

ẢNH HƯỞNG CỦA TIA GAMMA VÀ MUỐI CLORUA NATRI (NaCl) ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ TÁI SINH CHỒI CỦA MÔ SẸO MÍA (*SACCHARUM OFFICINARUM L.*)

Lâm Ngọc Phương¹, Lê Minh Lý¹ và Võ Thị Mai Trinh¹

ABSTRACT

The objective of the present study was to select sugarcane salt tolerant lines through in vitro mutagenesis. Callus formation was attained from young leaf segments cultured in MS medium supplemented with 3 mg per litre of 2,4-dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D) and 0,5 mg per litre of kinetin. Irradiated and non-irradiated calli were screened in vitro through shoot regeneration at 10.0 and 15‰ of NaCl. Regeneration capacity of irradiated calluses decreased at 20 to 40 of gamma rays of ⁶⁰Co and at 10.0 and 15‰ of NaCl. The regeneration frequency in irradiated calli was 1.0% to 15% as compared to 58,3% in control calli.

Keywords: Sugarcane, 2,4-D, callus, gamma rays, salt tolerance

Title: *Affects of gamma rays and sodium chloride on growth and shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum L.*) callus cultures*

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là chọn dòng mía chống chịu mặn bằng kỹ thuật đột biến gen in vitro. Mô sẹo được tạo thành từ lá non được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 3 mg/l 2,4-D + 3 mg/l kinetin. Mô sẹo có và không chiếu xạ được tái sinh trong môi trường muối 10 và 15‰. Khả năng tái sinh của mô sẹo giảm còn ở 1- 15% ở lượng chiếu xạ 20-40 Gy và nồng độ muối (10-15%) so với đối chứng 58,3%.

Từ khóa: Cây mía, 2,4-D, mô sẹo, tia gamma, chống chịu mặn

1 MỞ ĐẦU

Mía là cây công nghiệp ngắn ngày có giá trị kinh tế cao, dễ trồng. Tuy nhiên, đất nhiễm mặn là một trong những yếu tố chính làm khó khăn trong sản xuất loại cây này. Đặc biệt trong điều kiện khí hậu toàn cầu đang thay đổi, băng tan ở 2 cực, nước biển dâng lên đe dọa các vùng canh tác đất thấp ở ven biển (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2004).

Vi thể, nuôi cấy mô là kỹ thuật được sử dụng để chọn lọc phát triển các biến dị di truyền có lợi trên những cây trồng có giá trị kinh tế quan trọng như lúa mì và mía. Nhiều tác giả đã kết hợp chiếu xạ tia gamma với kỹ thuật nuôi cấy mô để chọn tạo các giống cây trồng chịu mặn (Saif-Ur-Rashed *et al.*, 2001; Al Jibouri *et al.*, 2006). Đề tài được thực hiện nhằm xác định nồng độ 2,4-D thích hợp trong sự tạo thành mô sẹo từ lá non, sự ảnh hưởng của tia gamma và nồng độ muối đến sự sinh trưởng và tái sinh chồi của mô sẹo mía.

¹ Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

2 PHƯƠNG TIỆN PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

2.1.1 Địa điểm và thời gian

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 2/2011 đến tháng 11/2011 tại phòng thí nghiệm nuôi cấy mô có nhiệt độ $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ chiếu sáng 1.500 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày thuộc Bộ môn Sinh lý- Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp và SHƯĐ, trường Đại học Cần Thơ.

2.1.2 Vật liệu

Mẫu cấy là các chồi mía 2 tháng tuổi, giống ROC 16, được chuẩn bị sẵn sàng ở nhà lưới, sinh trưởng tốt không sâu bệnh.

2.2 Phương pháp

Môi trường nuôi cấy gồm thành phần khoáng đa vi lượng được pha chế theo công thức MS (Murashige và Skoog, 1962), bổ sung thiamin 1 mg/l, pyridoxin 1 mg/l, acid nicotinic 1 mg/l, đường 30 g/l, nước dừa 100 ml/l. pH môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi nấu và thể tích nuôi cấy là 40 ml/keo (kích thước 12 x 10 cm). Môi trường được thanh trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Thí nghiệm 1: Hiệu quả của 2,4-D trên sự tạo mô sẹo từ lá mía non

Các chồi mía được cắt lá, tách bỏ những bẹ lá bẩn, rửa dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm xà bông 15 phút và rửa lại cho sạch xà bông. Tiếp theo, các chồi được đưa vào tủ cấy vô trùng và lắc nhẹ qua cồn 70° (1 phút), sau đó khử trùng bằng HgCl_2 0,4% (30 phút) và rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Các mẫu vô trùng được cắt thành từng đoạn khoảng 1 cm sau đó chẻ đôi, tách lấy phần lá non bên trong cấy úp mặt lá vào môi trường và để trong điều kiện tối.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố gồm 5 nghiệm thức tương ứng với 5 nồng độ 2,4-D là 0, 1, 2, 3 và 4 mg/l; mỗi nghiệm thức có 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo, mỗi keo cấy 6 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%) = (số mẫu tạo mô sẹo/tổng số mẫu cấy) * 100; số mô sẹo tạo thành/mẫu (%) = (số cạnh tạo mô sẹo/4 cạnh) * 100; chiều dài và chiều rộng mô sẹo (cm).

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của tia gamma và nồng độ muối đến sự sinh trưởng và tái sinh chồi của mô sẹo mía.

Các mô sẹo 4 tuần tuổi có kích thước 0,5 x 0,5 cm được cấy và đĩa petri chứa môi trường MS + 3 mg/l 2,4-D, được chiếu xạ tia gamma tại Viện Nghiên cứu Hạt Nhân Đà Lạt; sau đó được chuyển sang cùng môi trường có thêm kinetin 0,5 mg/l và muối NaCl.

Thí nghiệm bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên hai nhân tố với 4 liều lượng chiếu xạ (0; 10; 20 và 40 Gy) và 3 nồng độ muối NaCl (0; 10 và 15‰), gồm 12 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 8 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo, mỗi keo cấy 4 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ (%) mô sẹo tạo chồi (số mẫu mô sẹo tái sinh chồi/tổng số mẫu mô sẹo ban đầu) x 100; tỷ lệ (%) mô sẹo hóa nâu (số mẫu mô sẹo hóa nâu/tổng số mẫu mô sẹo ban đầu) x 100.

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê MSTATC. Phân tích phương sai (ANOVA), so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định Duncan hoặc LSD ở mức ý nghĩa 5% hoặc 1%.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Hiệu quả của 2,4-D trên sự tạo mô sẹo từ lá mía non

3.1.1 Tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo

Kết quả bảng 1 cho thấy ở thời điểm 2 tuần sau khi cấy nghiệm thức 3 mg/l và 4 mg/l 2,4-D cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất lần lượt là 100% và 92,9%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức còn lại. Ở nghiệm thức đối chứng các mẫu cây không hình thành mô sẹo.

Bảng 1: Tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo trên môi trường có nồng độ 2,4-D khác nhau ở 2 và 4 tuần sau khi cấy (TSKC)

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo	
	2 TSKC	4 TSKC
0	0,0 d	0,0 b
1	17,9 c	67,9 a
2	67,9 b	85,7 a
3	100,0 a	100,0 a
4	92,9 a	92,9 a
F	**	**
CV (%)	14,05	23,66

*Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; ** khác biệt có ý nghĩa 1%.*

Đến thời điểm 4 tuần sau khi cấy, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo dao động từ 67,9%-100% ở các nghiệm thức bổ sung 2,4-D từ 1-4 mg/l, khác biệt với đối chứng nhưng không khác biệt thống kê giữa các nồng độ này. Nghiệm thức không bổ sung 2,4-D thì các mẫu không có sự hình thành mô sẹo (Hình 1).

Theo kết quả nghiên cứu của Kambaska và Santilata (2009) thì sử dụng 2,4-D có hiệu quả cao trong kích thích tạo mô sẹo từ lá mía so với NAA và IBA. Nghiên cứu của Begum *et al.* (1995) cho thấy nồng độ 3,5 mg/l 2,4-D có tỷ lệ lá tạo mô sẹo cao nhất trên các giống mía ở Bangladesh Nagabari.

3.1.2 Số mô sẹo tạo thành/mẫu

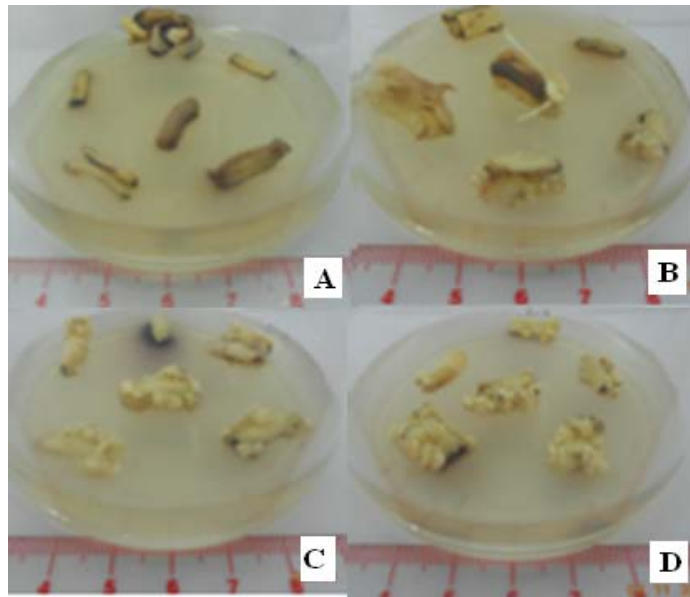
Kết quả bảng 2 cho thấy, ở thời điểm 2 tuần sau khi cấy nghiệm thức bổ sung 3-4 mg/l 2,4-D cho số mô sẹo cao nhất lần lượt là 64,3% và 62,5% khác biệt thống kê so với đối chứng và các nghiệm thức còn lại ở mức ý 1%. Đến thời điểm 4 tuần sau khi cấy, nghiệm thức có bổ sung nồng độ 3-4 mg/l 2,4-D vẫn cho tỷ lệ mô sẹo cao không khác biệt thống kê so với nghiệm thức 2 mg/l 2,4-D nhưng khác biệt hai nghiệm thức còn lại ở mức ý nghĩa 1% (Hình 1). Ở các nghiệm thức mô sẹo được

hình thành từ vị trí vết cắt sau đó phát triển dần ra, những mẫu lá không hình thành mô sẹo phân rìa lá hóa nâu và chết.

Bảng 2: Số mô sẹo tạo thành (%) trên môi trường có nồng độ 2,4-D khác nhau ở 2 và 4 TSKC

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Số mô sẹo /mẫu (%)	
	2 TSKC	4 TSKC
0	0,0 c	0,0 c
1	7,1 bc	29,5 bc
2	31,3 b	50,9 ab
3	64,3 a	83,0 a
4	62,5 a	81,3 a
F	**	**
CV (%)	30,88	26,63

*Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; ** khác biệt 1%.*



Hình 1: Mô sẹo mía giống ROC 16 được tạo thành trên môi trường có các nồng độ 2,4-D khác nhau ở 4 TSKC. (A) 0 mg/l 2,4-D (đối chứng ; (B) 1 mg/l 2,4-D; (C) 3 mg/l 2,4-D và (D) 4 mg/l 2,4-D

3.1.3 Chiều dài và chiều rộng mô sẹo

Chiều dài mô sẹo

Kết quả bảng 3 ở thời điểm 2 tuần sau khi cấy nghiệm thức 3 mg/l 2,4-D có chiều dài mô sẹo lớn 0,26 cm không khác biệt thống kê so với nghiệm thức 4 mg/l 2,4-D và nghiệm thức 2 mg/l 2,4-D nhưng khác biệt so với các nghiệm thức còn lại ở mức 1%. Kết quả tương tự được ghi nhận ở thời điểm 4 tuần sau khi cấy nghiệm thức 3 mg/l 2,4-D có chiều dài mô sẹo lớn 0,51 cm (Hình 1).

Chiều rộng mô sẹo

Ở tuần thứ hai sau khi cấy, chiều rộng mô sẹo cao ở các nghiệm thức bổ sung 3 mg/l 2,4-D là 0,22 cm khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các nghiệm thức còn lại trừ nghiệm thức 4 mg/l 2,4-D. Đến tuần thứ tư sau khi cấy, nghiệm thức 3 mg/l 2,4-D vẫn cho chiều rộng mô sẹo cao với 0,44 cm khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức 1 mg/l 2,4-D ở mức ý nghĩa 1% nhưng không khác biệt so với hai nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức đối chứng không có sự hình thành mô sẹo (Hình 1).

Kambaska và Santilata (2009) cho rằng sử dụng 2,4-D từ 0,5 đến 4 mg/l đều cho lá cảm ứng tạo mô sẹo, tuy nhiên ở nồng độ 2,5 mg/l 2,4-D mô sẹo có khả năng tái sinh cao. Theo Al-Jibouri và Al-Shamarri (2009), 2,4-D có hiệu quả trong kích thích mầm lá mía tạo mô sẹo, khi nồng độ 2,4-D tăng cao thì trọng lượng tươi của mô sẹo giảm. Điều này được giải thích là nồng độ 2,4-D cao sẽ ức chế sự tăng trưởng của tế bào (Attia và Jaddio, 1999).

Bảng 3: Chiều dài và chiều rộng mô sẹo (cm) trên môi trường có nồng độ 2,4-D khác nhau ở 2 và 4 TSKC

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Chiều dài mô sẹo (cm)		Chiều rộng mô sẹo (cm)	
	2 TSKC	4 TSKC	2 TSKC	4 TSKC
0	0,00 b	0,00 c	0,00 d	0,00 c
1	0,06 b	0,27 b	0,03 cd	0,17 b
2	0,18 a	0,41 ab	0,12 bc	0,30 ab
3	0,26 a	0,51 a	0,22 a	0,44 a
4	0,23 a	0,47 a	0,18 ab	0,37 a
F	**	**	**	**
CV (%)	30,88	26,63	45,34	30,54

*Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, ** khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%*

Như vậy, kết quả thí nghiệm trên cho thấy nồng độ 2,4-D 3 mg/l trong môi trường nuôi cấy mầm lá mía non ở giống ROC 16 thích hợp để tạo mô sẹo với tỷ lệ mầm tạo mô sẹo cao và kích thước mô sẹo lớn.

3.2 Ảnh hưởng của tia gamma và nồng độ muối đến sự sinh trưởng và tái sinh chồi của mô sẹo mía

3.2.1 Tỷ lệ (%) tái sinh chồi

Kết quả bảng 4 cho thấy liều chiếu xạ tia gamma ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh chồi của mô sẹo, các mẫu chiếu xạ tia gamma cho tỷ lệ tái sinh chồi thấp khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với không chiếu xạ, tỷ lệ tái sinh chồi thấp và không khác biệt thống kê giữa các liều lượng chiếu xạ tia gamma từ 10-40 Gy, tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi biến thiên từ 6,0- 9,9% (Hình 2).

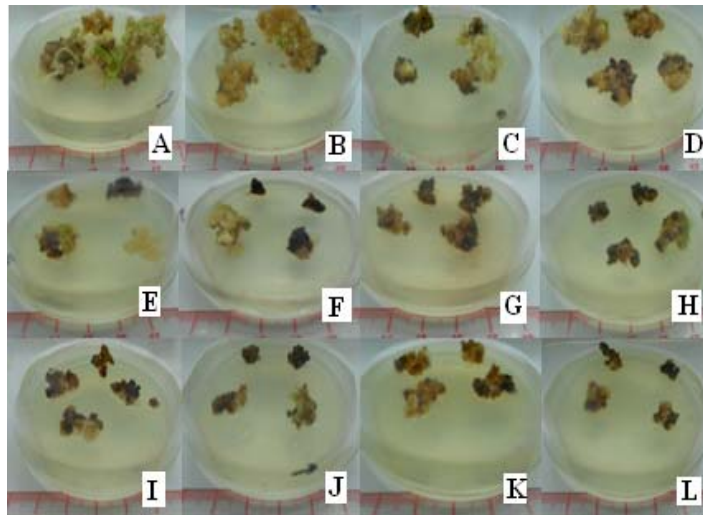
Kết quả được ghi nhận bởi Saif-Ur-Rashed et al., (2001) về khả năng tái sinh của mô sẹo mía và khoai tây giảm mạnh khi liều chiếu xạ tia gamma tăng, cho thấy LD₅₀ của mía và khoai tây là 20 Gy.

Bảng 4: Tỷ lệ (%) mô sẹo mía tái sinh chồi và mô sẹo hóa nâu (%) sau khi được chiếu xạ tia gamma và nuôi cấy trong môi trường có các nồng độ NaCl khác nhau ở 2 TSKC

Nhân tố	Tỷ lệ (%) mô sẹo mía tái sinh chồi	Tỷ lệ (%) mô sẹo mía hóa nâu
Liều lượng tia gamma Gy (A)		
0	24,3 a	2,8 b
10	9,9 b	9,5 ab
20	7,4 b	8,4 b
40	6,0 b	16,1 a
Nồng độ NaCl (‰) (B)		
0	22,1 a	12,3
10	8,9 b	8,3
15	4,5 b	7,0
Liều lượng tia gamma Gy (A) x Nồng độ NaCl (B)		
A0 B0	58,3 a	0,0 c
A0B10	6,3 b	0,0 c
A0B15	4,5 b	8,3 bc
A10 B0	15,0 b	16,3 ab
A10B10	12,3 b	8,8 bc
A10B15	2,3 b	3,5 bc
A20B0	7,3 b	8,9 bc
A20B10	8,8 b	13,1 abc
A20B15	6,3 b	3,1 bc
A40 B0	7,7 b	24,0 a
A40B10	9,2 b	11,3 abc
A40B15	1,0 b	13,0 abc
F(A)	**	ns
F(B)	**	**
F(A×B)	**	**

Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD và Duncan; ** khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%.

Kết quả bảng 4 cũng cho thấy khả năng tái sinh chồi của mô sẹo trong môi trường có chứa muối NaCl, tỷ lệ mô sẹo tái sinh thấp từ 4,5% -8,9%, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng không NaCl là 22,1%. Tuy nhiên, tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi không khác biệt thống kê giữa hai nồng độ muối được sử dụng.



Hình 2: Sự sinh trưởng và tái sinh chồi của mô sẹo sau khi được chiếu xạ tia gamma 2 TSKC trong môi trường

(A) Đối chứng; (B) 10 Gy; (C) 20 Gy; (D) NaCl 0‰ + 40 Gy; (E) NaCl 10‰; (F) NaCl 10‰ + 10 Gy; (G) NaCl 10‰ + 20 Gy; (H) NaCl 10‰ + 40 Gy; (I) NaCl 15‰; (J) NaCl 15‰ + 10 Gy; (K) NaCl 15‰ + 20 Gy và (L) NaCl 15‰ + 40 Gy

Có sự tương tác giữa liều lượng tia gamma và nồng độ NaCl trên tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi, các mô sẹo ở nghiệm thức đối chứng không chiếu xạ và không muối NaCl cho tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi cao nhất là 58,3%, khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các nghiệm thức còn lại.

Kết quả tương tự được ghi nhận trên lúa, tỷ lệ tạo chồi của mô sẹo thấp khi nồng độ NaCl cao (Lê Văn Huỳnh Ngọc, 2011; Raveendar và Premkuma, 2008; Zainah Daud và Chan Lai Keng, 2003).

3.2.2 Tỷ lệ (%) mô sẹo hóa nâu

Kết quả bảng 4 cho thấy chiếu xạ tia gamma ảnh hưởng đến sự hóa nâu của mô sẹo, tỷ lệ hóa nâu cao nhất ở liều chiếu xạ 40 Gy là 16,1% không khác biệt so với liều chiếu xạ 10 Gy nhưng khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các liều chiếu xạ còn lại. Tỷ lệ hóa nâu thấp nhất là 2,8% khi không chiếu xạ tia gamma.

Có sự tương tác giữa liều chiếu xạ tia gamma và nồng độ muối đến tỷ lệ hóa nâu của mô sẹo (Hình 2), tỷ lệ hóa nâu của mô sẹo cao nhất ở nghiệm thức 40 Gy – không NaCl là 24%, khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức 0-20 Gy + 15 % NaCl nhưng không khác biệt so với các nghiệm thức 40 Gy + NaCl 10‰, nghiệm thức 40 Gy + NaCl 15‰, nghiệm thức 20 Gy + NaCl 10‰ và nghiệm thức chiếu xạ 10 Gy ở mức ý nghĩa 1%.

Kết quả tương tự ghi nhận bởi Saif-Ur-Rasheed *et al.* (2001), khi liều chiếu xạ tia gamma tăng thì tỷ lệ sống của khoai tây càng giảm. Theo Trần Thị Vân Anh (2008), chiếu xạ tia gamma (^{60}Co) có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi hoa hồng ở giai đoạn *in vitro*. Tỷ lệ chồi còn sống, chiều cao chồi, số chồi, số lá giảm khi liều lượng chiếu xạ tăng lên.

Theo Vikas *et al.* (2008), tỷ lệ sống của mô sẹo giảm khi nồng độ NaCl tăng. Khi chiếu xạ tia 10 Gy và 20 Gy tỷ lệ mô sẹo tái sinh được ghi nhận ở đến nồng độ muối 85,6 mM, ở các nồng độ muối cao hơn mô sẹo bị thoái hóa và chuyển màu nâu.

Kết quả trên cho thấy mô sẹo mía được chiếu xạ tia gamma (10-40 Gy) và nồng độ muối (10-15%) trong môi trường nuôi cấy đã ảnh hưởng làm giảm tỷ lệ tái sinh chồi (đạt 1- 15%) so với đối chứng (53,8%) và tăng tỉ lệ mô sẹo hóa nâu (24%) so với đối chứng 0% ở giống mía ROC 16.

4 KẾT LUẬN

Qua kết quả thí nghiệm trên cho thấy:

- Môi trường MS + 3 mg/l 2,4-D thích hợp để kích thích tạo mô sẹo từ mô lá non.
- Chiếu xạ tia gamma (10-40 Gy) và nồng độ muối (10-15%) ở mô sẹo giống mía ROC 16 đã làm giảm tỷ lệ tái sinh chồi còn 1- 15% so với đối chứng 53,8%, đồng thời tỉ lệ mô sẹo hóa nâu tăng đến 24%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Jibouri, A.A.M, E.A. El-Kaaby and A.A. Razaak. 2006: The effect of gamma radiation on callus growth and plantlet regeneration of eight sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars *In vitro*. J.Biotechnology Research. 8(1): 84-95.
- Al-Jibouri A. A. and I. A. Al-Shamarri. 2009. Response Of Three Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Genotypes For Callus Formation And Salinity Tolerance. The 2nd Kurdistan Conference on Biological Sciences J. Duhok Univ. 12(1): 74-79.
- Attiaay, H.J. and K.A. Jaddio. 1999. Plant growth regulations–Theoretical and application. College of Agriculture – Baghdad University.
- Begum S., L. Hakim and M.A. Azam. 1995. Efficient regeneration of plants from leaf base callus sugarcane. Plant tissue Cult. 5:1-5.
- Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang. 2007. Chọn giống cây trồng phương pháp truyền thống và phân tử. NXB Nông nghiệp.
- Kambasba K. B. and S. Santilata. 2009. Rapid in vitro Micropropagation og Sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) Through Callus Culture. Nature and science, 2009; 7(4): 1-10.
- Lê Văn Huỳnh Ngọc. 2011. Ảnh hưởng của 2,4-D và NaCl đến sự tạo mô sẹo và tái sinh cây trên ba giống lúa Jasmine 85, OM 6976 và OM 6904 (*Oryza sativa* L.). Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ giống thực vật, Khoa Nông Nghiệp, Đại học Cần Thơ.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. “A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures”. *Physiol, Plant*, 15:472-497.
- Raveendar and Premkumar. 2008. Effect of sea water on callus induction ang regeneration of rice genotypes, International of Inter grative Biology, 92-95.
- Saif-Ur-Rasheed M., S. Asad and Y. Zafar. 2001. Use of radiation and *in vitro* techniques for development of salt tolerant mutant in sugacane and potato. Proceeding of a final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Sanghai, China, 17-21 August 1998.

- Trần Thị Vân Anh. 2008. Ảnh hưởng của liều lượng chiếu xạ tia gamma lên sự sinh trưởng và phát triển của hoa hồng (*Rosa hybrida*) *in vitro*. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Trồng Trọt. Khoa Nông Nghiệp, Đại học Cần Thơ.
- Vikas Y. P., P. Suprasanna and V.A. Bapat 2008. Gamma Irradiation of Embryogenic Callus Cultures and *In vitro* Selection for Salt Tolerance in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Plant Cell Culture Technology Section, Nuclear Agriculture & Biotechnology Division.
- Zainah Dauh and Chang Lai Keng. 2003. Callus induction study on salt tolerance and plant regeneration of Fujisaka 5 (*Oryza sativa* L.) Biological sciences sain Malaysia, pp 25-29.