hussey, G. (1978). *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa* by axilliary and adventitious shoot proliferation. Sci. Hortic., 9, 227 - 236.
- Krug MGZ, Stipp LCL, Rodriguez APM & Mendes BMJ (2005). "In vitro Organogenesis in Watermelon cotyledons", Pesp agropec. Bras. Brasilia, 40, 9, pp.861 - 865.
- Muhammad S. H., Tomikichi W. and Kazumi H. (2003). Shoot regeneration and bulblet formation from shoot and root meristem of garlic Cv Bangladesh local, Asian Journal of Plant Science 2, pp 23 - 27.
- Novak, F.J (1983). Production of garlic (*Allium sativum* L.) tetraploids in shoot-tip *in vitro* culture.2. Plan-zen zecht, 91, 329.

- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Phương Thảo (2004). Giáo trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp, NXB Nông nghiệp, tr 76-77.
- Pirinc V, Onay A, Yildirim H, Adiyaman F, Isikalan C & Basaran D, (2003). "Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid Diyarbakir watermelon (*Citrullus lanatus* cv. "Surme")". Turk 5 biol, 101 - 105.
- Sarma, K.S. and Rogers, S.M.D (2000). Plant regeneration from seedling explants of *Juncus effuses*. Aquatic Botany, Volume 68, Number 3, pp. 239-247 (9).
- Vũ Triệu Mân, Lê Lương Tề (2001). Giáo trình Bệnh cây Nông nghiệp. NXB Nông nghiệp, Hà Nội, tr 247 - 249.
- Yosuke Tashiro (1984). Genome Analysis of *Allium wakegi* Araki. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, pp 399 - 407.