



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0029474

(51)⁷ A01H 4/00

(13) B

(21) 1-2016-02094

(22) 19/11/2014

(86) PCT/US2014/066453 19/11/2014

(87) WO2015/077365 28/05/2015

(30) 1320387.2 19/11/2013 GB

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/08/2016 341A

(73) MARS, INCORPORATED (US)

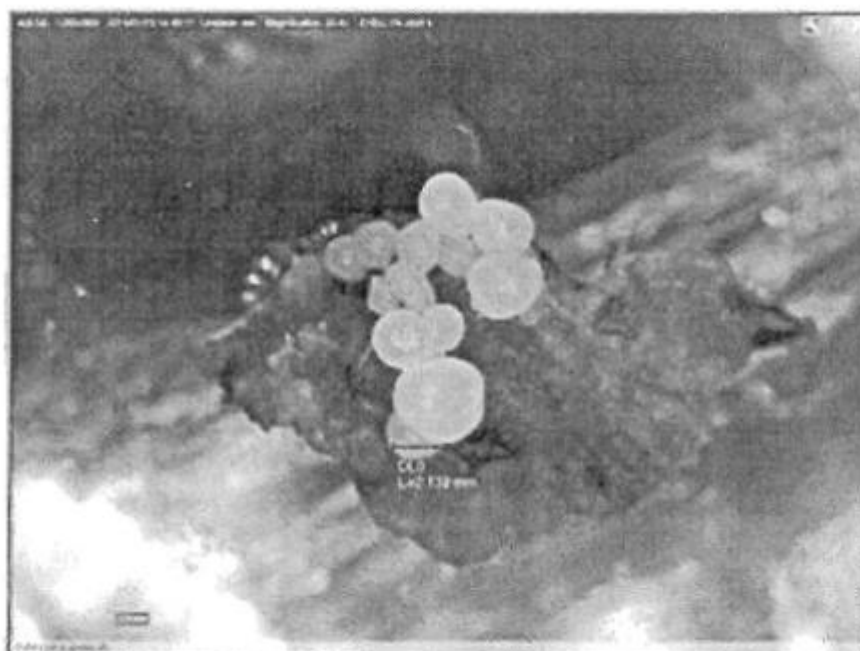
6885 Elm St., McLean, VA 22101, United States of America

(72) GARCIA ROJAS, Claudia, Yanet (CO); DIAS, Cristiano, Villela (BR); MARELLI, Jean-Philippe (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG THEOBROMA CACAO L.

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao* L..



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao in vitro*. Quy trình này bao gồm bước nhân bội *in vitro* phôi soma trực tiếp (DSE-direct somatic embryos) hoặc phôi soma gián tiếp (ISE-indirect somatic embryos) bằng cách phát sinh phôi soma trực tiếp, và tái sinh thực vật, cũng như thực vật ca cao, thực vật có quả ca cao, và nguyên liệu thực vật ca cao thu được. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình xử lý quả thực vật ca cao để thu được sản phẩm chứa ca cao, đặc biệt là sản phẩm chứa ca cao dùng làm thực phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theobroma cacao L. là cây trồng nhiệt đới mọc tự nhiên ở các khu vực râm mát của các cánh rừng mưa nhiệt đới ở vùng Amazon. Các sản phẩm phụ của ca cao như bơ và bột được tạo ra là các thành phần chính của sôcôla, và chứa các chất dinh dưỡng quan trọng, như polyphenol và flavonoid, và các hợp chất khác. Tuy nhiên, năng suất hạt ca cao đang giảm do thực tế nhiều đồn điền đã lạc hậu và không hiệu quả. Quá trình nhân giống ca cao được thực hiện bằng các phương pháp truyền thống, như ghép cành hoặc cắt rễ, nhưng các phương pháp này không thích hợp để thu được nhiều nguyên liệu nhân giống có độ ổn định di truyền và sức khỏe thực vật mong muốn.

Trong việc tìm kiếm giải pháp cho vấn đề này, phương pháp phát sinh phôi soma là một trong các phương pháp sinh dưỡng để nhân giống ca cao có thể tạo ra nhiều nguyên liệu nhân giống có chất lượng cao. Phôi soma được tạo ra từ tế bào thực vật mà bình thường không tham gia vào phát triển phôi, tức là mô thực vật bình thường. Các ứng dụng của phương pháp phát sinh phôi soma bao gồm: nhân giống vô tính nguyên liệu thực vật đồng nhất về mặt di truyền; loại bỏ virus; cung cấp các mô nguồn để chuyển gen; tái sinh toàn bộ thực vật từ các tế bào đơn lẻ; và phát triển công nghệ hạt giống tổng hợp.

Phương pháp phát sinh phôi soma là phương pháp nhân giống vô tính ở các tế bào chức năng trong mô soma có thể phát triển thành phôi, sau đó biến đổi thành thực vật. Trong quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp, tế bào có nguồn gốc từ mô nguồn chức năng có thể được nuôi cấy để tạo ra tổ chức tế bào chưa biệt hóa tế bào được gọi là mô sẹo. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong môi trường nuôi cấy mô có thể được sử

dụng để cảm ứng tạo mô sẹo, sau đó được cấy chuyển để cảm ứng phôi để tạo ra từ mô sẹo. Tỷ lệ của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau cần để cảm ứng tạo mô sẹo và hình thành phôi thay đổi theo loài thực vật.

Phương pháp này có nhiều ưu điểm, do có thể thu được nhiều nguyên liệu trồng sạch bệnh có đặc tính nông học và độ ổn định di truyền cao. Tuy nhiên, các kỹ thuật nuôi cấy mô có thể phức tạp và có sự khác biệt đáng kể giữa các quy trình và điều kiện cần để tạo ra để tạo ra các loài hoặc loại thực vật khác nhau.

Cho đến nay hầu hết các quy trình nhân giống cao thông qua quá trình phát sinh phôi soma sử dụng kỹ thuật phát sinh phôi gián tiếp (Maximova et al., 2002 *In Vitro Cell Dev. Biol Plant* 38:252-259 và WO2009/071254) trong đó mô sẹo chưa biệt hóa thu được là nguồn phôi sơ cấp.

WO2009/071254 đề cập đến phương pháp nhân giống *Theobroma cacao* L. bằng quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp trong môi trường rắn hoặc môi trường lỏng nụ hoa và lá ca cao, bao gồm các bước:

i) phát sinh phôi sơ cấp trong bóng tối trong môi trường nuôi cấy rắn trong 5 đến 5 tuần để cảm ứng và biểu hiện để tạo ra phôi sơ cấp,

ii) phát sinh phôi thứ cấp

(a) trong đó phôi sơ cấp được xử lý trong bóng tối trong môi trường nuôi cấy rắn hoặc môi trường nuôi cấy lỏng trong 10 đến 25 tuần để phát sinh và tạo ra nhiều mô sẹo, sau đó

(b) xử lý mô sẹo thu được trong bóng tối trong môi trường nuôi cấy lỏng thích hợp trong 1 đến 6 tuần để biểu hiện phát sinh phôi mô sẹo để tiếp tục tạo ra phôi thứ cấp mới,

iii) nảy mầm sớm phôi thứ cấp trên đĩa petri trong môi trường rắn, hoặc trong thiết bị phản ứng sinh học trong môi trường lỏng trong 3 đến 12 tuần, thành phôi thứ cấp đã được nảy mầm sớm ở giai đoạn lá mầm,

iv) nảy mầm *ex vitro* phôi thứ cấp đã được nảy mầm sớm ở giai đoạn lá mầm bằng cách gieo trực tiếp lên giá thể trong nhà kính để tạo ra cây con, và

v) phát triển cây con.

Tuy nhiên, các phương pháp này cần thời gian dài để thu được phôi soma và thực vật đã được tái sinh, và có thể tạo ra nhiều phôi không bình thường. Hơn nữa, do sự phụ thuộc vào hình thành mô sẹo, nên có thể tạo ra nhiều biến dị dòng soma ở các thực vật đã được tái sinh.

Trong phương pháp phát sinh phôi trực tiếp, phôi soma có thể có nguồn gốc từ mô thực vật chứa tế bào biệt hóa. Tế bào biệt hóa có thể bao gồm tế bào chức năng, như tế bào biệt hóa của mô sẹo tạo ra trên biểu bì thực vật, ví dụ trong phản ứng với vết thương. Do đó, tế bào biệt hóa của mảnh cấy được sử dụng trong quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp là khác với mô sẹo chưa biệt hóa được sử dụng trong quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp. Phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy các mảnh cấy trong môi trường chỉ bổ sung xytokinin, hoặc hỗn hợp auxin và xytokinin (Dublin, *Café Cacao Thé*, Paris, 25(4), 237-241, 1981; Pierson et al., *Protoplasma* 115, 208 đến 216, 1983). Một số nhà nghiên cứu, như Dublin (1981), cho rằng quy trình nhân giống bằng cách phát sinh phôi soma trực tiếp là thích hợp để duy trì độ ổn định của kiểu gen thể cho ở một số loài, như cà phê.

Thông thường quy trình nhân giống bằng cách phát sinh phôi soma trực tiếp bao gồm các bước sau:

- i) Cảm ứng phát sinh phôi soma trực tiếp
- ii) Phát triển phôi soma
- iii) Nhân bội phôi soma trực tiếp
- iv) Nảy mầm phôi soma
- v) Biến đổi phôi soma thành thực vật.

Tuy nhiên, kỹ thuật nhân giống cao này vẫn có nhược điểm. Ví dụ theo bài báo Litz, R. E. ("*Tissue Culture Studies with T. cacao*," *Cacao Biotechnology Symposium*, Pennsylvania State University, U.S.A. 1986), tần suất tạo phôi soma thấp từ lá non thu được bằng cách sử dụng môi trường bán rắn MS (Murashige and Skoog, 1962), có bổ sung sucroza, và nồng độ cao của auxin tổng hợp axit 2,4-điclophenoxyaxetic (2,4-D) và xytokinin tổng hợp 6-benzylaminopurin (BAP). Phôi soma chỉ được phát triển đến giai đoạn hình tim. Một số phôi trực tiếp được quan sát ở gốc các mảnh cấy cánh tràng hoa non từ hoa cao chưa trưởng thành sau 3 tuần nuôi cấy (Sondahl, M. R. et al. "*Somatic*

Embryogenesis and Plan Regeneration of cacao.” *Acta Hort.* Republic of South Africa. 1993), khi sinh trưởng trong môi trường lỏng chứa các hỗn hợp khác nhau của 6-benzylaminopurin (BAP), axit indol-3-axetic (IAA), axit gibberellic (GA3), axit abscisic (ABA), và 2,4-D, có bổ sung nước dừa và để trong bóng tối. Phản ứng này phụ thuộc vào kiểu gen.

Patent Mỹ số 6,197,587 đề cập đến phương pháp bao gồm các bước (i) cảm ứng phát sinh phôi soma gián tiếp từ các mảnh cây mô ca cao, và (ii) tái sinh cây ca cao từ phôi soma thu được. Môi trường nuôi cấy mô sử dụng trong phương pháp này, bao gồm môi trường sinh trưởng mô sẹo sơ cấp, môi trường sinh trưởng mô sẹo thứ cấp, môi trường phát triển phôi, môi trường biến đổi phôi sơ cấp, môi trường biến đổi phôi thứ cấp, và môi trường tái sinh thực vật. Mặc dù quy trình cảm ứng phôi soma trong các mảnh cây ca cao có thể được thực hiện trong bóng tối hoặc trong điều kiện chiếu sáng, nhưng điều kiện bóng tối được ưu tiên.

Patent Mỹ số 5,312,801 đề cập đến phương pháp tái sinh phôi soma từ mô có nguồn gốc hợp tử hoặc không có nguồn gốc hợp tử, và phương pháp tái sinh cây ca cao và cây con ca cao từ phôi soma. Mặc dù theo Patent này phôi soma có thể có nguồn gốc từ nguồn bất kỳ, nhưng chủ yếu sử dụng phôi tâm và nụ cánh tràng hoa non. Phương pháp này được thực hiện trong điều kiện ánh sáng yếu (300-100 lux, tương đương với 5,76 đến 1,95 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$) hoặc trong bóng tối.

DE 102010044562 A1 đề cập đến kỹ thuật nhân giống tự động thực vật *in vitro* dựa trên kỹ thuật phát sinh phôi soma, và quy trình sản xuất khóm thực vật đồng nhất dựa trên kỹ thuật nhân giống bằng cách sử dụng tế bào gốc từ mô phân sinh đỉnh. Quá trình tăng sinh trực tiếp thu được trong điều kiện biểu hiện hướng đích của hormon thực vật dẫn đến tạo ra các phôi thứ cấp đồng nhất có khả năng tăng sinh không bị hạn chế. Môi trường dinh dưỡng có thành phần được điều chỉnh để tạo ra sự biệt hóa xác định được sử dụng để có thể kiểm soát tái sinh thực vật. Phương pháp này được thực hiện bằng cách sử dụng các mảnh cây kích cỡ nhỏ được lấy từ nguyên liệu mô phân sinh.

Bài báo Vinterhalter *et al* đề cập đến phương pháp phát sinh phôi soma trực tiếp trên cây hoàng liên (*Chelidonium majus* L.) bằng cách sử dụng toàn bộ các mảnh cây trụ trên lá mầm của các cây con sau khi nhân giống kéo dài trên môi trường MS, có hoặc không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Phôi soma được phát triển thành cây con,

tiếp tục được tạo phôi soma. Phôi đã phát triển thành các cây con có rễ có thể được thích nghi với điều kiện khí hậu trong nhà kính.

Bài báo Iantchev et al đề cập đến phương pháp phát sinh phôi soma trực tiếp từ *Medicago spp.* thể đại bằng cách sử dụng các mảnh cây khác nhau, bao gồm các vùng mô phân sinh (trụ dưới lá mầm, lá mầm, và cuống lá thu được từ hạt). Môi trường rắn có bổ sung thiđiazuron hoặc 6-benzylaminopurin ở các nồng độ khác nhau đã thúc đẩy quy trình này. Quá trình phát sinh phôi thứ cấp cũng được quan sát. Các lát cắt phôi sơ cấp và phôi thứ cấp được sử dụng để sản sinh hàng loạt các phôi thể hệ mới. Các thực vật đã được tái sinh có hệ rễ đã phát triển mạnh trên môi trường chứa ít chất dinh dưỡng đa lượng và sucroza được thích nghi với điều kiện khí hậu trong nhà kính.

Bài báo Guiltinan et al đề cập đến quy trình kích thích phát sinh phôi soma và tái sinh thực vật từ mô soma không có nguồn gốc hợp tử của ca cao, bao gồm việc sử dụng một số bước nuôi cấy kết hợp sử dụng xytokinin thiđiazuron tổng hợp (TDZ) và auxin tổng hợp (2,4D). Quy trình ba bước được sử dụng, bao gồm cảm ứng tạo mô sẹo, phát triển phôi, và tái sinh thực vật. Khi được sử dụng trong quy trình này, 100% các mảnh cây được lấy từ nhị lép và 60% các mảnh cây được lấy từ các mô gốc cánh tràng hoa đã tạo ra phôi soma, và lên đến 37% phôi soma trưởng thành được tạo ra có khả năng biến đổi thành cây con.

Trái ngược với quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp đã biết, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất phôi bằng cách phát sinh phôi soma trực tiếp. Theo đó, quy trình theo sáng chế tạo ra cơ hội cho các nhà nhân giống và nghiên cứu ca cao để cải thiện độ đồng nhất di truyền để sử dụng trong thử nghiệm tiếp theo, và/hoặc làm tăng năng suất và khả năng kháng dịch bệnh của cây trồng để sử dụng trong sản xuất ca cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao in vitro*. Quy trình này đặc biệt hữu ích để nhân bội *in vitro* phôi soma trực tiếp hoặc phôi soma gián tiếp bằng cách phát sinh phôi soma trực tiếp, và tái sinh thực vật. Sáng chế cũng đề cập đến thực vật ca cao, thực vật có quả ca cao, và nguyên liệu thực vật ca cao thu được bằng quy trình này. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình xử lý quả thực vật ca cao để thu được sản phẩm chứa ca cao, đặc biệt là sản phẩm chứa ca cao dùng làm thực phẩm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao*, bao gồm các bước sau:

(a-1) thu nhận mảnh cây của *Theobroma cacao* L., sau đó

(i) đặt mảnh cây này vào môi trường cảm ứng trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để thu được phôi sơ cấp; và

(ii) tùy ý cấy chuyển phôi sơ cấp thu được ở bước (i) vào môi trường phát triển và nuôi cấy các phôi này trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi sơ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp;

(b-1) tách mô phôi sơ cấp, tốt hơn nếu tách trụ trên lá mầm của phôi sơ cấp thu được sau bước (a-1), và tùy ý cắt các mô này thành các lát mỏng, sau đó

(i) đặt mô thu được vào môi trường cảm ứng trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để thu được phôi thứ cấp; và

(ii) tùy ý cấy chuyển phôi thứ cấp thu được ở bước (i) vào môi trường phát triển và nuôi cấy các phôi này trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi thứ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp;

(c) cấy chuyển phôi thứ cấp thu được ở bước (b-1) vào môi trường thích hợp để phôi thứ cấp này trưởng thành.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao* L., bao gồm các bước sau:

(a-2) thu nhận mảnh cây của *Theobroma cacao* L.;

(i) đặt mảnh cây này vào môi trường tạo mô sẹo trong bóng tối trong khoảng thời gian để thu được mô sẹo; và

(ii) cấy chuyển mô sẹo thu được ở bước 1) vào môi trường phát triển phôi và nuôi cấy trong bóng tối trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi sơ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp;

(b-2) tách mô phôi sơ cấp và tùy ý cắt các mô này thành các lát mỏng;

(i) đặt mô thu được vào môi trường cảm ứng trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để thu được phôi thứ cấp; và

(ii) tùy ý cấy chuyển phôi thứ cấp thu được ở bước (i) vào môi trường phát triển và nuôi cấy các phôi này trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi thứ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp;

(c) cấy chuyển phôi thứ cấp thu được ở bước (b-2) vào môi trường thích hợp để phôi thứ cấp này trưởng thành.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao* L., trong đó phôi thu được từ quy trình nhân giống này được nảy mầm sớm, tùy ý nảy mầm, và phát triển thành cây con.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất phôi soma thứ cấp trực tiếp của *Theobroma cacao*, bao gồm bước nuôi cấy mảnh cây phôi soma thứ cấp trong môi trường cảm ứng chứa 6-benzylaminopurin, sau đó phát triển phôi trong môi trường phát triển chứa axit gibberellic. Sáng chế cũng đề cập đến môi trường để sử dụng trong quy trình này. Tốt hơn nữa, môi trường cảm ứng và môi trường phát triển cũng chứa đường.

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này khi thực hành sáng chế.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh thể hiện phôi soma trực tiếp ở giai đoạn hình cầu từ trụ trên lá mầm của phôi soma sơ cấp, được xử lý với 1,0mg/L 6-benzylaminopurin và 40g/L sucroza.

Fig.2 là hình ảnh thể hiện phôi soma trực tiếp ở giai đoạn hình ống sớm, được xử lý với 0,6mg/L axit gibberellic và 40g/L sucroza.

Fig.3 là hình ảnh thể hiện phôi soma trực tiếp ở giai đoạn lá mầm trưởng thành.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện số lượng phôi được tạo ra ở nồng độ khác nhau của axit gibberellic và sucroza. Axit gibberellic ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của phôi soma trực tiếp khi sử dụng kết hợp với 40g/L hoặc 80g/L sucroza.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện số lượng phôi ở các giai đoạn khác nhau (giai đoạn hình cầu, hình tim, và hình ống) ở nồng độ khác nhau của axit gibberellic và sucroza. Phân tích mô học của các mô cấy lá mầm cho thấy rằng mô này chủ yếu là nhu mô và tế bào dưới biểu bì có hoạt tính tạo phôi cao. Các vùng phôi đã phát triển nhiều phôi soma trực

tiếp trong giai đoạn hình cầu và hình tim sau 40 ngày nuôi cấy trong môi trường cảm ứng chứa 1,0mg/L 6-benzylaminopurin và 40g/L sucroza.

Fig.6A-Fig.6C là các hình ảnh thể hiện các giai đoạn hình thái của phôi soma trực tiếp. Fig.6A shows phôi soma trực tiếp sau 40 ngày nuôi cấy trong môi trường cảm ứng trong điều kiện chiếu sáng (trong giai đoạn hình cầu và hình tim). Fig.6B là hình ảnh thể hiện mặt cắt ngang của lá mầm thu được từ phôi soma trực tiếp trong giai đoạn hình cầu. Fig.6C là hình ảnh thể hiện mặt cắt ngang của lá mầm thu được từ phôi soma trực tiếp trong giai đoạn hình tim.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao in vitro*, cụ thể sáng chế đề cập đến quy trình nhân bội phôi soma trực tiếp và phôi soma gián tiếp *in vitro* bằng cách phát sinh phôi soma trực tiếp, sau đó tái sinh thực vật, cũng như thực vật ca cao, thực vật có quả ca cao, và nguyên liệu thực vật ca cao thu được bằng phương pháp này. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình xử lý quả thực vật ca cao để thu được sản phẩm chứa ca cao, đặc biệt là sản phẩm chứa ca cao dùng làm thực phẩm.

Quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp là phương pháp tạo hình thái, trong đó phôi soma có nguồn gốc trực tiếp từ chất nền mô thực vật, mà không tạo mô sẹo dưới dạng giai đoạn trung gian. Đây là sự khác biệt chính giữa quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp và quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp: quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp cần tạo mô sẹo. Một khác biệt nữa giữa các phương pháp tái sinh này là phản ứng với tác dụng của chất điều hòa sinh trưởng. Trong khi quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp thường được đặc trưng bởi quá trình nuôi cấy trên môi trường duy nhất chỉ bổ sung xytokinin hoặc một chất tạo điều kiện khắc nghiệt khác, thì quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp thường cần có nồng độ auxin cao hoặc tỷ lệ đặc hiệu của auxin/xytokinin để tạo mô sẹo trong môi trường nuôi cấy ban đầu. Sau khi mô sẹo được tạo ra, một môi trường khác không chứa auxin hoặc nồng độ auxin thấp hơn môi trường được sử dụng để cảm ứng phát sinh phôi mô sẹo, được sử dụng trong quá trình cấy chuyển tiếp theo.

Phương pháp theo sáng chế, và phôi soma, cây con ca cao, thực vật ca cao, và các nguyên liệu thực vật ca cao khác theo sáng chế được tạo ra dựa trên phát hiện thấy rằng có thể cảm ứng phát sinh phôi soma trực tiếp trong môi trường lỏng hoặc môi trường rắn thông qua các phương pháp mà có thể bao gồm việc cho mảnh cấy tiếp xúc với ánh sáng.

Phương pháp theo sáng chế cải tiến quy trình nhân giống bằng cách cho phép quá trình sản xuất phôi ít tạo mô sẹo, và theo một số khía cạnh không tạo phôi mô sẹo bất kỳ, nhờ đó tạo ra nhiều phôi bình thường hơn quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp trong thời gian ngắn. Theo một số khía cạnh, thực vật được sử dụng để hoạt hóa quá trình phát sinh phôi soma là *Theobroma cacao* (ca cao), tốt nhất nếu *Theobroma cacao* L. Quá trình phát triển *Theobroma spp.* trưởng thành bằng cách sử dụng quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mảnh cây thực vật ở giai đoạn dinh dưỡng trước đó vẫn chưa đạt được.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao*, bao gồm các bước sau:

(a-1) thu nhận mảnh cây của *Theobroma cacao* L., sau đó

(i) đặt mảnh cây này vào môi trường cảm ứng trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để thu được phôi sơ cấp; và

(ii) tùy ý cấy chuyển phôi sơ cấp thu được ở bước (i) vào môi trường phát triển và nuôi cấy các phôi này trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi sơ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp;

(b-1) tách mô phôi sơ cấp, tốt hơn nếu tách trụ trên lá mầm của phôi sơ cấp thu được sau bước (a-1), và tùy ý cắt các mô này thành các lát mỏng, sau đó

(i) đặt mô thu được vào môi trường cảm ứng trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để thu được phôi thứ cấp; và

(ii) tùy ý cấy chuyển phôi thứ cấp thu được ở bước (i) vào môi trường phát triển và nuôi cấy các phôi này trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi thứ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp;

(c) cấy chuyển phôi thứ cấp thu được ở bước (b-1) vào môi trường có khả năng làm trưởng thành và nảy mầm sớm phôi thứ cấp trực tiếp thành thực vật, nuôi cấy phôi thứ cấp trong môi trường này trong khoảng thời gian đủ để cho phép làm trưởng thành, nảy mầm sớm và tùy ý cũng nảy mầm phôi thứ cấp trong môi trường này, và

(d) phát triển cây con từ phôi thứ cấp đã được nảy mầm sớm hoặc nảy mầm thu được ở bước (c).

Khi thực hiện quy trình này bằng cách phát sinh phôi soma trực tiếp thông qua các giai đoạn (a-1) và (b-1), các vấn đề liên quan đến việc sử dụng nguyên liệu mô sẹo chưa

biệt hóa như nêu trên được tránh. Mặc dù có thể sử dụng the phôi hình ống attained trong bước (a-1)(i) để tạo ra nguồn nguyên liệu để phát triển phôi thứ cấp, trong trường hợp của *Theobroma cacao* L., các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng nguyên liệu trụ trên lá mầm có nguồn gốc từ phôi sơ cấp được xử lý trong bước (a-1)(ii) tạo ra nguồn mảnh cây thích hợp để phát triển phôi thứ cấp. Hơn nữa, trái ngược với nhiều quy trình đã biết, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng chế độ chiếu sáng trong cả hai giai đoạn (a-1) và (b-1) tạo ra quy trình nhân giống *in vitro* hiệu quả.

Tuy nhiên, sáng chế không chỉ liên quan đến việc sử dụng quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp trực tiếp. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *Theobroma cacao* L., bao gồm các bước sau:

(a-2) thu nhận mảnh cây của *Theobroma cacao* L., sau đó

(i) đặt mảnh cây này vào môi trường tạo mô sẹo trong bóng tối trong khoảng thời gian để thu được mô sẹo; và

(ii) cấy chuyển mô sẹo thu được ở bước 1) vào môi trường phát triển phôi và nuôi cấy trong bóng tối trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi sơ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp;

(b-2) tách mô phôi sơ cấp, tốt hơn nếu tách trụ trên lá mầm của phôi sơ cấp thu được sau bước (a-2), và tùy ý cắt các mô này thành các lát mỏng, sau đó

(i) đặt mô thu được vào môi trường cảm ứng trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để thu được phôi thứ cấp; và

(ii) tùy ý cấy chuyển phôi thứ cấp thu được ở bước (i) vào môi trường phát triển và nuôi cấy các phôi này trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi thứ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp;

(c) cấy chuyển phôi thứ cấp thu được ở bước (b-2) vào môi trường có khả năng làm trưởng thành và nảy mầm sớm phôi thứ cấp trực tiếp thành thực vật, nuôi cấy phôi thứ cấp trong môi trường này trong khoảng thời gian đủ để cho phép làm trưởng thành, nảy mầm sớm và tùy ý cũng nảy mầm phôi thứ cấp trong môi trường này, và

(d) phát triển cây con từ phôi thứ cấp đã được nảy mầm sớm hoặc nảy mầm thu được ở bước (c).

Khi thực hiện quy trình này bằng cách sử dụng quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp trong giai đoạn (a-2), tốt hơn nếu tạo ít mô sẹo hơn các quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp đã biết, và quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp trong giai đoạn (b-2), việc nhân bội nhiều phôi được tạo ra bằng cách sử dụng quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp là có lợi, trong khi đó việc sử dụng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp để phôi thứ cấp phát triển có thể gây biến dị dòng soma trong phôi được tạo ra. Nguyên liệu trụ trên lá mầm có nguồn gốc từ phôi sơ cấp gián tiếp được xử lý trong giai đoạn (a-2) tạo ra nguồn mảnh cấy thích hợp để phát triển phôi thứ cấp. Hơn nữa, trái ngược với nhiều quy trình đã biết, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng chế độ chiếu sáng trong giai đoạn (b-2) tạo ra quy trình nhân giống *in vitro* hiệu quả.

Mảnh cấy thích hợp để sử dụng trong bước (a-1) hoặc (a-2) của quy trình theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở cánh tràng hoa, nhị lép, và noãn.

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong (a-1) có thể bao gồm môi trường cảm ứng, và tùy ý môi trường phát triển, được sử dụng luân phiên. Mỗi môi trường chứa các thành phần cần thiết để cảm ứng và phát triển phôi sơ cấp như đã biết trong lĩnh vực này. Do đó các môi trường này có thể chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch muối đa lượng và vi lượng chứa vitamin, hormon tăng trưởng, và nguồn năng lượng, như glucoza hoặc sucroza. Tuy nhiên, do quy trình này là quy trình phát sinh phôi soma trực tiếp, nên các môi trường này không chứa các hormon, như 2,4D. Hormon thực vật 2,4D được biết là tạo ra biến dị dòng soma và nhiều phôi không thể phát triển thành thực vật. Tuy nhiên, một hoặc nhiều chất điều hòa sinh trưởng thực vật hoặc hormon tăng trưởng thực vật có thể được sử dụng trong các môi trường này, bao gồm, ví dụ ethephon, kinetin, putrescin, spermidin, hydro peroxit, 6 đến $(\gamma,\gamma\text{-đimetylallylamino})$ purin (2iP), và axit gibberellic/gibberellin. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật hoặc hormon tăng trưởng thực vật có thể được sử dụng ở nồng độ có khả năng hỗ trợ phát sinh phôi soma trực tiếp, ví dụ 0,01mg/L, 0,05mg/L, 0,10mg/L, 0,20mg/L, 0,30mg/L, 0,50mg/L, 0,75mg/L, 1,0mg/L, 1,25mg/L, 1,5mg/L, 1,75mg/L, 2,0mg/L, 2,25mg/L, 2,5mg/L, 2,75mg/L, hoặc 3,0mg/L. Khi được sử dụng, thì hormon tăng trưởng thực vật kinetin được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01mg/mL đến 10mg/mL, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,1mg/mL đến 1mg/mL, và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 0,3mg/mL đến 0,5mg/mL. Ví dụ cụ thể về các môi trường được sử dụng trong sáng chế được mô tả dưới đây.

Trong bước (a-2), môi trường tạo mô sẹo và môi trường phát triển phôi được sử dụng. Do đó các môi trường này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch muối đa lượng và vi lượng chứa vitamin, hormon tăng trưởng, và nguồn năng lượng, như glucoza hoặc sucroza. Theo một số khía cạnh, do bước này là bước phát sinh phôi soma gián tiếp, nên hormon thực vật 2,4D có thể được sử dụng trong các môi trường này, ví dụ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,50mg/L đến 3,0mg/L. Tốt hơn nếu, 2,4D được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1,0mg/L đến 2,0mg/L. Các hormon khác tham gia vào quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp cũng có thể được sử dụng, như xytokinin thiđiazuron tổng hợp (TDZ). TDZ có thể được sử dụng trong các môi trường này, ví dụ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5µg/L đến 10,0µg/L. Tốt hơn nếu, TDZ được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2,5µg/L đến 7,5µg/L. Tốt hơn nữa nếu, TDZ được sử dụng ở nồng độ khoảng 5,0µg/L.

Quá trình tạo phôi sơ cấp trong bước (a-1) hoặc (a-2) được thực hiện trong đồ chứa phụ thuộc vào bản chất của môi trường được sử dụng. Ví dụ, khi môi trường là môi trường rắn, bước (a-1) hoặc (a-2) có thể được thực hiện trên đĩa petri, hoặc khi môi trường là môi trường lỏng, đồ chứa có thể bao gồm bình Erlenmeyer hoặc bình phản ứng. Khi các phản ứng được hiện trong môi trường lỏng, đồ chứa có thể được khuấy trong hoặc từ đầu đến cuối quá trình nuôi cấy.

Bước (a-1) hoặc (a-2) được tiếp tục trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi sơ cấp thích hợp để sử dụng trong bước (b-1) hoặc (b-2). Theo một khía cạnh, trong bước (a-1) hoặc (a-2), các phôi có trụ trên lá mầm đã phát triển được tạo ra để lần lượt sử dụng trong bước (b-1) hoặc (b-2). Thông thường, quá trình phát triển của các phôi sơ cấp có trụ trên lá mầm đã phát triển đạt được trong khoảng thời gian từ 4 đến 16 tuần, tốt hơn nếu 6 đến 14 tuần, tốt hơn nữa nếu 8 đến 12 tuần. Theo một số khía cạnh, các phôi sơ cấp có trụ trên lá mầm đã phát triển được thu nhận ở khoảng 10 tuần. Trong quá trình phát triển phôi sơ cấp, nhiệt độ được duy trì nằm trong khoảng từ 20°C đến 32°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 24°C đến 28°C, và tốt hơn nữa nếu ở khoảng 27°C.

Theo phương án cụ thể, bước (a-1) có thể được thực hiện trong hai giai đoạn, giai đoạn thứ nhất được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thứ nhất được làm thích ứng để tạo ra sự cảm ứng phát sinh phôi, và giai đoạn thứ hai tùy ý có thể được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thứ hai để tạo ra sự biểu hiện phát sinh phôi và tạo phôi.

Theo các phương án khác, bước (a-2) được thực hiện trong hai giai đoạn, giai đoạn thứ nhất là giai đoạn phát triển mô sẹo được thực hiện trong môi trường phát triển mô sẹo được làm thích ứng để tạo mô sẹo, và giai đoạn thứ hai là giai đoạn phát triển phôi được thực hiện trong môi trường phát triển phôi thứ hai để làm phát triển phôi từ mô sẹo.

Các muối và hormon thực vật được sử dụng trong môi trường nuôi cấy thứ nhất được sử dụng trong (a-1) có thể thay đổi. Theo một khía cạnh, môi trường nuôi cấy thứ nhất có thể chứa một hoặc nhiều chất điều hòa sinh trưởng. Theo một khía cạnh ưu tiên, chất điều hòa sinh trưởng bao gồm xytokinin 6-benzylaminopurin (BAP) và axit gibberellic, có thể được sử dụng để cảm ứng phát sinh phôi soma trực tiếp. Theo khía cạnh khác, môi trường nuôi cấy thứ nhất thích hợp chứa các thành phần sau:

Bảng 1

Thành phần	Nồng độ
Các chất dinh dưỡng đa lượng MS (Murashige and Skoog, 1962)	25%
Các chất dinh dưỡng vi lượng	50%
KH ₂ PO ₄ ,	20,5-80,5mg/L, ví dụ 42,5mg/L
Fe-EDTA,	5-40,5mg/L, ví dụ 21,5mg/L
Pyridoxin,	0,1-50mg/L, ví dụ 1mg/L
Axit nicotinic	0,1-50mg/L, ví dụ 1mg/L
Thiamin	1,0-500mg/L, ví dụ 10mg/L
BAP	0,1-2,0mg/L, ví dụ 1mg/L
Axit gibberellic	0,1-2,0mg/L, ví dụ 0,6mg/L
Sucroza	20-120g/L, ví dụ 30g/L
Myo-inositol	10-200mg/L, ví dụ 100mg/L
Phytigel (chỉ môi trường rắn)	1,5-2,5g/L, ví dụ 2,0g/L

Giai đoạn thứ nhất của bước (a-1) có thể được thực hiện trong khoảng thời gian từ 1 đến 8 tuần, tốt hơn nếu khoảng 2 đến 6 tuần, và tốt hơn nữa nếu cho đến khi phôi ở giai đoạn hình ống được phát triển từ mảnh cấy.

Theo một số khía cạnh, giai đoạn thứ hai tùy ý của bước (a-1) được thực hiện, môi trường được sử dụng cũng có thể chứa xytokinin, như 6-benzylaminopurin, nhưng nồng độ được giảm để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biệt hóa và phát triển phôi, cũng như nhân bội số lượng phôi được tạo ra. Ví dụ môi trường được sử dụng trong giai đoạn thứ hai của bước (a-1) có thể giống như môi trường được sử dụng trong giai đoạn thứ nhất, nhưng chứa 6-benzylaminopurin ở nồng độ nhỏ hơn một nửa, ví dụ khoảng một phần ba nồng độ được sử dụng trong môi trường được sử dụng trong giai đoạn thứ nhất của bước (a-1). Do đó, khi môi trường thông thường được sử dụng trong giai đoạn thứ

nhất của bước (a-1) có thể chứa 6-benzylaminopurin ở nồng độ khoảng 1mg/L, môi trường được sử dụng trong giai đoạn thứ hai của bước (a-1) có thể chứa 6-benzylaminopurin ở nồng độ bằng 0,3mg/L.

Giai đoạn thứ hai của bước (a-1) có thể được thực hiện trong khoảng từ 2 đến 12 tuần, tốt hơn nếu cho đến khi phôi sơ cấp phát triển trụ trên lá mầm có thể được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để tạo phôi thứ cấp. Trong thời gian này, môi trường nuôi cấy may cần bổ sung các chất dinh dưỡng nhiều lần, ví dụ khoảng ba hoặc bốn hoặc nhiều lần thông qua quá trình xử lý.

Tốt hơn nếu bước (a-1) hoặc (a-2) được thực hiện bằng cách sử dụng các mảnh cây có nguồn gốc từ nụ hoa. Theo một khía cạnh, từ 1 đến 20 mảnh cây sẽ được đặt vào mỗi đồ chứa được sử dụng để phát triển phôi, như đĩa petri hoặc bình Erlenmeyer. Ví dụ, từ 2 đến 10 nụ hoa có thể được đặt vào đĩa petri có kích cỡ 100mm x 20mm hoặc bình Erlenmeyer dung tích 250mL, cũng với khoảng 25 đến 30mL môi trường. Trong bước (a-1), quá trình nhân bội phôi, ví dụ với hệ số nhân bội phôi từ 3 đến 10 phôi/mảnh cây, có thể được quan sát. Trong bước (a-2), quá trình nhân bội nhiều phôi, ví dụ với hệ số nhân bội phôi từ 5 đến 50 phôi/mảnh cây có thể được quan sát.

Khi kết thúc bước (a-1) hoặc (a-2), phôi sơ cấp thu được được thu nhận để sử dụng trong phát sinh phôi soma trực tiếp để tạo phôi thứ cấp. Tốt hơn nếu, các trụ trên lá mầm được tách ra khỏi phôi và cắt thành các lát mỏng. Thông thường, mỗi trụ trên lá mầm được cắt thành từ 4 đến 6 lát để đảm bảo rằng các lát này có kích cỡ thích hợp để phát sinh phôi soma trực tiếp. Bằng cách sử dụng nhiều lát mỏng của mỗi phôi được tạo ra trong bước (a-1) hoặc (a-2) trong bước (b-1) hoặc (b-2), số lượng phôi soma thứ cấp thu được cao hơn số lượng phôi soma sơ cấp được tạo ra.

Quy trình của bước (b-1) hoặc (b-2) được thực hiện trong điều kiện chiếu sáng. Khoảng thời gian chiếu sáng có thể nằm trong khoảng từ 12:12 đến 24:0, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 13:11 đến 20:4, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 14:10 đến 8:6. Tốt hơn nếu, khoảng thời gian chiếu sáng là khoảng 16:8, với khoảng 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng sau đó 8 giờ trong bóng tối. Chế độ chiếu sáng có thể được đảm bảo bằng cách đặt các chất vào buồng được chiếu sáng thích hợp, như đã biết trong lĩnh vực này. Cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp hoặc cường độ dòng photon hữu hiệu cho quang hợp (PPFD) nằm trong khoảng từ 30 đến 240 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$ có thể được sử dụng, tốt hơn nếu

nằm trong khoảng từ 50 đến 190 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$. Theo một số khía cạnh, ví dụ chế độ chiếu sáng là 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng và 8 giờ trong bóng tối và cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp hoặc cường độ dòng photon hữu hiệu cho quang hợp (PPFD) nằm trong khoảng từ 50 đến 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$ có thể được sử dụng.

Bước (b-1) hoặc (b-2) có thể được thực hiện trong hai giai đoạn, giai đoạn thứ nhất được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thứ nhất được làm thích ứng để tạo ra sự cảm ứng phát sinh phôi, và giai đoạn thứ hai tùy ý có thể được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thứ hai để tạo ra sự biểu hiện phát sinh phôi và tạo phôi thứ cấp. Các môi trường này có thể là môi trường rắn hoặc môi trường lỏng, trong đó chứa thích hợp, có thể là đĩa petri hoặc bình Erlenmeyer như nêu trên.

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong (b-1) hoặc (b-2) được chọn lọc để kích thích phát sinh phôi soma trực tiếp. Ví dụ môi trường nuôi cấy thích hợp có thể chứa các thành phần sau, trong đó dung dịch gốc axit amin 1000X được thể hiện trong Bảng 2 chứa L-Lysin 45,65mg, L-Leucin 32,80mg, L-Tryptophan 51,05mg, Arginin 43,55mg, và Glycin 18,76mg:

Bảng 2

Thành phần	Nồng độ
Các chất dinh dưỡng đa lượng MS (Murashige and Skoog, 1962)	100%
Các chất dinh dưỡng vi lượng	100%
Canxi pantothenat	2,0mg/L, ví dụ 1mg/L
Fe-EDTA	10-42,5mg/L, ví dụ 21,5mg/L
Pyridoxin,	0,1-50mg/L, ví dụ 1mg/L
Axit nicotinic,	0,1-50mg/L, ví dụ 1mg/L
Thiamin	0,1-2,0mg/L, ví dụ 1mg/L
Biotin	0,1-2,0mg/L, ví dụ 0,1mg/L
BAP	0,1-2,0mg/L, ví dụ 0,3mg/L
Sucroza	20-120g/L, ví dụ 30g/L
Myo-inositol	10-200mg/L, ví dụ 100mg/L
KNO ₃	0,1-3,0g/L, ví dụ 0,3g/L
Phytigel (chỉ môi trường rắn)	1,5-3,0g/L, ví dụ 2,2g/L
Dung dịch gốc axit amin 1000X	1mL/L

Theo một số khía cạnh, giai đoạn thứ hai tùy ý của bước (b-1) hoặc (b-2) được thực hiện, môi trường được sử dụng cũng có thể chứa xytokinin, như 6-benzylaminopurin, nhưng nồng độ được giảm để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biệt hóa và phát triển phôi, cũng như nhân bội số lượng phôi được tạo ra. BAP có thể được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,0mg/L, tốt hơn nếu 0,5 đến 1,5mg/L, tốt hơn nữa nếu khoảng 1,0mg/L. Ví dụ môi trường được sử dụng trong giai

đoạn thứ hai của bước (b-1) hoặc (b-2) có thể giống như môi trường được sử dụng trong giai đoạn thứ nhất, nhưng chứa 6-benzylaminopurin ở nồng độ nhỏ hơn một nửa, ví dụ khoảng một phần ba thay được sử dụng trong môi trường được sử dụng trong giai đoạn thứ nhất của bước (b-1) hoặc (b-2). Do đó, khi môi trường thông thường được sử dụng trong giai đoạn thứ nhất của bước (b-1) có thể chứa 6-benzylaminopurin ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1mg/L, thì môi trường được sử dụng trong giai đoạn thứ hai của bước (b-1) có thể chứa 6-benzylaminopurin ở nồng độ bằng 0,3mg/L.

Theo một số khía cạnh, trong đó cả hai giai đoạn bước (b-1) hoặc (b-2) được thực hiện, các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng nồng độ cân bằng giữa BAP/sucroza trong môi trường cảm ứng và axit gibberellic/sucroza trong môi trường phát triển có thể cảm ứng phát sinh phôi soma trực tiếp, biểu hiện và phát triển phôi bình thường, do đó kích thích phát sinh phôi soma trực tiếp của *Theobroma cacao*, và đặc biệt là *Theobroma cacao* L.

Ưu điểm cơ bản của quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp là để thu được phôi bình thường khi môi trường nuôi cấy không chứa 2,4D. Hormon thực vật này được biết là tạo ra biến dị dòng soma và nhiều phôi không thể phát triển thành thực vật.

Theo một số khía cạnh, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng axit gibberellic đóng vai trò là tác nhân kích thích để phát triển phôi bình thường có khả năng phát triển mạnh thành thực vật, đặc biệt là khi sử dụng kết hợp với đường, như sucroza, glucoza, fructoza, mannoza, lactoza, galactoza, v.v., và tốt hơn nếu sucroza. Quá trình phát triển và làm trưởng thành phôi thứ cấp ở *Theobroma cacao*, đặc biệt là trong phát sinh phôi soma trực tiếp, bị ảnh hưởng bởi nồng độ của axit gibberellic, và nồng độ của sucroza. Nồng độ của axit gibberellic có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,0g/L, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,8g/L, và tốt nhất nếu khoảng 0,6g/L. Nồng độ của sucroza có thể nằm trong khoảng từ 10g/L đến 100g/L, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 20g/L đến 80g/L, và tốt nhất nếu khoảng 40g/L. Tác dụng của sucroza trong môi trường phát triển có thể do nó đóng vai trò là tác nhân thẩm thấu có tác dụng làm trưởng thành phôi soma.

Theo khía cạnh ưu tiên, môi trường cảm ứng được sử dụng trong giai đoạn thứ nhất của bước (b-1) hoặc (b-2) chứa 1,0mg/L 6-benzylaminopurin là tác nhân gây ra điều kiện khắc nghiệt để kích thích đáp ứng tạo phôi thứ cấp bởi quá trình phát sinh phôi soma

trực tiếp được kết hợp với 40g/L sucroza. Môi trường phát triển được sử dụng trong giai đoạn thứ hai của bước (b-1) hoặc (b-2) chứa 0,6mg/L axit gibberellic được kết hợp với 40g/L sucroza. Việc sử dụng kết hợp môi trường cảm ứng và môi trường phát triển dẫn đến 83,3% phôi được tạo ra là phôi bình thường.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể, được tin rằng nồng độ của đường trong môi trường cảm ứng có thể là yếu tố quan trọng trong hoạt hóa/bất hoạt dạng cụ thể của quá trình tạo hình thái *in vitro*. Cũng được tin rằng các tác nhân gây ra điều kiện khắc nghiệt khác nhau có thể gây ra các đáp ứng hình thái khác nhau ở các tế bào thực vật, như ức chế tăng sinh tế bào, kích thích phân chia tế bào theo vị trí, và biến đổi trạng thái biệt hóa của tế bào.

Bước (b-1) hoặc (b-2), có thể được thực hiện trong một hoặc hai giai đoạn, được thực hiện trong khoảng thời gian đủ để tạo phôi thứ cấp bởi quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp, trong đó phôi thứ cấp là thích hợp để sử dụng trong quá trình phát triển thực vật.

Giai đoạn thứ nhất của bước (b-1) hoặc (b-2) có thể được thực hiện trong khoảng thời gian từ 1-4 tuần, ví dụ trong khoảng 2 tuần, tốt hơn nếu cho đến khi phôi ở giai đoạn hình ống được phát triển từ mảnh cây, sau đó được sử dụng trong giai đoạn thứ hai của bước (b-1) hoặc (b-2).

Khi chỉ một giai đoạn được sử dụng trong bước (b-1) hoặc (b-2), quy trình của giai đoạn thứ nhất của bước (b-1) hoặc (b-2) được thực hiện trong khoảng thời gian từ 2 đến 16 tuần, tốt hơn nếu 2 đến 12 tuần, tốt hơn nữa nếu 4 đến 10 tuần, và tốt nhất nếu 6 đến 8 tuần, cho đến khi phôi thứ cấp phát triển đến giai đoạn đủ để cho phép chúng được sử dụng trong các bước tiếp theo để phát triển thành thực vật, ví dụ giai đoạn trưởng thành.

Khi bước (b-1) hoặc (b-2) được thực hiện trong hai giai đoạn, giai đoạn thứ hai có thể được thực hiện trong khoảng từ 2 đến 12 tuần, tốt hơn nếu cho đến khi phôi thứ cấp phát triển đến giai đoạn đủ để cho phép chúng được sử dụng trong các bước tiếp theo để phát triển thành thực vật, ví dụ giai đoạn trưởng thành. Trong thời gian này, môi trường nuôi cấy may cần bổ sung các chất dinh dưỡng nhiều lần, ví dụ khoảng ba hoặc bốn hoặc nhiều lần thông qua quá trình xử lý. Khoảng thời gian thích hợp trong bước (b-1) hoặc

(b-2) có thể từ 2 đến 12 tuần, tốt hơn nếu 4 đến 8 tuần, và tốt hơn nữa nếu từ 2 đến 6 tuần.

Trong thời gian này, nhiệt độ được duy trì nằm trong khoảng từ 23°C đến 29°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 25°C đến 28°C. Theo một số khía cạnh, nhiệt độ bằng 27°C được ưu tiên.

Các môi trường này được sử dụng trong sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc dạng rắn. Môi trường rắn thông thường chứa chất tạo gel, như phytagel, mặc dù chất tạo gel thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong để thu được môi trường rắn. Theo một số khía cạnh, việc sử dụng môi trường lỏng được ưu tiên do có thể rút ngắn toàn bộ quy trình để thu được cây con. Ví dụ quá trình sản xuất phôi bằng cách sử dụng môi trường rắn có thể chỉ mất từ 12 đến 15 tháng từ giai đoạn sản xuất ban đầu (7-8 tháng), đến giai đoạn trưởng thành (1,5-2 tháng), đến giai đoạn nảy mầm (1-2 tháng), đến giai đoạn biến đổi (2 đến 3 tháng). Quá trình sản xuất phôi bằng cách sử dụng môi trường lỏng có thể chỉ mất từ 8 đến 11 tháng, từ giai đoạn sản xuất ban đầu (6 đến 7 tháng), đến giai đoạn trưởng thành (1-1,5 tháng), đến giai đoạn nảy mầm (1-1,5 tháng), đến giai đoạn biến đổi (1-2 tháng).

Thuật ngữ “chế độ chiếu sáng” được dùng trong bản mô tả để chỉ quy trình và phương pháp, trong đó các chất đặc tiếp xúc với ánh sáng trong ít nhất một khoảng thời gian trong 24 giờ. Đặc biệt, các chất đặc tiếp xúc với ánh sáng trong ít nhất nửa ngày, một ngày và tốt hơn nếu nhiều hơn khoảng thời gian này. Khoảng thời gian chiếu sáng có thể nằm trong khoảng từ 12:12 đến 24:0, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 13:11 đến 20:4, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 14:10 đến 8:6. Tốt hơn nữa, khoảng thời gian chiếu sáng là khoảng 16:8, với khoảng 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng, sau đó 8 giờ trong bóng tối. Chế độ chiếu sáng có thể được đảm bảo bằng cách đặt các chất vào buồng được chiếu sáng thích hợp, như đã biết trong lĩnh vực này. Theo phương án cụ thể, cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp hoặc cường độ dòng photon hữu hiệu cho quang hợp (PPFD) nằm trong khoảng từ 30 đến 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 40 đến 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$, và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 50 đến 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$ được sử dụng.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên, bước bổ sung có thể được thực hiện sau bước (b-1) hoặc (b-2) nêu trên, nhưng trước bước (c). Bước bổ sung tùy ý này được gọi là bước

(b-3), là bước trong đó một số phôi thứ cấp được tạo ra được tiếp tục nhân bội. Bước này bị ảnh hưởng bởi quá trình hoạt hóa biểu hiện và sản sinh phôi soma thứ cấp trực tiếp mới từ mảnh cấy được tách từ phôi thứ cấp được tạo ra trong bước (b-1)(i) hoặc (b-2)(i) và tùy ý (b-1)(ii) hoặc (b-2)(ii). Các phôi của bước (b-1) hoặc (b-2) được chuyển vào môi trường lỏng hoặc môi trường rắn thích hợp, có thể giống như môi trường được sử dụng trong bước (a-1)(ii) hoặc (a-2)(ii), trong đồ chứa thích hợp như nêu trên. Sau đó, phôi này được nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 23°C đến 29°C, ví dụ nằm trong khoảng từ 25°C đến 28°C với chế độ chiếu sáng như nêu trên. Một lần nữa, chế độ chiếu sáng là 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng và 8 giờ trong bóng tối với cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp nằm trong khoảng từ 50 đến 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$ được ưu tiên. Bước (b-3) này tùy ý có thể được tiếp tục cho đến khi quá trình nhân bội phôi thích hợp đã đạt được. Hệ số nhân bội phôi thích hợp ở giai đoạn này có thể nằm trong khoảng từ 5 đến 19 phôi/mảnh cấy trụ trên lá mầm. Hệ số này có thể đạt được trong khoảng thời gian từ 5 đến 10 tuần, ví dụ từ 6 đến 10 hoặc 8 đến 10 tuần. Trong bước (b-3), môi trường được thay mới ít nhất một lần, và có thể được thay mới 3, 4 hoặc nhiều lần trong bước này.

Theo một số khía cạnh, khi bước (b-3) được thực hiện trong môi trường lỏng trong bình Erlenmeyer, thì bình này sẽ có dung tích bằng 250mL và được khuấy thích hợp trong toàn bộ quá trình, ví dụ trên máy lắc ở tốc độ 100 vòng/phút (rpm).

Do đó quy trình theo sáng chế, bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp trong các bước (b-1), (b-2), và (b-3) (khi được sử dụng), đã tạo ra nhiều phôi bình thường và cây con trong thời gian tương đối ngắn.

Quá trình xử lý phôi thứ cấp trực tiếp trong bước (c) để tạo ra giai đoạn trưởng thành và nảy mầm sớm, và tùy ý cũng bao gồm quá trình nảy mầm và biến đổi phôi thành thực vật, được thực hiện trong môi trường lỏng. Môi trường có thể được giữ trong đồ chứa thích hợp bất kỳ, mặc dù hệ thống bình ngâm theo mẻ (TIS) hoặc trong đĩa petri trong môi trường rắn được ưu tiên. Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 23°C đến 29°C, ví dụ nằm trong khoảng từ 25°C đến 28°C. Trong khi giai đoạn trưởng thành được thực hiện trong bóng tối, thì các giai đoạn nảy mầm sớm và nảy mầm được thực hiện trong điều kiện chiếu sáng như nêu trên. Chế độ chiếu sáng là 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng và 8 giờ trong bóng tối với cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp 50 đến 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$ có thể thích hợp.

Quá trình nuôi cấy ử được tiếp tục trong khoảng thời gian đủ để cho phép giai đoạn trưởng thành, giai đoạn nảy mầm sớm và tùy ý cũng bao gồm giai đoạn nảy mầm của phôi thứ cấp trong môi trường này. Trong trường hợp này, môi trường được điều chế để cho phép thực hiện các quy trình này. Môi trường thông thường có thể chứa các thành phần sau, trong đó dung dịch gốc axit amin 1000X được thể hiện trong Bảng 2 chứa L-Lysin 45,65mg, L-Leucin 32,80mg, L-Tryptophan 51,05mg, Arginin 43,55mg, và Glycin 18,76mg:

Bảng 3

Thành phần	Nồng độ
Các chất dinh dưỡng đa lượng MS (Murashige and Skoog, 1962)	50%-100%
Các chất dinh dưỡng vi lượng	50%-100%
Canxi pantothenat	0,1-2,0mg/L, ví dụ 1mg/L
Fe-EDTA,	10-100mg/L, ví dụ 43mg/L
Pyridoxin	0,1-50mg/L, ví dụ 1mg/L
Axit nicotinic	0,1-50mg/L, ví dụ 1mg/L
Thiamin	0,1-500mg/L, ví dụ 1mg/L
Biotin	0,1-2,0mg/L, ví dụ 0,1mg/L
Sucroza,	20-120g/L, ví dụ 40g/L
Myo-inositol	10-200mg/L, ví dụ 100mg/L
KNO ₃	0,1-3,0g/L, ví dụ 0,3g/L
Dung dịch gốc axit amin 1000X	1mL/L

Nhìn chung, bước này sẽ kết thúc trong khoảng thời gian từ 6 đến 10 tuần, ví dụ từ 8 đến 10 tuần. Tốt hơn nếu, môi trường sẽ được thay mới nhiều lần trong quá trình xử lý này, ví dụ từ 3 đến 8 lần trong bước (c).

Tiếp theo, phôi thứ cấp đã được nảy mầm sớm hoặc nảy mầm thu được trong bước (c) có thể được phát triển thành cây con bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các nguyên liệu được tạo ra trong điều kiện *in vitro* được trồng trong vườn ươm để thích nghi với điều kiện khí hậu trong giá thể chứa hỗn hợp các thành phần, như peclit, mùn dừa, đất, v.v. ví dụ. Sau đó, thực vật có thể được trồng trên đồng ruộng và sinh trưởng thành cây ca cao, và theo các khía cạnh ưu tiên, thực vật mang quả ca cao có thể được tiếp tục xử lý để thu được sản phẩm chứa ca cao.

Toàn bộ quy trình theo sáng chế có thể được thực hiện trong khoảng thời gian từ 22 tuần đến một năm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 22 đến 36 tuần, từ giai đoạn tạo phôi trong điều kiện *in vitro* đến giai đoạn trồng trong nhà kính.

Các ưu điểm khác có thể đạt được bằng cách sử dụng quy trình theo sáng chế. Việc kết hợp các bước này cho phép cải thiện đồng thời sự nảy mầm và phát triển phôi.

Hơn nữa, giai đoạn trưởng thành, giai đoạn nảy mầm sớm, nảy mầm và biến đổi phôi thành thực vật, khi cần có thể được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học TIS, do đó cho phép quy trình nhân giống thực vật được thực hiện đơn giản và hiệu suất cao hơn. Việc sử dụng các thiết bị phản ứng sinh học này khiến cho quy trình này có thể tự động và tiết kiệm chi phí và nhân lực do các yếu tố, như giảm nhu cầu sử dụng các bước thủ công và việc sử dụng các chất tạo gel.

Theo một khía cạnh, thiết bị phản ứng sinh học được sử dụng để thực hiện giai đoạn trưởng thành, giai đoạn nảy mầm sớm, nảy mầm, và biến đổi phôi thành thực vật, phôi soma thứ cấp trực tiếp thu được bằng phương pháp theo sáng chế có thể được chuyển vào thiết bị phản ứng sinh học TIS chứa môi trường lỏng. Môi trường có thể bao gồm, ví dụ các chất dinh dưỡng đa lượng MS (Murashige and Skoog, 1962) 50%, các chất dinh dưỡng vi lượng MS 50%, có bổ sung 43mg/L Fe-EDTA, 1mg/L pyridoxin, 1mg/L axit nicotinic, 1mg/L Thiamin, 1mg/L canxi pantothenat, 0,01mg/L biotin, 100mg/L myo-inositol, 40g/L sucroza và độ pH = 5,8. Tuy nhiên, các môi trường thích hợp khác có thể được sử dụng trong thiết bị phản ứng sinh học. Sau khoảng thời gian trong thiết bị phản ứng sinh học từ 2 đến 10 tuần, tốt hơn nếu 4 đến 8 tuần, trong bóng tối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C, tốt hơn nếu 27°C, để cho phép giai đoạn trưởng thành, hỗn hợp được nuôi cấy trong thiết bị phản ứng sinh học trong điều kiện chiếu sáng. Tốt hơn nếu quá trình nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng sử dụng chế độ 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng và 8 giờ trong bóng tối và cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp nằm trong khoảng từ 50 đến 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$, mặc dù các chế độ chiếu sáng khác có thể được sử dụng như nêu trên. Quá trình nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C, tốt hơn nếu 27°C, trong khoảng thời gian từ 6 đến 4 tuần, tốt hơn nếu 8 đến 12 tuần, và tốt hơn nữa nếu khoảng 10 tuần. Môi trường cần được thay mới thường xuyên trong quá trình xử lý, như 2, 3, 4, hoặc nhiều lần. Trong thời gian này, phôi trải qua giai đoạn nảy mầm sớm, và nảy mầm. Tốt hơn nếu, phôi thứ cấp đã nảy mầm thu được khi kết thúc quy trình này thích hợp để chuyển vào nhà kính.

Ngoài quy trình nhân giống *Theobroma cacao*, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xử lý quả được hái từ cây ca cao và chế biến thành sản phẩm chứa ca cao. Các phương pháp xử lý được sử dụng để chế biến các sản phẩm chứa ca cao bao gồm tách một phần hoặc hoàn toàn lớp thịt quả, lên men quả đã được tách lớp thịt quả một phần

hoặc hoàn toàn bằng cách sử dụng quy trình vi sinh vật hoặc hóa học, sấy khô quả bằng cách phơi nắng hoặc máy sấy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máy sấy Samoan, máy sấy Buttner, và máy sấy sàn.

Theo một số khía cạnh quả có thể tiếp tục được rang và sàng lọc để tạo ra nhân hạt được chế biến thành ca cao lỏng hoặc bơ ca cao. Nhân hạt hoặc ca cao lỏng có thể được chế biến thành bột ca cao. Ca cao lỏng, bơ ca cao, và nhân hạt có thể được trộn với đường hoặc các chất làm ngọt tự nhiên hoặc tổng hợp khác. Theo một số khía cạnh, hỗn hợp thu được có thể ở dạng bột nhão.

Bột nhão có thể được nghiền, tùy ý bằng máy nghiền kiểu trục lăn, để thu được bột nhão có kích cỡ hạt nhỏ hơn. Theo các khía cạnh khác, sữa đặc có thể được bổ sung vào, sau đó hỗn hợp này được tiếp tục chế biến thành canh sữa. Hỗn hợp này có thể được trộn trong máy tạo hình, tùy ý với bơ ca cao và chất nhũ hóa. Bột nhão và canh sữa có thể cũng được trộn với bơ ca cao và chất nhũ hóa trong máy tạo hình. Máy tạo hình được sử dụng để trộn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máy tạo hình Frissee, máy tạo hình Tourell, máy tạo hình và tinh chế Macintyre, và hệ thống Wiener.

Sản phẩm cuối cùng của quy trình chế biến này, và tùy ý tinh chế và tiếp tục chế biến bột nhão là sản phẩm chứa ca cao dùng làm thực phẩm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sôcôla, sản phẩm sôcôla, hoặc sản phẩm tương tự sôcôla.

Các sản phẩm chứa ca cao được ưa chuộng hiện nay có thể được sản xuất bằng cách sử dụng quả thu được thực vật được nhân giống bao gồm ca cao lỏng, sôcôla, sản phẩm sôcôla, sản phẩm tương tự sôcôla, bột ca cao, và bơ ca cao. Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm chứa ca cao thu được bằng quy trình nêu trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các chi tiết cụ thể không được yêu cầu để thực hiện sáng chế. Phần mô tả các phương án cụ thể dưới đây của sáng chế chỉ nhằm mục đích minh họa và mô tả sáng chế. Sáng chế không bị giới hạn bởi các dạng chính xác được bộc lộ. Nhiều cải biến và biến đổi có thể được thực hiện dựa trên phần mô tả nêu trên. Các phương án được thể hiện và mô tả để giải thích nguyên lý và ứng dụng của sáng chế, nhờ đó cho phép người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để sử dụng

tốt nhất sáng chế và các phương án khác nhau cùng với các cải biến khác nhau là thích hợp với việc sử dụng đặc biệt dự tính.

Ví dụ 1-Quy trình tạo phôi soma sơ cấp (cải tiến từ quy trình của Guiltinan *et al.*, 1997)

Nguyên liệu

Các hóa chất từ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO được sử dụng cho toàn bộ các chế phẩm môi trường. Độ pH môi trường được điều chỉnh bằng cách sử dụng KOH 1N, trước khi hấp. Toàn bộ các môi trường được hấp trong 20 phút ở nhiệt độ °C. Môi trường DKW dạng bột phát triển bởi Driver and Kuniyuki (1984) và Tulecke and McGranahan (1985) có thể thu được từ Sigma Chemical Co. (D-6162). Tuy nhiên, do tính chất hút ẩm của chế phẩm bột, việc sử dụng các dung dịch gốc chứa các thành phần hóa học của môi trường DKW được khuyến cáo sử dụng cho các chế phẩm môi trường. Các hỗn hợp bột đã thấm nước thường trở nên khó hòa tan trong nước, do đó có thể làm giảm hiệu quả của môi trường. Các chất dinh dưỡng đa lượng trong môi trường DKW được chia thành các dung dịch gốc A và B để tránh tương tác hóa học giữa các muối vô cơ ở nồng độ cao, và ngăn ngừa kết tủa muối trong quá trình bảo quản. Các dung dịch gốc mới chứa chất điều hòa sinh trưởng bao gồm TDZ và 2,4D; được điều chế 3 tháng một lần. Canxi hypoclorit [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$] do Aldrich Chemical Company, Inc. cung cấp (Milwaukee, WI)

- Dung dịch TDZ (0,5mg/mL): hòa tan 5mg thiadiazuron (Sigma P-6186) trong 100 μL KOH 1N và bổ sung nước cất đến thể tích cuối cùng bằng 10mL. Bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

- Dung dịch 2,4D (10mg/mL): hòa tan 100mg 2,4-điclophenoxyaxetic (Sigma D-8407) trong 8mL 100% etanol, sau đó bổ sung nước đến 10mL. Bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

- Dung dịch Kinetin và BAP (10mg/mL): hòa tan 10mg kinetin hoặc BAP trong 50 μL NaOH 1N và bổ sung nước đến 1mL. Bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

- Dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW 10X A (tính trên 1L): 14,16g NH_4NO_3 ; 19,68g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

- Dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW 10X B (tính trên 1L): 15,59g K_2SO_4 ; 7,40g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,49g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,65g KH_2PO_4 . Bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

- Dung dịch dinh dưỡng vi lượng DKW 100X C (tính trên 1L): 1,70g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 3,34g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 3,38g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4,54g Na-EDTA; 0,48g H_3BO_3 ; 25mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 39mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

- Dung dịch vitamin DKW 1000X (trên 100mL): 10,0g myo-inositol; 0,2 g thiamin-HCl; 1g axit nicotinic; 1g glyxin; 1g tryptophan. Phân bố 1mL dung dịch vào ống Eppendorf. Bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

- Môi trường sinh trưởng mô sẹo sơ cấp (tính trên 1L): 100mL mỗi dung dịch DKW A và dung dịch DKW B; 10,0mL Dung dịch dinh dưỡng vi lượng DKW; 1mL dung dịch vitamin DKW; 20,0g glucoza; 250mg glutamin; 100mg (= 200mg/L) myo-inositol; 200,0 μL (= 2,0mg/L) dung dịch 2,4-D; 10,0 μL (= 5 $\mu\text{g/L}$) dung dịch TDZ. Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8. 2,0g phytagel (sigma P-8169).

- Môi trường sinh trưởng mô sẹo thứ cấp (tính trên 1L): 2,3g McCown's (Lloyd and McCown. 1981) hỗn hợp muối thực vật thân gỗ (Sigma M-6774); 1mL Gamborg's (Gamborg's.1966) dung dịch vitamin (Sigma G-1019); 20,0g glucoza; 200,0 μL (= 2,0mg/L) dung dịch 2,4-D; 5,0 μL (= 0,05mg/L) dung dịch BAP; hoặc 30,0 μL (= 0,3mg/mL) dung dịch kinetin. Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8. 2,2 g phytagel.

- Môi trường phát triển phôi (ED) (tính trên 1L): 100,0mL mỗi dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW A và dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW B; 10,0mL dung dịch dinh dưỡng vi lượng DKW; 1mL dung dịch vitamin DKW; 40,0g sucroza. Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8. 2,0g phytagel

- Môi trường phát triển phôi (ED) (tính trên 1L): 100,0mL mỗi dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW A và dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW B; 10,0mL dung dịch dinh dưỡng vi lượng DKW; 1mL dung dịch vitamin DKW; 30,0g sucroza; 2,0g phytagel. Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8

- Môi trường phát triển phôi (EDL) (tính trên 1L): 100,0mL mỗi dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW A và dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW B; 10,0mL dung dịch dinh dưỡng vi lượng DKW; 1,0mL dung dịch vitamin DKW; 20,0g glucoza; 0,3 g KNO_3 ; 1,8g Phytagel. Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8

- Dung dịch gốc axit amin 1000X (1mL/L mỗi axit amin): L-Lysin 45,65mg/L; L-Leucin 32,80mg/L; L-Tryptophan 51,05mg/L; Arginin 43,55mg/L; Glyxin 18,76mg/L;

- Môi trường tái sinh thực vật (PR) (tính trên 1L): 50mL mỗi dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW A và dung dịch dinh dưỡng đa lượng DKW B; 5 mL dung dịch dinh dưỡng vi lượng DKW; 0,5 mL dung dịch vitamin DKW; 4,5mg/L IBA ; 10,0g glucoza; 5,0g sucroza; 0,3 g KNO₃. Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8. 1,8g phytigel.

- Các dung dịch khác: etanol 95% (thể tích/thể tích) điều chế bằng nước vô trùng.

- Thiết bị: Tủ hút Laminar, vùng nuôi cây trong bóng tối với nhiệt độ không đổi ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và vùng nuôi cây chiếu sáng với chu kỳ hàng ngày là 16 giờ (chiếu sáng) và cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp nằm trong khoảng từ 50 đến 190 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$.

- Dụng cụ: ống ly tâm đáy hình nón vô trùng dung tích 50mL, đĩa petri vô trùng kích cỡ 100mm x 15mm, bình magenta G7, chai Pyrex (1L và 0,5L), lưới dao có tay cầm số 11, kẹp vi phẫu, băng keo cách điện cách nhiệt loại nhỏ, khăn giấy vô trùng và hỗn hợp giá thể đất Metro-mix 300 (Scotts Sierra Horticultural Product Co. Marylandville. OH)

Nguyên liệu thực vật: Nụ hoa ca cao chưa trưởng thành chưa nở kích cỡ 5 đến 8mm (có kiểu gen thay đổi), được thu nhận từ 8 giờ đến 11 giờ sáng.

Quy trình

Mô gốc nhị lép và cánh hóa được sử dụng làm mảnh cấy. Mặc dù nụ hoa chưa trưởng thành với nhiều kích cỡ có thể được thu nhận, nụ hoa có kích cỡ lớn cần được chọn do các nụ hoa này dễ phân loại và xử lý khi không phân tích bằng kính hiển vi. Ngoài ra, các mảnh cấy gốc nhị lép và cánh hóa cần được tách khỏi các bộ phận hoa liên quan, như vòi nhị và mô cánh tràng hoa, để giảm thiểu các tương tác có thể ảnh hưởng đến sinh trưởng *in vitro* của các mảnh cấy.

Nụ hoa chưa trưởng thành được thu nhận vào ống ly tâm dung tích 50mL chứa nước lạnh vào buổi sáng trước 9 giờ sáng.

Điều chế dung dịch canxi hypochlorit 1% (khối lượng/thể tích) bằng cách hòa tan 0,5g Ca(OCL)₂ trong 50mL nước vô trùng trong ống ly tâm vô trùng dung tích 50mL.

Trong tủ hút cây chuyển, gạn nước lạnh khỏi ống ly tâm chứa nụ hoa chưa trưởng thành và chuyển toàn bộ nụ hoa vào ống ly tâm vô trùng chứa dung dịch canxi hypochlorit.

Ngâm nụ hoa trong dung dịch canxi hypochlorit trong 20 phút. Loại bỏ toàn bộ dung dịch này và bổ sung 40mL nước vô trùng để rửa nụ hoa. Rửa ít nhất 3 lần.

Chuyển nụ hoa vào đĩa petri, và đặt đĩa để ngăn ngừa hút ẩm.

Phân tích vi phẫu nụ hoa và cảm ứng tạo mô sẹo

Đặt hai đến ba lớp khăn giấy vô trùng vào tủ hút cấy chuyển. Thấm khô 4 nụ hoa lên mặt phía trên của các khăn giấy, sau đó chuyển vào nắp đĩa petri.

Cắt lát nụ hoa ngang qua vị trí khoảng 1/3 chiều dài nụ hoa tính từ gốc bằng cách sử dụng lưỡi dao vô trùng. Tách mô gốc nhị lép và cánh hóa cùng nhau khỏi bộ phận của nụ hoa bằng cách sử dụng hai kẹp vi phẫu vô trùng. Loại bỏ mô cánh tràng hoa bất kỳ bám vào khối mảnh cây gốc cánh tràng hoa.

Chuyển các mảnh cây gốc nhị lép và cánh hóa từ 4 nụ hoa vào đĩa petri chứa 30mL môi trường PCG. Phân tách các mảnh cây gốc nhị lép và cánh hóa bất kỳ dính vào nhau và phân bố các mảnh cây đều trong môi trường.

Đậy kín các đĩa petri bằng hai lớp parafilm và duy trì quá trình nuôi cấy trong bóng tối ở nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 14 ngày.

Chuyển mảnh cây nhị lép vào đĩa petri chứa 30mL môi trường SCG, và mảnh cây gốc cánh tràng hoa vào một đĩa petri giống hệt khác. Đậy kín các đĩa và duy trì quá trình nuôi cấy trong bóng tối trong 14 ngày nữa.

Biểu hiện và duy trì phôi soma

Chuyển các mảnh cây gốc nhị lép và cánh hóa vào các đĩa petri chứa 30mL môi trường ED4 và nuôi cấy các mảnh cây trong bóng tối trong 14 ngày.

Nuôi cấy cấp hai các mảnh cây trên môi trường ED3 mới 3 đến 5 lần. Duy trì nuôi cấy phôi trong bóng tối với khoảng thời gian nuôi cấy cấp hai cách nhau 14 ngày cho đến khi phôi soma trưởng thành.

Quy trình tạo phôi soma thứ cấp

Tách các trụ trên lá mầm của phôi sơ cấp với khối lượng từ 10mg đến 40mg và cắt thành các lát mỏng, và đặt vào đĩa petri chứa 30mL môi trường SCG (chứa 6-benzylaminopurin hoặc kinetin phụ thuộc vào kiểu gen cụ thể) hoặc trong bình chứa 25mL môi trường lỏng SCG mỗi 14 ngày trong điều kiện chiếu sáng với chế độ 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng:08 giờ trong bóng tối. Đặt các bình trên máy lắc ở tốc độ 100 vòng/phút để ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C

Chuyển các lát mỏng này vào đĩa petri chứa 30mL môi trường nuôi cấy ED4 hoặc trong bình chứa 25mL môi trường ED3 mỗi 14 ngày trong điều kiện chiếu sáng với chế độ 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng:08 giờ trong bóng tối. Đặt các bình trên máy lắc ở tốc độ 100 vòng/phút để ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C.

Nuôi cấy cấp hai các mảnh cấy vào đĩa petri chứa 30mL môi trường rắn ED3 mới hoặc trong bình chứa 50mL môi trường ED3 mỗi 14 ngày trong điều kiện chiếu sáng với chế độ 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng:08 giờ trong bóng tối. Đặt các bình trên máy lắc ở tốc độ 100 vòng/phút để ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C.

Chuyển phôi ở giai đoạn hình tim hoặc giai đoạn hình ống sớm và đặt vào thiết bị phản ứng sinh học chứa môi trường ED3 với nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 40mg/mL và ngâm tạm thời 6 lần một ngày với 2 phút một lần ngâm và chuyển môi trường lỏng mỗi 20-30 ngày (1 hoặc 2 lần). Ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C với chế độ chiếu sáng là 12 giờ tiếp xúc với ánh sáng:12 giờ trong bóng tối.

Biến đổi phôi và tạo thực vật trong môi trường lỏng

Trong thời gian này, phôi được trưởng thành và cần chuyển môi trường sang môi trường lỏng EDL (nồng độ 100mg/mL) và ngâm tạm thời 6 hoặc 8 lần một ngày với 2 hoặc 1 phút một lần ngâm và chuyển môi trường lỏng mỗi 20-30 ngày (1 hoặc 2 lần) cho đến khi phôi có các gốc và 3 đến 5 lá. Sau đó, chuyển vào nhà kính để thích nghi với điều kiện khí hậu. Ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C với chế độ chiếu sáng là 12 giờ tiếp xúc với ánh sáng:12 giờ trong bóng tối.

Đối với phôi loại I, chọn lọc các phôi đã nảy mầm và chuyển chúng vào các đĩa petri chứa 30mL môi trường RP.

Duy trì quá trình nuôi cấy trong 14 ngày với chế độ chiếu sáng 24 giờ.

Chuyển phôi thay chuyển sang màu xanh có rễ và chồi sang môi trường PR trong bình Magenta.

Duy trì quá trình nuôi cấy như mô tả trong các bước 15 với nuôi cấy cấp hai vào môi trường PR mới mỗi 14 ngày.

Trồng các cây con đã phát triển lá xanh và gốc rễ khỏe mạnh vào các chậu nhựa có đường kính 10,16cm chứa hỗn hợp giá thể đất Metro-mix 300 vô trùng. Đổ nước vào chậu để ngấm đều hỗn hợp giá thể đất này. Đặt cây con bằng cách sử dụng bình

Magenta. Duy trì các thực vật trong nhà kính có độ ẩm bằng 80% được kiểm soát bằng hệ thống phun nước tự động. Tưới nước thường xuyên để duy trì độ ẩm thích hợp để thực vật sinh trưởng tối ưu.

Khi thực vật ra lá mới, gỡ bỏ bình đây. Bón phân thường xuyên để tăng cường sinh trưởng thực vật.

Các mảnh cây cần nuôi cấy cấp hai vào môi trường mới mỗi hai tuần. Giảm sinh trưởng, lão hóa, và sậm màu mô có thể xuất hiện với nuôi cấy cấp hai trong khoảng thời gian dài hơn 14 ngày.

Hai loại phôi soma có thể được xác định dựa trên các đặc tính sau: Trục phôi loại I. Trong quá trình nhân bội trên môi trường ED, phôi loại I trưởng thành có xu hướng vẫn không hoạt động. Sau khi chuyển vào môi trường EDL, các phôi này phát triển lá mầm rất nhanh, sau đó phát triển lá thực. Sự phát triển rễ khi nảy mầm phôi loại I thường chậm. Phôi soma loại II có màu hơi trắng và có cấu trúc trục phôi xác định. Các phôi này trải qua quá trình nảy mầm tự phát khi trưởng thành trên môi trường ED. Sau khi chuyển vào môi trường EDL, các phôi này chuyển sang màu xanh nhanh chóng, có trụ dưới lá mầm phát triển tương đối nhanh, và tạo ra gốc rễ khỏe, trong một thời gian ngắn. Trụ trên lá mầm và sản sinh lá thực thường xuất hiện 2 đến 3 tuần sau chuyển.

Ví dụ 2-Sử dụng trụ trên lá mầm để cảm ứng và biểu hiện phôi bởi quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp, và sản sinh phôi ở giai đoạn lá mầm trưởng thành

Phát triển phôi soma sơ cấp

Phôi soma sơ cấp thu được bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả bởi Li et al. (1998). Toàn bộ các thuốc thử được sử dụng trong thử nghiệm này do Sigma cung cấp.

Nụ hoa chưa trưởng thành của dòng *Theobroma cacao* L. CCN-10 được thu nhận vào ống ly tâm dung tích 50mL chứa nước lạnh vào buổi sáng trước 9 giờ sáng.

Điều chế dung dịch canxi hypochlorit 1% (khối lượng/thể tích) bằng cách hòa tan 0,5 g Ca(OCl)_2 trong 50mL nước vô trùng trong ống ly tâm vô trùng dung tích 50mL.

Trong tủ hút cấy chuyển, gạn nước lạnh khỏi ống ly tâm chứa nụ hoa chưa trưởng thành và chuyển toàn bộ nụ hoa vào ống ly tâm vô trùng chứa dung dịch canxi hypochlorit.

Ngâm nụ hoa trong dung dịch canxi hypochlorit trong 25 phút. Loại bỏ toàn bộ

dung dịch này và bổ sung 40mL nước vô trùng để rửa nụ hoa. Rửa ít nhất 3 lần. Chuyển nụ hoa vào đĩa petri, và đặt đĩa để ngăn ngừa hút ẩm.

Đặt hai đến ba lớp khăn giấy vô trùng vào tủ hút cây chuyên. Thấm khô 4 nụ hoa lên mặt phía trên của các khăn giấy, sau đó chuyển vào nắp đĩa petri.

Cắt lát nụ hoa ngang qua vị trí khoảng 1/3 chiều dài nụ hoa tính từ gốc bằng cách sử dụng lưỡi dao vô trùng. Tách mô gốc nhị lép và cánh hóa cùng nhau khỏi bộ phận của nụ hoa bằng cách sử dụng hai kẹp vi phẫu vô trùng. Loại bỏ mô cánh tràng hoa bất kỳ bám vào khối mảnh cây gốc cánh tràng hoa.

Chuyển các mảnh cây gốc nhị lép và cánh hóa vào đĩa petri chứa 30mL môi trường PCG. Đặt kín các đĩa và duy trì quá trình nuôi cấy trong bóng tối trong 14 ngày, sau đó chuyển vào môi trường SCG mỗi 14 ngày, sau quá trình nuôi cấy này, chuyển mảnh cây vào môi trường ED4 mỗi 14 ngày, sau đó chuyển vào môi trường ED3 để biểu hiện phôi trong 3 hoặc 4 lần từ 14 ngày. Đặt kín các đĩa petri bằng hai lớp parafilm và duy trì quá trình nuôi cấy trong bóng tối ở nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Thành phần của các môi trường khác nhau được sử dụng trong quá trình sản xuất phôi sơ cấp được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Thành phần của môi trường PCG, SCG, ED4 và ED3

Môi trường tạo phôi soma sơ cấp gián tiếp							
PCG	1L	SCG	1L	ED-4	1L	ED-3	1L
DKW Macro A (10X)	100mL	McCown's WPM (Macro)	100%	DKW Macro A (10X)	100mL	DKW Macro A (10X)	100mL
DKW Macro B (10X)	100mL	McCown's WPM (Micro)	100%	DKW Macro B (10X)	100mL	DKW Macro B (10X)	100mL
DKW Micro (100X)	10mL			DKW Micro (100X)	10mL	DKW Micro (100X)	10mL
DKW vitamin (1000X)	1mL	Gamborg B5 vitamin (1000X)	1mL	DKW vitamin (1000X)	1mL	DKW vitamin (1000X)	1mL
Glucoza	20g	Glucoza	20g	Sucroza	40g	Sucroza	40g
2,4-D (1mg/mL)	2000 μL	2,4-D (1mg/mL)	2000 μL				

TDZ (1mg/mL)	25µL	6 đến BAP (1mg/mL)	50µL				
		hoặc	hoặc				
		Kinetin (1mg/mL)	300µL				
Glutami n	250mg						
Myo- Inositol	100mg						
Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8 bằng KOH 1M		Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8 bằng KOH 1M		Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8 bằng KOH 1M		Điều chỉnh độ pH đến pH = 5,8 bằng KOH 1M	
Phytigel	2g	Phytigel	2,2g	Phytigel	2g	Phytigel	2g
Thời gian hấp	18 phút	Thời gian hấp	18 phút	Thời gian hấp	18 phút	Thời gian hấp	18 phút

Để sản sinh phôi thứ cấp, trụ trên lá mầm được tách từ phôi soma sơ cấp có kích cỡ bằng 1cm và khối lượng bằng 40mg và chúng được cắt thành 10 đến 15 lát mỏng và đặt vào bình chứa 25mL môi trường lỏng để cảm ứng phát sinh phôi (Bảng 5) với một số cải biến trong thiết kế thử nghiệm (Bảng 7) mỗi 5 tuần (bước c). Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong điều kiện 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng:8 giờ trong bóng tối, ở nhiệt độ bằng $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp hoặc cường độ dòng photon hữu hiệu cho quang hợp (PPFD) nằm trong khoảng từ 50 đến $190\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$.

Sau khoảng thời gian này, phôi soma ở giai đoạn hình cầu được chuyển vào đĩa petri trong môi trường phát triển bán rắn (Bảng 6) với một số cải biến (Bảng 8), với thời gian nuôi cấy là 21 ngày trong điều kiện chiếu sáng cho đến khi phôi biểu hiện và phát triển sang giai đoạn hình tim hoặc giai đoạn hình ống sớm.

Sau đó, các mô nuôi cấy được chuyển vào đĩa petri trong cùng môi trường, nhưng không chứa axit gibberellic và với cùng điều kiện nuôi cấy nhưng trong bóng tối với chuyển môi trường mỗi 14 ngày để phôi trưởng thành.

Bảng 5. Môi trường cảm ứng

Thành phần	Nồng độ
Các chất dinh dưỡng đa lượng MS (Murashige and Skoog, 1962)	25%
Các chất dinh dưỡng vi lượng	50%
KH ₂ PO ₄ ,	20,5-80,5mg/L, ví dụ 42,5mg/L
Fe-EDTA,	5-40,5mg/L, ví dụ 21,5mg/L
Pyridoxin	0,1-50mg/L, ví dụ 1mg/L
Axit nicotinic	0,1-50mg/L, ví dụ 1mg/L
Thiamin	1,0-500mg/L, ví dụ 10mg/L
BAP	0,1-2,0mg/L, ví dụ 1mg/L
Sucroza	20-120g/L, ví dụ 30g/L
Myo-inositol	10-200mg/L, ví dụ 100mg/L
Phytigel (chỉ môi trường rắn)	1,5-2,5g/L, ví dụ 2,0g/L

Bảng 6. Môi trường phát triển

Thành phần	Nồng độ
Các chất dinh dưỡng đa lượng MS (Murashige and Skoog, 1962)	100%
Các chất dinh dưỡng vi lượng	100%
canxi pantothenat	2,0mg/L, ví dụ 1mg/L
Fe-EDTA,	10-42,5mg/L, ví dụ 21,5mg/L
Pyridoxin,	50mg/L, ví dụ 1mg/L
Axit nicotinic,	50mg/L, ví dụ 1mg/L
Thiamin	2,0mg/L, ví dụ 1mg/L
Biotin	2,0mg/L, ví dụ 0,1mg/L
BAP	2,0mg/L, ví dụ 0,3mg/L
Sucroza	20-120g/L, ví dụ 30g/L
Myo-inositol	10-200mg/L, ví dụ 100mg/L
Dung dịch gốc axit amin 1000X	1mL/L
Phytigel (chỉ môi trường rắn)	1,5-3,0g/L, ví dụ 2,2g/L

Xác định nồng độ cân bằng hormon để tạo phôi soma thứ cấp trực tiếp

Nhiều môi trường được thử nghiệm để đánh giá nồng độ hormon thực vật và chất gây điều kiện khắc nghiệt được sử dụng trong để tạo phôi soma thứ cấp trực tiếp, như được thể hiện trong các bảng sau:

Bảng 7. Môi trường cảm ứng phát sinh phôi

Dòng	Môi trường	Điều kiện môi trường	Mô cấy	Nồng độ cấy	Nồng độ giberlin (mg/L)	Nồng độ Sucroza (g/L)	Số thử nghiệm lặp lại
CCN10	CATIE lỏng	21 ngày trong điều kiện chiếu sáng, sau đó 21 ngày trong bóng	Lá mầm	1 phôi sơ cấp/50mL môi trường	0	40 80	5 5
					0,2	40 80	5 5

		tối để trưởng thành hoàn toàn, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 27°C			0,4	40 80	5 5
					0,6	40 80	5 5
					1,0	40 80	5 5

Bảng 8. Môi trường phát triển (CATIE)

Dòng	Môi trường	Điều kiện môi trường	Mô cấy	Nồng độ cấy	Nồng độ BAP (mg/L)	Nồng độ Sucroza (g/L)	Số thử nghiệm lặp lại
CCN10	YASUDA lỏng	16 giờ tiếp xúc với ánh sáng, 8 giờ trong bóng tối, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 27°C	Lá mầm	1 phôi sơ cấp/50mL môi trường	1,0	40	5
							5
							5
							5
						80	5
							5

Quy trình nghiên cứu phân tích mô

Các mô cấy lá mầm được thu nhận 40 ngày sau cảm ứng và sử dụng để nghiên cứu. Các mẫu được cố định bằng FAA [10% formalin, 5% axit axetic, 50% etanol (thể tích/thể tích)] mỗi 8 ngày. Mẫu cần được cắt trước đến kích cỡ khoảng 0,5 đến 1,0mm. Rửa ba lần trong thời gian 5 phút mỗi lần bằng nước cất hoặc dung dịch đệm để loại bỏ dung môi cố định. Loại nước nguyên liệu bằng cách tăng nồng độ etanol trong ít nhất 1 giờ bằng 70%, 85% và 95% ở nhiệt độ phòng (thời gian ủ thay đổi theo loại nguyên liệu thực vật).

Mỗi mẫu được ủ trong 1mL 1:1 (thể tích/thể tích) nhựa phân tích mô bazơ + 95% etanol trong 1 giờ trong bình hút ẩm áp suất âm trên bơm chân không (5-10 psi). Các mẫu được chuyển vào dung dịch thấm sơ bộ chứa 1:1 (resin/chất hoạt hóa) + 95% etanol và ủ trong bình hút ẩm thủy tinh ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Hỗn hợp mẫu được chuyển vào 500μL dung dịch chứa nhựa phân tích mô bazơ và cần được bảo quản trong ít nhất 24 giờ trong tủ lạnh.

Hỗn hợp mẫu được chuyển vào dung dịch bao. Nhựa phân tích mô cần được lấy ra khỏi tủ lạnh ở trạng thái rắn trước 1 giờ và đặt ở nhiệt độ môi trường. Đối với mỗi dạng

cần chín (9) khối nhựa phân tích mô, 3,5mL dung dịch bazơ và 0,25mL dung dịch hoạt hóa. Phân bố ở dạng này cho đến khi làm đầy nó lên và đặt lên bàn thí nghiệm ở nhiệt độ môi trường trong 1 giờ cho đến khi dung dịch tạo thành lớp mỏng để bao trùm nguyên liệu thực vật. Sau đó, bao gồm nguyên liệu thực vật và đặt trong tủ nuôi cấy 45°C trong 24 giờ, sau đó hỗn hợp mẫu trong khối nhựa được để ở nhiệt độ môi trường trong 3 giờ. Các khối nhựa được loại bỏ ra khỏi dạng này và chúng được dán lên bàn gỗ với vùng có diện tích 2,5mm/2,0mm. Các mẫu được cắt bằng dao phẫu LAICA kiểu MR 1345 với lưỡi thủy tinh có cường độ bằng 8,0µm và nhuộm bằng 0,5% xanh toluidin trong dung dịch đệm phosphat 0,1M (độ pH = 6,5).

Đánh giá và phân tích thống kê

Do các thử nghiệm được thiết lập, các đánh giá được thực hiện mỗi 14 ngày, và một số biến phụ thuộc như: số lượng mô sẹo tạo ra, số lượng phôi bình thường không tạo mô sẹo, số lượng phôi không bình thường không tạo mô sẹo, số lượng tiền phôi, số lượng phôi hình ống, số lượng phôi hình tim, số lượng phôi hình cầu, và chỉ số quan sát tổng cộng. Kính hiển vi kỹ thuật số Dino-Lite, loại AM4113/AD4113 được sử dụng để quan sát.

Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình thống kê R Core Team (2014). R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Kết quả phân tích cân bằng hormon và chất tạo môi trường khắc nghiệt để tạo phôi soma thứ cấp trực tiếp

Thử nghiệm được thực hiện với một loạt môi trường, trong đó môi trường thứ nhất là môi trường cảm ứng (Bảng 7) sau đó kết hợp với môi trường phát triển (Bảng 8). Phân tích giai thừa là 5X2, khi thử nghiệm ở 2 nồng độ sucroza (40 và 80g/L) và 5 nồng độ axit gibberellic (0,0, 0,2, 0,4, 0,6 và 1,0mg/L), bằng cách sử dụng thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên.

Bước thứ nhất để sản sinh phôi soma thứ cấp trực tiếp được cho là để cảm ứng khả năng của tế bào được kích thích bằng chất tạo môi trường khắc nghiệt trong môi trường cảm ứng. For that, phân tích mối tương quan giữa BAP và nồng độ sucroza với một loạt các môi trường chứa axit gibberellic để biểu hiện và phát triển phôi trong môi trường phát triển. Phôi được biểu hiện và phát triển trong một loạt các môi trường. Một loạt môi

trường được mô tả dưới đây là môi trường xử lý tốt nhất để sản sinh phôi thứ cấp trực tiếp:

Bước 1 cảm ứng: 1,0mg/L 6-benzylaminopurin và 40g/L sucroza trong điều kiện chiếu sáng trong 40 ngày để biểu hiện phôi soma (Fig.1);

Bước 2 biểu hiện: 0,6mg/L axit gibberellic và 40g/L sucroza trong điều kiện chiếu sáng trong 21 ngày để phát triển và trưởng thành phôi (Fig.2);

Bước 3 giai đoạn phát triển và giai đoạn trưởng thành: Môi trường tương tự như trong bước 2, nhưng không chứa axit gibberellic trong 3 lần chuyển trong bóng tối. 21-60 ngày là cần cho giai đoạn trưởng thành (Fig.3).

Một loạt môi trường nêu trên tạo ra 83,3% phôi bình thường, khi so với việc xử lý bằng 1mg/L axit gibberellic và 40g/L sucroza, tạo ra số lượng phôi không bình thường cao nhất (Fig.4).

Cần hiểu rằng phần mô tả nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế và các cải biến có thể được thực hiện trong phạm vi của sáng chế. Các patent và đơn công bố được viện dẫn thông qua bản mô tả này. Các patent và đơn công bố được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, để mô tả đầy đủ hơn tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm các cải biến, biến đổi, và biến thể tương đương, như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Mặc dù sáng chế đã được mô tả thông qua các phương án ưu tiên, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các phương án này. Ngược lại, sáng chế cũng bao gồm các cải biến và cải tiến khác nhau nằm trong phạm vi của phần mô tả chi tiết nêu trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống *Theobroma cacao* L., bao gồm các bước sau:

(a-1) thu nhận phôi soma sơ cấp từ mảnh cây của *Theobroma cacao* L., bằng cách

(i) đặt mảnh cây này vào môi trường cảm ứng thứ nhất trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để thu được phôi sơ cấp được cảm ứng; và

(ii) cấy chuyển phôi sơ cấp được cảm ứng này vào môi trường phát triển thứ nhất và nuôi cấy phôi sơ cấp được cảm ứng này trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi soma sơ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp;

(b-1) thu nhận phôi soma thứ cấp từ mô phôi soma sơ cấp, bằng cách

(i) đặt mô phôi soma sơ cấp vào môi trường cảm ứng thứ hai trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để thu được phôi thứ cấp được cảm ứng,

trong đó môi trường cảm ứng thứ hai ở bước (b-1)(i) chứa 6-benzylaminopurin và sucroza,

trong đó:

môi trường cảm ứng thứ hai chứa 6-benzylaminopurin ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5mg/L đến 1,5mg/L, và

môi trường cảm ứng thứ hai chứa sucroza ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/L đến 80g/L;

và (ii) cấy chuyển phôi thứ cấp được cảm ứng này vào môi trường phát triển thứ hai và nuôi cấy phôi thứ cấp được cảm ứng này trong điều kiện chiếu sáng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra phôi soma thứ cấp bằng quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp,

trong đó môi trường phát triển thứ hai chứa axit gibberellic và sucroza,

trong đó:

môi trường phát triển thứ hai chứa axit gibberellic ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,2mg/L đến 0,8mg/L, và

môi trường phát triển thứ hai chứa sucroza ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/L đến 80g/L; và

(c) cấy chuyển phôi soma thứ cấp thu được ở bước (b-1) vào môi trường trưởng thành để phôi soma thứ cấp này trưởng thành.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (a-1), môi trường cảm ứng thứ nhất chứa nồng độ 6-benzylaminopurin cao hơn môi trường phát triển thứ nhất.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước cấy chuyển các phôi thu được ở bước (b-1) vào môi trường phát triển thứ ba thích hợp để hoạt hóa, biểu hiện và sản sinh phôi soma thứ cấp trực tiếp mới và ủ trong môi trường này trong điều kiện chiếu sáng cho đến khi số lượng phôi soma thứ cấp tăng, được thực hiện sau bước (b-1) và trước bước (c).

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó mảnh cấy để sử dụng trong bước (a-1) bao gồm cánh tràng hoa, nhị lép, và trụ trên lá mầm của phôi sơ cấp của *Theobroma cacao* L.

5. Quy trình theo điểm 1, trong đó môi trường được sử dụng trong ít nhất một bước (a-1), (b-1) hoặc (c) là môi trường rắn.

6. Quy trình theo điểm 1, trong đó môi trường được sử dụng trong ít nhất một bước (a-1), (b-1) hoặc (c) là môi trường lỏng.

7. Quy trình theo điểm 1, trong đó nhiệt độ trong các bước (a-1) và/hoặc (b-1) và/hoặc (c) nằm trong khoảng từ 23°C đến 29°C.

8. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (a) và bước (b), quá trình nuôi cấy được thực hiện trong điều kiện chiếu sáng trong ít nhất 12 giờ mỗi ngày.

9. Quy trình theo điểm 8, trong đó chế độ chiếu sáng là 16 giờ tiếp xúc với ánh sáng và 8 giờ trong bóng tối với cường độ bức xạ hoạt hóa quang hợp nằm trong khoảng từ 50 đến 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giờ}$.

10. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước làm nảy mầm sớm, tùy ý làm nảy mầm, và phát triển phôi thu được thành cây con bằng các phương pháp nhân giống.

11. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước nhân giống phôi hoặc cây con thành thực vật có quả.

12. Quy trình theo điểm 11, trong đó quả được hái từ thực vật ban đầu.

13. Quy trình theo điểm 12, trong đó quả được chế biến thành sản phẩm chứa ca cao.

14. Quy trình theo điểm 13, trong đó sản phẩm chứa ca cao là ca cao lỏng, sôcôla, sản phẩm sôcôla, sản phẩm tương tự sôcôla, bột ca cao hoặc bơ ca cao.
15. Quy trình theo điểm 12, trong đó quả được tách lớp thịt quả một phần hoặc hoàn toàn.
16. Quy trình theo điểm 15, trong đó quả đã được tách lớp thịt quả một phần hoặc hoàn toàn được lên men bằng quá trình vi sinh vật hoặc quá trình hóa học.
17. Quy trình theo điểm 12, trong đó quả được sấy khô bằng cách phơi nắng hoặc bằng máy sấy.
18. Quy trình theo điểm 17, trong đó quả tiếp tục được rang.
19. Quy trình theo điểm 18, trong đó quả đã được rang được sàng để thu được nhân hạt.
20. Quy trình theo điểm 19, trong đó nhân hạt được chế biến thành ca cao lỏng hoặc bơ ca cao.
21. Quy trình theo điểm 20, trong đó nhân hạt hoặc ca cao lỏng được chế biến thành bột ca cao.
22. Quy trình theo điểm 19, trong đó nhân hạt được trộn với đường.
23. Quy trình theo điểm 22, trong đó hỗn hợp thu được ở dạng bột nhão.
24. Quy trình theo điểm 23, trong đó bột nhão được nghiền để thu được bột nhão có kích cỡ hạt nhỏ hơn.
25. Quy trình theo điểm 20, trong đó sữa đặc được bổ sung vào.
26. Quy trình theo điểm 25, trong đó hỗn hợp này được chế biến thành canh sữa.
27. Quy trình theo điểm 22, trong đó hỗn hợp được trộn trong máy tạo hình, tùy ý với bơ ca cao và chất nhũ hóa.
28. Quy trình theo điểm 27, trong đó bước trộn được thực hiện trong máy tạo hình.
29. Quy trình theo điểm 27, trong đó sản phẩm cuối cùng là sản phẩm chứa ca cao dùng làm thực phẩm.

30. Quy trình theo điểm 1, trong đó 6-benzylaminopurin có mặt ở nồng độ khoảng 1,0mg/L, axit gibberellic có mặt ở nồng độ khoảng 0,6g/L, và sucroza có mặt trong môi trường cảm ứng và môi trường phát triển ở nồng độ khoảng 40g/L.
31. Quy trình theo điểm 17, trong đó máy sấy là máy sấy Samoan, máy sấy Buttner, máy sấy sàn.
32. Quy trình theo điểm 27, trong đó máy tạo hình là máy tạo hình Frissee, máy tạo hình Tourell, máy tạo hình và tinh chế Macintyre, hoặc hệ thống Wiener..
33. Quy trình theo điểm 28, trong đó sản phẩm chứa ca cao dùng làm thực phẩm là sôcôla, sản phẩm sôcôla, hoặc sản phẩm tương tự sôcôla.
34. Quy trình theo điểm 20, trong đó ca cao lỏng hoặc bơ ca cao, hoặc hỗn hợp của chúng, được trộn với đường.
35. Quy trình theo điểm 24, trong đó bột nhào được nghiền bằng máy nghiền kiểu trục lăn.
36. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (b-1), môi trường cảm ứng thứ hai chứa nồng độ 6-benzylaminopurin cao hơn môi trường phát triển thứ hai.
37. Quy trình theo điểm 1, trong đó *Theobroma cacao* L. là *Theobroma cacao* L. có kiểu gen CCN-10 (CCN10).

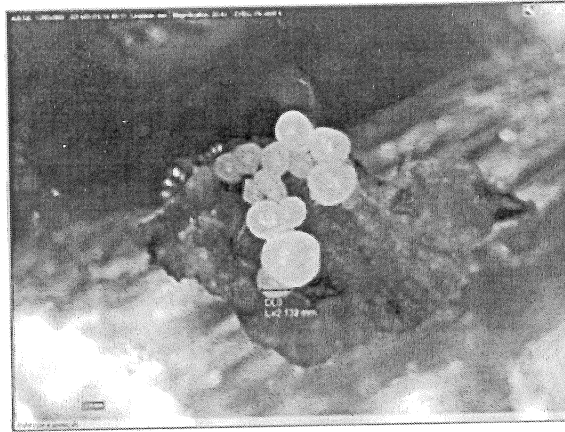


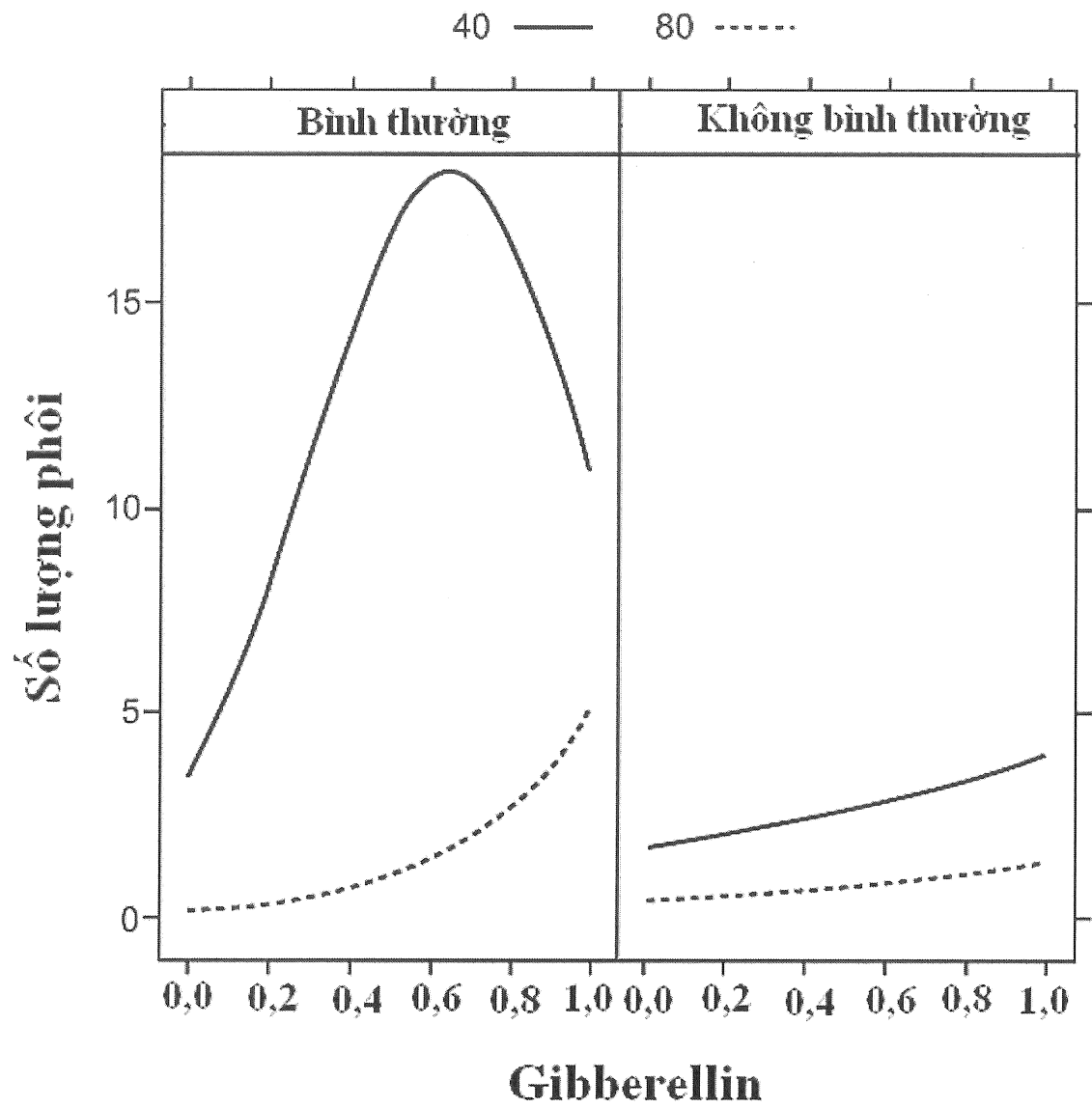
Fig.1



Fig.2



Fig.3

**Fig.4**

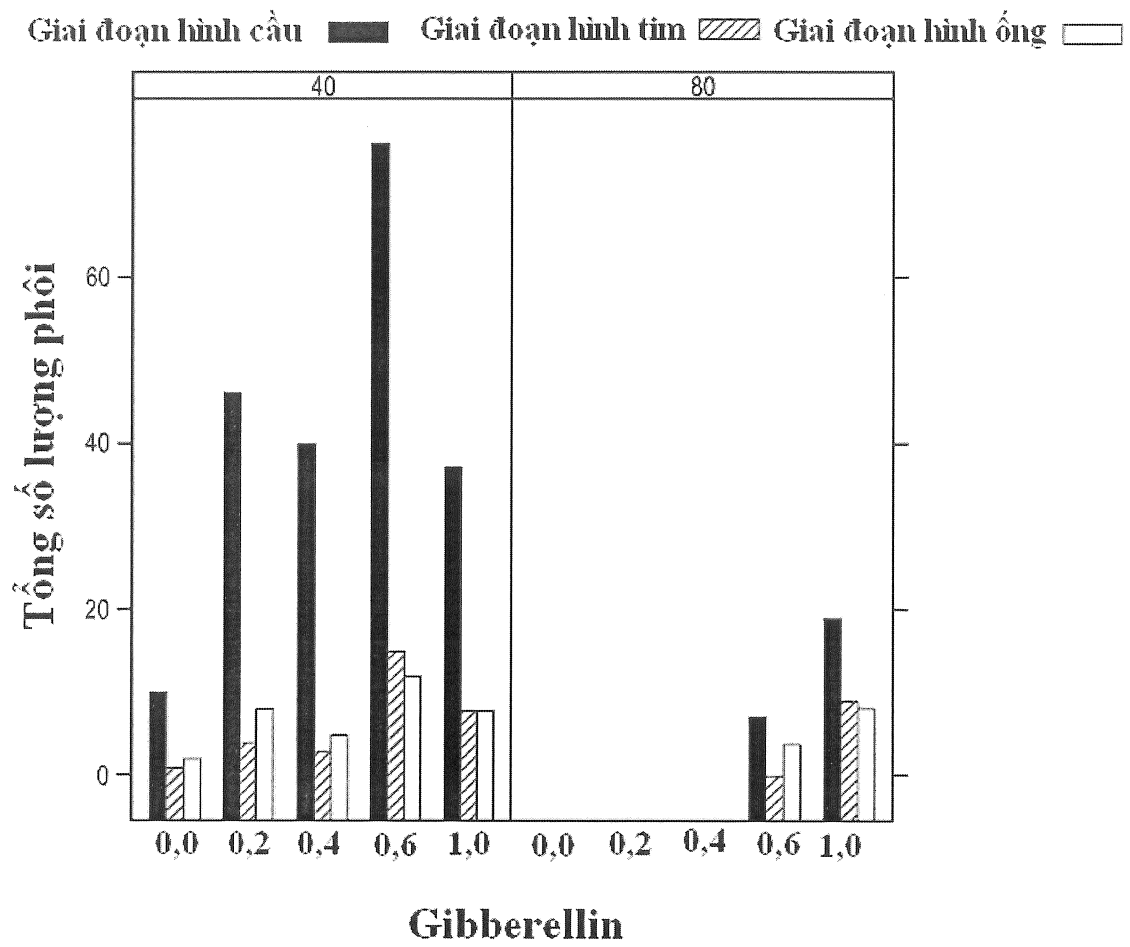
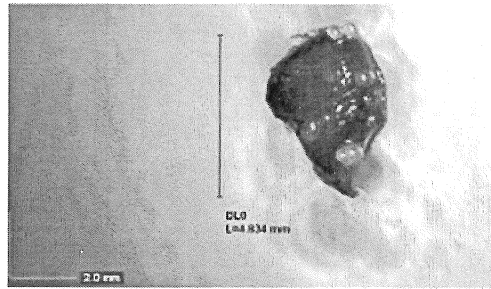
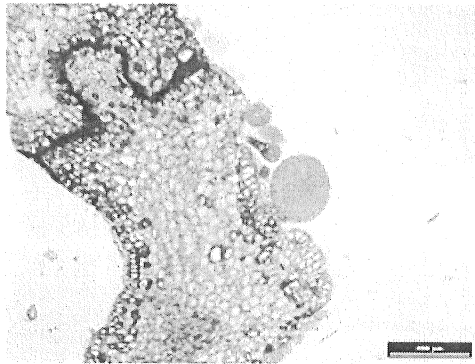
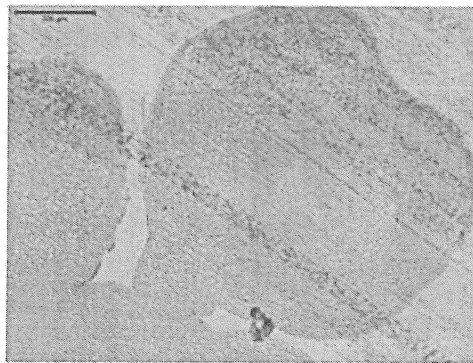


Fig.5

**Fig.6A****Fig.6B****Fig.6C**