

NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH CÂY CÀ PHÊ BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY PHÔI VÔ TÍNH

NGUYỄN TRUNG HẬU, BÙI THỊ TƯỜNG THU, TRẦN VĂN MINH

Viện Sinh học nhiệt đới

Vi nhân giống truyền thống trên loài cây thân gỗ hiện nay dẫn đến một vấn đề mà các phòng thí nghiệm vi nhân giống thường gặp phải đó là cây cấy mô thường sinh trưởng chậm và tốn rất nhiều chi phí lao động để sản xuất cây con với khối lượng lớn khi đưa ra thị trường với giá thành cây con cao. Hệ thống nhân giống bằng phôi vô tính [3] sẽ giải quyết được rào cản nêu trên với các lợi thế: nhân nhanh dưới dạng tế bào, phôi vô tính là một thể biệt hóa có hệ số tái sinh cao, tốn ít chi phí lao động và giá thành hạ. Vật liệu khởi đầu trong nuôi cấy phôi vô tính có vai trò đảm bảo được đặc điểm di truyền bố mẹ và duy trì hệ số tái sinh cao trong thời gian dài [4]. Môi trường nuôi cấy phôi vô tính thích hợp chiếm vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và biệt hóa tế bào phôi và điều khiển quá trình biệt hóa và tái sinh phôi vô tính dưới tác động của các chất điều hòa sinh trưởng đã trở thành quy luật [4].

Có hai giống cà phê quan trọng đang được trồng phổ biến là *Coffea arabica* L. và *Coffea catimora* Pierre và được nhân giống phổ biến bằng hạt. Hạt cà phê mất sức nảy mầm sau 2 năm tồn trữ. Nhánh chồi vượt dùng cho giâm cành thì có hạn và phương pháp giâm cành thường mang theo mầm bệnh từ cây mẹ ở cà phê [12].

Vi nhân giống đã được ứng dụng trong nhân nhanh cà phê và nuôi cấy phôi vô tính là kỹ thuật tiên tiến có nhiều tiềm năng phát triển nhân giống cà phê quy mô lớn [10, 11].

Nuôi cấy phát sinh và tái sinh phôi vô tính ở cây cà phê phụ thuộc vào nhiều điều kiện như tình trạng sinh lý của lá đưa vào nuôi cấy, loại mô lá [12], kích thước mẫu nuôi cấy nhỏ hay lớn, đã nuôi cấy đỉnh chồi vượt, thời gian cấy truyền [14], điều kiện khí hậu, kiểu gen [8].

Sự biệt hóa tế bào phôi vô tính cà phê được điều khiển bởi môi trường vật lý hay các chất kích thích sinh trưởng và sự cân bằng

auxin/cytokinin trong nuôi cấy [5, 13], dinh dưỡng khoáng [11]. Phôi vô tính cà phê đã được nghiên cứu về mô học [10] và đã xây dựng được phương pháp chọn dòng mô sẹo màu vàng chanh có hiệu suất phát sinh phôi vô tính cao [13].

Kỹ thuật nuôi cấy phôi và tái sinh phôi vô tính ngày càng hoàn chỉnh [6]. Van Boxtel và Berthouly [13] đã phát triển kỹ thuật nuôi cấy phát sinh, tăng sinh và tái sinh phôi vô tính từ lá cà phê. Nghiên cứu tạo mô sẹo phôi hóa, nuôi cấy tạo phôi vô tính và tái sinh phôi vô tính là rào cản đầu tiên trong công nghệ phôi vô tính cây cà phê [13].

Bài báo này nghiên cứu nhân nhanh cây cà phê bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi vô tính.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Dòng cà phê với chọn lọc K84 được sử dụng làm nguyên liệu nghiên cứu. Mẫu nuôi cấy: (i). Lá non in vitro được cắt ngang thành mảnh nhỏ có kích thước 0,1-0,5 cm; (ii). Lá chồi non thực sinh (cây 2 năm tuổi trên đồng ruộng).

Môi trường dinh dưỡng khoáng nuôi cấy là MS [9], WPM [7].

Môi trường nuôi cấy có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng: BA (6-benzylaminopurine), 2iP (2-isopentyl adenine), 2.4D (2.4-dichlorophenoxy acetic acid), IBA (β -indol butyric acid), NAA (α -naphthalene acetic acid), kinetin (6-furfurylaminopurine), than hoạt tính, casein hydrolysate, malt (lúa), nước dừa (CW-10%), B1 (10 mg/l), đường sucrose (30 g/l).

Điều kiện nuôi cấy: môi trường được vô trùng ở 121°C, 1 at, trong 25 phút. Nhiệt độ phòng 26 \pm 2°C, cường độ chiếu sáng 33,3 μ mol/m²/s, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày, tốc độ lắc là 100 rpm.

2. Phương pháp

Thiết kế thí nghiệm: bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại nuôi cấy 3 bình tam giác (chứa 60 ml môi trường bán rắn hay 50 ml môi trường lỏng). Số liệu được phân tích bằng phần mềm MSTATC ($p = 0,05$).

Chỉ số tăng sinh mô sẹo phôi hóa = $[A-B]/B$. Trong đó: A. trọng lượng tươi tại thời điểm khảo sát (g); B. trọng lượng tươi tại thời điểm ban đầu (g).

Hiệu suất hoạt hóa = $[A/B] \times 100\%$. Trong đó: A. số tế bào đã được hoạt hóa (CFU/ml) (có dạng hình cầu, van, hình tim, hình thủy lôi); B. số tế bào ban đầu (CFU/ml).

Mật độ tế bào: được đếm bằng buồng đếm hồng cầu (có cấu tạo khung đếm Thoma, bao gồm 25 ô lớn và mỗi ô lớn có 16 ô nhỏ, diện tích mỗi ô nhỏ là $1/400 \text{ mm}^2$, chiều cao mỗi ô là 0,1 mm) trong một giọt dung dịch, sau đó được tính ra trong 1 ml dung dịch với nồng độ pha loãng là 10^{-1} với công thức tính:

Số tế bào/ml mẫu = $[a \times 4000 \times 1000] / H$. Với: a. số tế bào trung bình có trong một diện tích vi trường (ô nhỏ); 4000. số quy đổi $1/400 \text{ mm}^2$ thành 1 mm^3 ; 1000. số quy đổi từ 1 mm^3 thành 1 ml; H. hệ số pha loãng.

Diện tích lá in vitro được đo ở lá thứ tư từ trên xuống bằng máy đo diện tích lá.

Chiều dài rễ và chiều cao thân chồi in vitro

được đo chiều dài rễ dài nhất và chiều cao thân cao nhất, thực hiện trong tủ vô trùng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nuôi cấy tạo mô sẹo phôi hóa

Lá non cây cà phê in vitro và lá non cây thực sinh 2 năm tuổi trên đồng ruộng được nuôi cấy trên môi trường phát sinh tạo mô sẹo phôi hóa WPM/MS + malt (400 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) có bổ sung 2,4D (2 mg/l), IBA (1 mg/l), 2iP (2 mg/l), BA (0,1-1 mg/l), trong điều kiện che tối hoàn toàn. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Trên môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo phôi hóa, mô sẹo phôi hóa xuất hiện trên môi trường khoáng cơ bản WPM/MS có bổ sung 2,4D (2 mg/l) + 2iP (2 mg/l) (bảng 1). Mô sẹo có 3 dạng và màu sắc khác nhau: trắng chứa nhiều nước (không dùng trong nuôi cấy), trắng nâu chứa nhiều nước, cả hai dạng mô sẹo này không sử dụng trong nuôi cấy và mô sẹo phôi hóa xốp có màu vàng chanh được sử dụng trong các thí nghiệm về sau sau 6 tuần nuôi cấy (bảng 2) và sinh trưởng mô sẹo phôi hóa vàng chanh thể hiện khác nhau ở các nghiệm thức sau 12 tuần nuôi cấy (bảng 3). Môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 2,4D (2 mg/l) + 2iP (2 mg/l) thích hợp nuôi cấy mẫu lá in vitro và in vivo cho tạo mô sẹo (100% và 83%), tạo mô sẹo xốp phôi hóa vàng chanh (53% và 33%) và sinh trưởng mô sẹo xốp phôi hóa vàng chanh (3,4 cm và 2,6 cm) (bảng 1, 2, 3).

Bảng 1

Ảnh hưởng của môi trường khoáng cơ bản và các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo

Môi trường khoáng cơ bản	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)	Tỷ lệ mẫu nuôi cấy tạo mô sẹo (%)	
		Lá non in vitro	Lá non thực sinh
WPM	Đối chứng	00	00
	2,4D(2) + BA(0,1)	66	36
	2,4D(2) + 2iP(2)	86	73
	2,4D(2) + BA(0,1) + IBA(1)	73	46
	2,4D(2) + 2iP(2) + IBA(1)	83	56
	2,4D(2) + 2iP(2) + BA(0,1) + IBA(1)	83	46
MS	Đối chứng	00	00
	2,4D(2) + BA(0,1)	93	66
	2,4D(2) + 2iP(2)	100	83
	2,4D(2) + BA(0,1) + IBA(1)	96	63
	2,4D(2) + 2iP(2) + IBA(1)	100	66
	2,4D(2) + 2iP(2) + BA(0,1) + IBA(1)	100	76
CV%		12	14

Đối chứng = WPM/MS + malt (400 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l).

Bảng 2

Ảnh hưởng của môi trường khoáng cơ bản và các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo phôi hóa xốp vàng chanh

Môi trường khoáng cơ bản	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)	Tỷ lệ mẫu nuôi cấy tạo mô sẹo phôi hóa xốp vàng chanh (%)	
		Lá non in vitro	Lá non thực sinh
WPM	Đối chứng	00	00
	2,4D(2) + BA(0,1)	16	13
	2,4D(2) + 2iP(2)	43	33
	2,4D(2) + BA(0,1) + IBA(1)	16	6
	2,4D(2) + 2iP(2) + IBA(1)	33	26
	2,4D(2) + 2iP(2) + BA(0,1) + IBA(1)	23	26
MS	Đối chứng	00	00
	2,4D(2) + BA(0,1)	26	16
	2,4D(2) + 2iP(2)	53	33
	2,4D(2) + BA(0,1) + IBA(1)	33	26
	2,4D(2) + 2iP(2) + IBA(1)	53	33
	2,4D(2) + 2iP(2) + BA(0,1) + IBA(1)	46	23
CV%		12	10

Đối chứng = WPM/MS + malt (400 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l).

Bảng 3

Ảnh hưởng của môi trường khoáng cơ bản và các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng sinh trưởng mô sẹo phôi hóa xốp vàng chanh

Môi trường khoáng cơ bản	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)	Sinh trưởng (đường kính mô sẹo - cm)	
		Lá non in vitro	Lá non thực sinh
WPM	2,4D(2) + BA(0,1)	1,4	0,9
	2,4D(2) + 2iP(2)	3,1	2,8
	2,4D(2) + BA(0,1) + IBA(1)	1,5	1,2
	2,4D(2) + 2iP(2) + IBA(1)	2,6	2,2
	2,4D(2) + 2iP(2) + BA(0,1) + IBA(1)	1,4	2,0
MS	2,4D(2) + BA(0,1)	1,9	1,6
	2,4D(2) + 2iP(2)	3,4	2,6
	2,4D(2) + BA(0,1) + IBA(1)	1,6	1,2
	2,4D(2) + 2iP(2) + IBA(1)	2,8	2,4
	2,4D(2) + 2iP(2) + BA(0,1) + IBA(1)	2,7	2,2
CV%		8,2	9,0

Môi trường khoáng cơ bản = WPM/MS + malt (400 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l).

2. Nuôi cấy tăng sinh mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo xốp phôi hóa (có màu vàng chanh) được nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh trên môi trường cơ bản MS + malt (800 mg/l) + casein hydrolysate (200 mg/l) có bổ sung 2,4D (1-2 mg/l), NAA (2 mg/l), 2iP (4 mg/l), BA (0,1-4 mg/l), adenine (60 mg/l), trong điều kiện che

tối. Mẫu mô sẹo phôi hóa được đưa vào nuôi cấy có khối lượng 500 mg/mẫu. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung hợp phần các chất điều hòa sinh trưởng 2,4D (1 mg/l) + 2iP (4 mg/l) + adenine (60 mg/l) thích hợp cho nuôi cấy tăng sinh mô sẹo (bảng 4) và mô sẹo xốp phôi hóa được tạo ra từ

lá non invitro có sức tăng trưởng hơn hẳn mô sẹo vàng xộp được tạo ra từ lá non thực sinh sau 6 tuần nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy có bổ sung 2.4D (1 mg/l) và 2iP (4 mg/l) có vai trò quan trọng trong nuôi cấy tăng sinh mô sẹo xộp vàng

chanh trên lá in vitro (chỉ số tăng sinh 5,81) và lá thực sinh (5,78); hiệu quả tăng sinh được cải thiện khi bổ sung thêm adenine (60 mg/l) vào môi trường nuôi cấy trên lá in vitro (chỉ số tăng sinh 11,78) và lá thực sinh (9,84).

Bảng 4

Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tăng sinh mô sẹo phôi hóa xộp vàng chanh

Môi trường nuôi cấy (mg/l)	Sự tăng sinh trọng lượng tươi mô sẹo xộp phôi hóa (mg)			
	Lá non in vitro		Lá non thực sinh	
	Trọng lượng tươi (g)	Chỉ số tăng sinh	Trọng lượng tươi (g)	Chỉ số tăng sinh
Đối chứng	0,873	0,74	0,707	0,41
2,4D(1) + BA(4)	1,767	2,53	1,877	2,75
NAA(2) + BA(4)	2,057	4,01	1,773	2,54
2,4D(2) + BA(0,1)	2,147	3,29	2,013	3,02
NAA(2) + 2iP(4)	3,360	5,72	3,070	5,14
2,4D(2) + 2iP(4)	3,407	5,81	3,393	5,78
2,4D(1) + BA(4) + Ade(60)	5,210	9,42	3,810	6,62
2,4D(1) + 2iP(4) + Ade(60)	6,393	11,78	5,420	9,84
CV%	12,2	10,4	11,8	9,6

Đối chứng= MS + malt (800 mg/l) + casein hydrolysate (200 mg/l).

3. Nuôi cấy tạo dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

a. Ảnh hưởng của khối lượng mô sẹo phôi hóa đưa vào nuôi cấy đến tạo dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo xộp phôi hóa sau 4 lần cấy truyền được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng tế bào mô sẹo phôi hóa (10-20-30-40-50 g/l) được đưa vào môi trường nuôi cấy ban đầu tạo dịch huyền phù trên môi trường MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + 2.4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 14 ngày nuôi cấy, khối lượng tế bào 20 g/100 ml môi trường nuôi cấy thích hợp cho tạo dịch huyền phù tế bào sau 14 ngày nuôi cấy có chỉ số tăng sinh 1,05 (bảng 5); khối lượng 10 g/100 ml có thể tích tế bào lắng thấp dẫn đến khả năng tăng sinh thấp 0,90; khối lượng 30-40-50 g/100 ml có thể tích tế bào lắng cao dẫn đến khả năng tăng sinh thấp 0,78-0,72-0,46. Khối lượng tế bào đưa vào nuôi cấy ban đầu 20 g/100 ml có thể tích tế bào lắng ban đầu 1,873 ml sau 14 ngày có thể tích lắng 3,847 ml và chỉ số tăng sinh 1,05 thích hợp cho nuôi cấy tạo dịch huyền phù.

Bảng 5

Ảnh hưởng của khối lượng tế bào mô sẹo phôi hóa nuôi cấy ban đầu đến tạo dịch huyền phù tế bào (sau 14 ngày nuôi cấy)

Khối lượng mô sẹo đưa vào nuôi cấy (g/100 ml)	Thể tích tế bào lắng (ml) ban đầu	Thể tích tế bào lắng (ml) sau 14 ngày	Chỉ số tăng sinh
10	0,92	1,752	0,90
20	1,873	3,847	1,05
30	2,712	4,845	0,78
40	3,675	6,240	0,72
50	4,562	6,691	0,46
CV%		12,2	8,4

b. Động thái sinh trưởng dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo xộp phôi hóa sau 4 lần cấy truyền được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng mẫu đưa vào nuôi cấy ban đầu là 20 g/100 ml thể tích môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tạo dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa là MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + 2.4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l). Kết quả nghiên cứu

cho thấy: Trên môi trường nuôi cấy tế bào mô sẹo phôi hóa được đánh tách rời trong môi trường lỏng, hình thành dịch huyền phù sau 2 tuần nuôi cấy. Có tốc độ tăng sinh 1,36 lần sau 35 ngày nuôi cấy (bảng 6) và cũng là thời điểm thích hợp cấy truyền dịch huyền phù tế bào. Động thái tế bào sinh trưởng chậm vào ngày 0-7, giai đoạn tăng theo cấp số nhân vào ngày thứ 14-21, giai đoạn tăng sinh cao nhất vào ngày thứ 28-35 sau cấy và sau đó giảm dần.

Bảng 6

Động thái tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa (sau 6 tuần nuôi cấy)

Thời gian (ngày)	Thể tích tế bào lắng (ml)	Chỉ số tăng sinh
0	1,873	0,00
7	2,721	0,42
14	3,847	1,05
21	4,210	1,24
28	4,360	1,32
35	4,421	1,36
42	4,124	1,20
CV%	11,6	9,2

4. Nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa

a. Ảnh hưởng của đường (sucrose) đến nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo xộp phôi hóa sau 4 lần cấy truyền được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng mẫu đưa vào nuôi cấy ban đầu là 20 g/100 ml thể tích môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa là MS + malt (200 mg/l) +

casein hydrolysate (100 mg/l) + 2.4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l) có bổ sung đường sucrose (20-30-40 g/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy (sau 14 ngày nuôi cấy), nồng độ đường 30 g/l sucrose thích hợp cho tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa (bảng 7). Nồng độ đường thấp (20 g/l) và cao (40 g/l) có chỉ số tăng sinh thấp (0,73 và 0,63). Bổ sung vào môi trường nuôi cấy 30 g/l đường sucrose thích hợp cho nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa có chỉ số tăng trưởng 1,05.

Bảng 7

Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose đến tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa (sau 14 ngày nuôi cấy)

Nồng độ đường sucrose (g/l)	Thể tích tế bào lắng (ml) sau 14 ngày	Chỉ số tăng sinh
20	3,242	0,73
30	3,847	1,05
40	3,067	0,63
CV%	12,2	10,8

b. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo xộp phôi hóa sau 4 lần cấy truyền

được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng mẫu đưa vào nuôi cấy ban đầu là 20 g/100 ml thể tích môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào

mô sẹo phôi hóa là MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng 2,4D (1 mg/l), NAA (1 mg/l), 2iP (2 mg/l), BA (2 mg/l), kinetin (1 mg/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy (sau 14 ngày nuôi cấy), môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung 2,4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l) thích hợp cho tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa (bảng 8). Bổ sung vào môi trường nuôi cấy tổ hợp 2,4D (1 mg/l) và 2iP (2

mg/l) thích hợp cho nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù (0,85); tương tự khi bổ sung kinetin (1 mg/l) có hiệu quả tăng sinh được cải thiện (1,05) sau 14 ngày nuôi cấy. Adenin (60 mg/l) có vai trò cải thiện tăng sinh mô sẹo phôi hóa (bảng 4), kinetin có vai trò cải thiện tăng sinh dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa (bảng 8). Môi trường nuôi cấy tăng sinh thích hợp có bổ sung 2,4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l) có thể tích lắng 3,847 ml và chỉ số tăng trưởng 1,05.

Bảng 8

Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến sự tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa (sau 14 ngày nuôi cấy)

Môi trường nuôi cấy + bổ sung	Thể tích tế bào lắng (ml) sau 14 ngày	Chỉ số tăng sinh
Đối chứng	2,412	0,28
2,4D(1) + BA(2)	2,836	0,51
2,4D(1) + 2iP(2)	3,472	0,85
NAA(1) + BA(2)	2,661	0,42
NAA(1) + 2iP(2)	2,813	0,50
2,4D(1) + 2iP(2) + Ki(1)	3,847	1,05
2,4D(1) + BA(2) + Ki(1)	3,481	0,86
CV%	12,0	10,4

Đối chứng = MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l).

5. Hoạt hóa tái sinh trong môi trường lỏng

a. *Ảnh hưởng của số lần cấy truyền mô sẹo đến nuôi cấy hoạt hóa dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa*

Mô sẹo xấp phôi hóa sau 4 lần cấy truyền được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng mẫu đưa vào nuôi cấy ban đầu là 20 g/100 ml ($1,2 \times 10^4$ CFU/ml) thể tích môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa là MS + casein

hydrolysate (400 mg/l) + adenine (40 mg/l) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA (4 mg/l), kinetin (1 mg/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy (sau 4 tuần nuôi cấy), số lần cấy truyền mô sẹo là 3-4 cho chỉ số hoạt hóa dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa 75% (bảng 9), số lần cấy truyền thứ 1-2 có hiệu suất hoạt hóa (50,0-58,3%), số lần cấy truyền thứ 5 có hiệu suất hoạt hóa giảm (50%). Số lần cấy truyền lần thứ 4 có mật độ tế bào hoạt hóa cao ($0,9 \times 10^4$ tế bào/ml) và hiệu suất hoạt hóa cao (75%).

Bảng 9

Ảnh hưởng của lần cấy truyền mô sẹo đến nuôi cấy hoạt hóa dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Số lần cấy chuyển (lần)	Mật độ tế bào hoạt hóa (CFU/ml) sau 4 tuần	Hiệu suất hoạt hóa (%) so với mật độ ban đầu
1	$0,6 \times 10^4$	50,0
2	$0,7 \times 10^4$	58,3
3	$0,9 \times 10^4$	75,0
4	$0,9 \times 10^4$	75,0
5	$0,6 \times 10^4$	50,0
CV%	14,6	14,2

b. Ảnh hưởng của khối lượng tế bào nuôi cấy ban đầu đến nuôi cấy hoạt hóa tái sinh dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo xếp phôi hóa sau 4 lần cấy truyền được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng mẫu đưa vào nuôi cấy ban đầu là 10-20-30-40-50 g/100 ml thể tích môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa là MS + casein hydrolysate (400 mg/l) + adenine (40 mg/l) có bổ sung chất điều

hòa sinh trưởng BA (4 mg/l), kinetin (1 mg/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy (sau 4 tuần nuôi cấy): khối lượng tế bào đưa vào nuôi cấy ban đầu là 20 g/100 ml môi trường nuôi cấy cho hiệu suất hoạt hóa cao 75% (bảng 10); khối lượng tế bào đưa vào nuôi cấy ban đầu thấp hơn (10 g/100 ml) hay cao (30-40-50 g/100 ml) đều cho hiệu suất hoạt hóa thấp (66,7% và 64,7-52,0-39,2%). Khối lượng tế bào đưa vào nuôi cấy ban đầu 20 g/100 ml có mật độ tế bào hoạt hóa cao ($0,9 \times 10^4$ tế bào/ml) và hiệu suất hoạt hóa cao (75%).

Bảng 10

Ảnh hưởng của khối lượng tế bào nuôi cấy ban đầu đến nuôi cấy hoạt hóa dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa

Khối lượng mẫu cấy (g/100ml)	Mật độ tế bào ban đầu (CFU/ml)	Mật độ tế bào hoạt hoá (CFU/ml) sau 4 tuần	Hiệu suất hoạt hoá (%) so với mật độ ban đầu
10	$0,9 \times 10^4$	$0,6 \times 10^4$	66,7
20	$1,2 \times 10^4$	$0,9 \times 10^4$	75,0
30	$1,7 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	64,7
40	$2,5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	52,0
50	$2,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	39,2
CV%		12,4	11,8

c. Ảnh hưởng của đường sucrose đến nuôi cấy hoạt hóa tái sinh dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo xếp phôi hóa sau 4 lần cấy truyền được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng mẫu đưa vào nuôi cấy ban đầu là 20 g/100 ml thể tích môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa là MS + casein hydrolysate (400

mg/l) + adenine (40 mg/l) + sucrose (20-30-40-50 g/l) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA (4 mg/l), kinetin (1 mg/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy (sau 4 tuần nuôi cấy), nồng độ đường 30 g/l sucrose cho hiệu suất hoạt hóa cao 75% (bảng 11) so với nồng độ đường 20-40-50 g/l có hiệu suất hoạt hóa 50,0-58,3-33,3%. Môi trường nuôi cấy có bổ sung 30 g/l đường sucrose kích thích hoạt hóa tế bào ($0,9 \times 10^4$ tế bào/ml) và hiệu suất hoạt hóa cao (75%).

Bảng 11

Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose đến nuôi cấy hoạt hóa dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Nồng độ đường sucrose (g/l)	Mật độ tế bào hoạt hóa (CFU/ml) sau 4 tuần	Hiệu suất hoạt hóa (%) so với mật độ ban đầu
20	$0,6 \times 10^4$	50,0
30	$0,9 \times 10^4$	75,0
40	$0,7 \times 10^4$	58,3
50	$1,1 \times 10^4$	33,3
CV%	12,8	10,6

d. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng nuôi cấy hoạt hóa tái sinh dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo xếp phôi hóa sau 4 lần cấy truyền được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng mẫu đưa vào nuôi cấy ban đầu là

20 g/100 ml thể tích môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa là MS + casein hydrolysate (400 mg/l) + adenine (40 mg/l) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Kết quả nghiên cứu cho thấy (sau 4 tuần nuôi cấy), môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung BA (4 mg/l) + kinetin

(1 mg/l) cho hiệu suất hoạt hóa cao 75% (bảng 12). Môi trường nuôi cấy có bổ sung 2.4D và 2iP có vai trò tăng sinh mô sẹo phôi hóa (bảng 4) và tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa (bảng 8); BA và kinetin có vai trò hoạt hóa tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa (bảng 12).

Bảng 12

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng nuôi cấy hoạt hóa tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Môi trường + bổ sung	Mật độ tế bào hoạt hóa (CFU/ml)	Hiệu suất hoạt hóa (%) so với mật độ ban đầu
Đối chứng	0	0
BA(4)	$0,5 \times 10^4$	41,7
BA(4) + Ki(1)	$0,9 \times 10^4$	75,0
BA(4) + Ki(1) + TDZ(1)	$0,7 \times 10^4$	58,3
2iP(4)	$0,4 \times 10^4$	33,3
2iP(4) + Ki(1)	$0,5 \times 10^4$	41,7
2iP(4) + Ki(1) + TDZ(1)	$0,6 \times 10^4$	50,0
CV%	14,6	12,2

Đối chứng= MS + casein hydrolysate (400 mg/l) + adenine (40 mg/l) + sucrose (30 g/l).

6. Tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

a. Ảnh hưởng của thời gian hoạt hóa đến tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Dịch huyền phù tế bào mô sẹo đã được biệt hóa được nuôi cấy trên môi trường tái sinh MS có bổ sung BA (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian hoạt hóa càng kéo dài (7-8 tuần), tế bào mô sẹo phôi hóa

thứ cấp càng tạo ra nhiều (mật độ tế bào hoạt hóa thấp $0,8 \times 10^4$ tế bào/ml) dẫn đến hiệu suất tái sinh thấp (90-72 chồi/5 ml). Thể hiện qua số tuần hoạt hóa 5-7-8 tuần, có mật độ tế bào giống nhau ($0,8 \times 10^4$ tế bào/ml), nhưng số chồi tái sinh ở tuần 7-8 (90-72 chồi/5 ml) cao hơn ở tuần thứ 5 (52 chồi/5 ml). Thời gian hoạt hóa 6 tuần cho hiệu suất tái sinh cao 97 chồi (bảng 13) với thể tích trải dịch huyền phù là 5 ml/60 ml môi trường nuôi cấy bán rắn (bình tam giác 300 ml).

Bảng 13

Ảnh hưởng của thời gian hoạt hóa đến tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Thời gian (tuần)	Mật độ tế bào hoạt hóa (CFU/ml)	Số chồi tái sinh (cây)/5 ml dịch huyền phù tế bào phôi hóa
Không hoạt hóa	0	0
1	$0,1 \times 10^4$	12
2	$0,4 \times 10^4$	22
3	$0,6 \times 10^4$	25
4	$0,9 \times 10^4$	41
5	$0,8 \times 10^4$	52
6	$0,9 \times 10^4$	97
7	$0,8 \times 10^4$	90
8	$0,8 \times 10^4$	72
CV%	12,0	10

Đối chứng (không hoạt hóa) = MS + sucrose (30g/l).

b. *Ảnh hưởng của thể tích trái tế bào đến tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa*

Dịch huyền phù tế bào mô sẹo đã được biệt hóa được nuôi cấy trên môi trường tái sinh MS có bổ sung BA (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l).

Kết quả nghiên cứu cho thấy (sau 6 tuần nuôi cấy), với thể tích trái dịch huyền phù là 5 ml/60 ml môi trường nuôi cấy bán rắn (bình tam giác 300 ml) thì thời gian hoạt hóa 6 tuần cho hiệu suất tái sinh cao 97 chồi/5 ml dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa (bảng 14).

Bảng 14

Ảnh hưởng của thể tích trái tế bào đến tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Thể tích dịch huyền phù tế bào trái tái sinh (ml)	Số chồi tái sinh/5 ml dịch huyền phù tế bào phôi hóa
5	97
10	92
15	44
20	14
CV%	10,8

Đối chứng (không hoạt hóa) = MS + sucrose (30 g/l).

c. *Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa*

Dịch huyền phù tế bào mô sẹo đã được biệt hóa được nuôi cấy trên môi trường tái sinh MS có bổ sung BA (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy (sau 6 tuần nuôi cấy),

môi trường nuôi cấy có bổ sung BA (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l) cho hiệu suất tái sinh cao (bảng 15) với thể tích trái dịch huyền phù là 5 ml/60 ml môi trường nuôi cấy bán rắn (bình tam giác 300 ml) có hiệu suất tái sinh 97 chồi/5 ml. Thu nhận 19.400 cây cà phê phôi /1 lít dịch huyền phù tế bào phôi vô tính.

Bảng 15

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tái sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa

Môi trường nuôi cấy (mg/l)	Số chồi tái sinh /5ml dịch huyền phù tế bào phôi hóa
Đối chứng	16
BA(0.1)	25
BA(1)	22
BA(2) + Ki(1).	55
BA(2) + NAA(1) +Ki(1)	52
BA(4) + Ki(1)	97
BA(4) + NAA(1) + Ki(1)	64
CV%	12

Đối chứng (không hoạt hóa) = MS + sucrose (30 g/l).

7. Sinh trưởng cây cà phê từ phôi in vitro

Mẫu nuôi cấy là cây cà phê tái sinh từ phôi, được nuôi cấy trên môi trường sinh trưởng WPM/MS + kinetin (1 mg/l) + than hoạt tính (1 g/l) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường nuôi cấy

MS có bổ sung BA (0,5 mg/l) cho kết quả sinh trưởng tốt sau 8 tuần nuôi cấy (bảng 16, 17) với số lá thật (6 lá/chồi), diện tích lá lớn nhất (4,8 cm²), chiều cao thân (4 cm) và chiều dài rễ (5,2 cm), đây là thời điểm thích hợp đưa cây cà phê từ phôi ra vườn thuần hóa.

Bảng 16

Ảnh hưởng của môi trường khoáng cơ bản và chất điều hòa sinh trưởng đến sinh trưởng cây cà phê từ phôi in vitro

Môi trường khoáng	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)	Số lá thật/chồi (lá)	Diện tích lá lớn nhất (cm ²)	Chiều cao thân (cm)	Chiều dài rễ (cm)
WPM	Đối chứng	0	-	1,2	0,8
	BA(0.1)	2	1,8	1,8	1,8
	BA(0.5)	6	3,6	3,8	5,5
	BA(1)	4	2,5	2,8	4,5
	BA(1) + NAA(0.5)	2	0,7	2,5	6,2
	BA(2) + NAA(0.5)	0	-	1,2	0,0
MS	Đối chứng	2	1,1	1,8	3,5
	BA(0.1)	4	2,4	2,6	4,8
	BA(0.5)	6	4,8	4,0	5,2
	BA(1)	4	2,2	2,6	5,0
	BA(1) + NAA(0.5)	2	1,8	2,5	5,8
	BA(2) + NAA(0.5)	0	-	1,5	0,0
CV%		8	15,4	12,6	12,2

Đối chứng = WPM/MS + Ki(1 mg/l) + sucrose (30 g/l) + than hoạt tính (1 g/l).

Bảng 17

Động thái sinh trưởng chồi cà phê trên môi trường MS + BA (0,5 mg/l)

Thời gian (tuần)	Số lá thật (lá)	Diện tích lá thật lớn nhất (cm ²)	Chiều cao thân (cm)	Chiều dài rễ (cm)
2	0	-	1,5	0,7
4	2	1,8	2,1	1,6
6	4	4,2	2,7	4,2
8	6	4,8	4,0	5,2
10	6	4,8	4,3	7,4
12	8	4,8	5,1	12,0
CV%	9	14,6	11,8	12,8

III. KẾT LUẬN

Lá cây cà phê non cấy mô và cây thực sinh 2 năm tuổi được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 2.4D (2 mg/l) + 2iP (2 mg/l) thích hợp nuôi cấy mẫu lá in vitro và in vivo cho tạo mô sẹo (100% và 83%), tạo mô sẹo xấp xỉ phôi hóa vàng chanh (53% và 33%) và sinh trưởng mô sẹo xấp xỉ phôi hóa vàng chanh (3,4 cm và 2,6 cm).

Nuôi cấy tăng sinh mô sẹo phôi hóa vàng chanh: Môi trường nuôi cấy MS có bổ sung 2.4D (1 mg/l) và 2iP (4 mg/l) thích hợp trong nuôi cấy tăng sinh mô sẹo xấp xỉ vàng chanh trên lá in vitro (chỉ số tăng sinh 5,81) và lá thực sinh (5,78); hiệu quả tăng sinh được cải thiện khi bổ

sung thêm adenine (60 mg/l) vào môi trường nuôi cấy trên lá in vitro (chỉ số tăng sinh 11,78) và lá thực sinh (9,84).

Nuôi cấy tạo dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa: Môi trường nuôi cấy MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + 2.4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l) có khối lượng tế bào đưa vào nuôi cấy ban đầu 20 g/100 ml có thể tích tế bào lắng ban đầu 1,873 ml, sau 14 ngày có thể tích lắng 3,847 ml và chỉ số tăng sinh 1,05 thích hợp cho nuôi cấy tạo dịch huyền phù. Động thái tế bào sinh trưởng chậm vào ngày 0-7, giai đoạn tăng theo cấp số nhân vào ngày thứ 14-21, giai đoạn tăng sinh cao nhất vào ngày thứ 28-35 sau cấy và sau đó giảm dần.

Nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù: Môi

trường nuôi cấy MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + 2.4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l) có bổ sung 30 g/l đường sucrose thích hợp cho nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa có thể tích lắng 3,847ml và chỉ số tăng sinh 1,05.

Nuôi cấy hoạt hóa tái sinh dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa trong lỏng: Môi trường nuôi cấy MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + BA (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l) có bổ sung dịch huyền phù có số lần cấy truyền lần thứ 4, khối lượng tế bào đưa vào nuôi cấy 20 g/100ml, 30 g/l đường sucrose, có mật độ tế bào hoạt hóa cao ($0,9 \times 10^4$ tế bào/ml) và hiệu suất hoạt hóa cao (75%).

Nuôi cấy tái sinh mô sẹo phôi hóa: Môi trường nuôi cấy MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + BA (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l) có bổ sung dịch huyền phù tế bào có thời gian hoạt hóa 6 tuần, thể tích trải tế bào dịch huyền phù 5 ml/60 ml, có hiệu suất tái sinh chồi 97 chồi/5 ml dịch huyền phù.

Sinh trưởng chồi in vitro: Môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (0,5 mg/l) cho kết quả sinh trưởng tốt sau 8 tuần nuôi cấy với số lá thật (6 lá/chồi), diện tích lá lớn nhất (4,8 cm²), chiều cao thân (4 cm) và chiều dài rễ (5,2 cm), đây là thời điểm thích hợp đưa cây cà phê từ phôi ra vườn thuần hóa.

Đã nghiên cứu nhân nhanh cây cà phê bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi vô tính với hiệu suất thu nhận 19.400 cây cà phê/1 lít dịch huyền phù tế bào phôi hóa.

Lời cảm ơn: Chân thành cảm ơn Văn phòng Các chương trình trọng điểm cấp nhà nước và Chương trình Công nghệ sinh học KC04 đã cấp kinh phí thực hiện đề tài KC04.15/06-10 “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ bioreactor, công nghệ lớp mỏng tế bào và phôi vô tính phục vụ nhân nhanh một số giống cây trồng có giá trị ở quy mô công nghiệp”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Albarran J., Bertrand B., Lartaud M., Etienne H.**, 2005: Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant, Cell, Tissue and*
2. **Barry-Etienne D., Bertrand B., Vasquez N., Etienne H.**, 1999: Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-induced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Rep.*, 19: 111-117.
3. **Berthouly M., Etienne H.**, 1999: Somatic embryogenesis in coffee. In: Jain SM, Gupta PK and Newton RJ (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plant*, Kluwer: 259-287.
4. **Boxtel J. V., Berthouly M.**, 1996: High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8: 73-81.
5. **Gaj M. D.**, 2004: Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Reg.*, 43: 27-47.
6. **Gatica-Arias A. M., Arrieta-Espinoza G., Esquivel A. M. E.**, 2008: Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catua. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1): 1-12.
7. **Lloyd G., McCown B.**, 1980: Commercially feasible micropropagation of laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Crop Soc.*, (30): 421-427.
8. **Molina D. M., Aponte M. E., Cortina H., Moreno G.**, 2002: The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 117-123.
9. **Murashige T., Skoog R.**, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, (15): 431-497.
10. **Quiroz-Figueroa F. R., Fuentes-Cerda CFJ, Rojas-Herrera R., Loyola-Vargas V. M.**, 2002: Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis

- systems of *Coffea arabica*. Plant Cell Rep., 20: 1141-1149.
11. **Samson N.P., Campa C., Le Gal L., Noiroto M., Thomas G., Lokeswari T. S., de Kochko A.**, 2006: Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86: 37-45.
 12. **Santana N. et al.**, 2004: Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant, 40: 95-101.
 13. **Van Boxel J., Berthouly M.**, 1996: High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing callogenesis, and subsequent multiplication and regeneration in liquid medium. Plant Cell Tissue Organ Cult., 44: 7-17.
 14. **Yasuda T., Fujii Y., Yamaguchi T.**, 1985: Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiol., 26: 595-597.

MICROPROPAGATION OF *COFFEA* SP. BY SOMATIC EMBRYOGENESIS CULTURES TECHNIQUE

NGUYEN TRUNG HAU, BUI THI TUONG THU, TRAN VAN MINH

SUMMARY

Coffee-leaves of in vitro plantlets and 2-year old plants were used as cultured materials. Callus was initiated on the medium MS + 2.4D (2 mg/l) + 2iP (2 mg/l) having rate of initiation 100% and 83%, induction 53% and 33% and growing 3.4 cm and 2.6 cm.

Callus was proliferated on the medium MS + 2.4D (1 mg/l) + 2iP (4 mg/l) + adenine (60 mg/l) having growth rate index of yellow soft-callus on leaves of in vitro and in vivo were 5.81 and 5.78. The growth rate was enhanced when it's supplemented more with 60 mg/l adenine giving rate index of 11.78 and 9.84.

Somatic cell suspension were induced on the medium MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + 2.4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l) having early cultivation of cell mass 20 g/100ml in the volume of cell 3.847ml and growth rate index 1.05. The dynamic of cell suspension growth were determined in low growth in date of 0-7 days after culture, logarithm growth in 14-27 days and reach the highest growth in 28-35 days and declined afterward.

Somatic cell suspension were proliferated on the medium MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + 2.4D (1 mg/l) + 2iP (2 mg/l) + kinetin (1 mg/l) supplemented with 30 g/l sucrose having the cell volume 3.847ml and growth rate index 1.05.

Somatic cell suspension were differentiated to embryogenesis cell suspension on the medium MS + casein hydrolysate (400 mg/l) + adenine (40 mg/l) + BA (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l) supplemented with somatic cell suspension at 4 subcultures, early mass cell cultivation at 20 g/100 ml, 30 g/l sucrose having cell density stimulation 0.9×10^4 cell/ml and stimulation index 75% transformed to embryogenesis cell.

Embryogenesis cell suspension were plated and regenerated on the medium MS + malt (200 mg/l) + casein hydrolysate (100 mg/l) + BA (4 mg/l) + kinetin (1 mg/l) with cell suspension at 6 weeks of cultivation, the volume plated with 5 ml/60 ml having rate of regeneration of 97 shoots/5ml embryogenesis cell suspension.

Shoots growth and development in vitro on the medium MS + BA (0.5 mg/l) having good growth after 8 weeks with 6 leaves/shoot, leaves size 4.8 cm², shoot height 5.2 cm and it was favoured time to acclimatization nursery.

Micropropagation of *Coffea* sp. via embryogenesis cultures technique was set up to produce 19,400 plants per liter of embryogenic embryo suspension.

Ngày nhận bài: 2-8-2010