



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003262

(51) **A01H 4/00; A61K 36/00**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00577

(22) 16/03/2018

(67) 1-2018-01088

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/04/2019 373A

(73) Công ty Cổ phần Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Anh Đào (VN)
224 Nguyễn Hữu Thọ, ấp 3, xã Long Thới, huyện Nhà Bè, thành phố Hồ Chí Minh

(72) NGUYỄN THỊ TƯỜNG VI (VN); HỒ LÊ DIỄM TRINH (VN); NGUYỄN LÊ
THẢO TÂM (VN).

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY DỪA SÁP (COCOS NUCIFERA L.)

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây dừa Sáp (*Cocos nucifera* L.) từ trái dừa Sáp để bảo tồn nguồn gen và tăng khả năng cho tỷ lệ trái sáp cao, đạt trên 90%. Môi trường nuôi cấy phôi dừa Sáp là môi trường Y3*. Vào mẫu bằng phương pháp vào mẫu trực tiếp cho tỷ lệ mẫu sống, sạch bệnh cao, đạt 96,33%, không làm phôi bị ảnh hưởng bởi tác nhân khử trùng. Quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu, b) cảm ứng phôi, c) tạo chồi, d) tạo cụm chồi, e) tạo rễ và f) thích nghi vườn ươm với tổng thời gian là 240 ngày từ giai đoạn chuẩn bị mẫu cho đến khi cây *in vitro* đạt 3-4 lá, chiều cao cây đạt 15-20 cm, đầy đủ rễ, đạt tiêu chuẩn đưa ra vườn ươm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống dừa Sáp (*Cocos nucifera* L.) bằng phương pháp công nghệ sinh học, cụ thể là phương pháp nuôi cấy cứu phôi để sản xuất cây giống dừa Sáp trên quy mô công nghiệp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dừa Sáp (hay còn được gọi là dừa đặc ruột hoặc dừa kem) đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn công nhận giống chính thức. Dừa Sáp là giống dừa đột biến gen lặn từ giống dừa cao (Rillo và Paloma, 1992). Cây cho sáp chỉ khi mang đồng hợp tử về gen đột biến lặn. Dừa Sáp phân bố ở Việt Nam chủ yếu ở tỉnh Trà Vinh, đặc biệt ở huyện Cầu Kè, nơi được cho là vùng đất tốt nhất để trồng dừa Sáp. Do bản chất di truyền gen đột biến, trong một buồng dừa Sáp chỉ có khoảng 25% trái sáp, số còn lại là trái bình thường. Về phương pháp nhân giống, đối với các giống dừa thường chỉ cần chọn cây mẹ khỏe mạnh, sai trái, chất lượng cơm (dừa khô), nước (dừa non) vừa ý, chờ quả già (khô) thu hái trái để giống. Đối với dừa Sáp, chỉ những trái không có sáp mới có khả năng nảy mầm bình thường ngoài tự nhiên. Những trái sáp mang đồng hợp tử về gen đột biến vì thế không thể nảy mầm một cách tự nhiên. Hơn nữa, dừa Sáp thuộc nhóm dừa cao, thụ phấn chéo, thể hệ cây con khó xác định về tính trạng và chất lượng trái. Có 2 phương pháp nhân giống dừa Sáp chủ yếu được sử dụng là: ươm trái và nuôi cấy cứu phôi. Phương pháp ươm trái là sử dụng trái không sáp ươm thành cây, với phương pháp này cây giống tạo ra có tỷ lệ trái sáp thấp (< 25%). Phương pháp nuôi cấy cứu phôi là sử dụng phôi trái sáp, nuôi cấy *in vitro* trong môi trường nhân tạo, với phương pháp này cây giống tạo ra có tỷ lệ trái sáp cao (> 75%). Đây là công nghệ cao, mới được một số nước trên thế giới nghiên cứu thành công và ứng dụng trong sản xuất giống dừa. Việc nuôi cấy *in vitro* phôi dừa hợp tử (zygotic) đã được nhiều tác giả nghiên cứu thành công từ những năm trước đây như De Guzman và Del Rosario (1974), Assy Bar (1986), Rillo và Paloma (1992), Samosir và cộng sự (1999). Các nghiên cứu này nhằm mục đích cứu lấy những phôi hữu tính phát triển bình thường từ những trái dừa đột biến nhưng có giá trị cao như dừa sáp (makapuno) hay dừa Kopyor (Rillo và Paloma, 1992). Ngoài ra phương pháp này còn được áp dụng trong việc chọn lựa *in vitro* các tính trạng cây trồng khác nhau và bảo quản gen dừa ở nhiệt độ thấp. Cho đến nay, kỹ thuật nuôi cấy phôi dừa tiêu chuẩn quốc tế đã được sử dụng để lập ra bộ sưu tập nguồn gen dừa và sản xuất các cây giống chất lượng cao từ những giống dừa đột biến như dừa Sáp. Phương pháp này được gọi là “Kỹ thuật nuôi cấy phôi mầm” (Batugal, 2002). Hiện nay, công nghệ này đã được ứng dụng sản xuất thương mại tại một số nước như Philippines, Indonesia, Thái Lan, Ấn Độ, SriLanka và Việt

Nam. Philippines là nước nghiên cứu thành công đầu tiên trong việc nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy cứu phôi. Với tỷ lệ phôi phát triển thành cây con ở vườn ươm đạt 60 – 70%, hiện quy trình này đang được áp dụng sản xuất giống thương mại cho giống dừa Makapuno tại 10 phòng thí nghiệm của Trung tâm thuộc Ủy ban dừa Philippines. Đồng thời, một số công ty tư nhân đã ứng dụng công nghệ trên để sản xuất cây giống Makapuno thương mại. Indonesia cũng đã nghiên cứu thành công và ứng dụng trong sản xuất giống dừa Kopyor, với tỷ lệ phôi phát triển thành cây con ở vườn ươm đạt trên 80%. Trong quy trình sử dụng phương pháp thích nghi bằng các mô hình nhà thích nghi. Thái Lan đã nghiên cứu thành công và ứng dụng trong sản xuất cây giống dừa Maphao Kathi, với tỷ lệ phôi phát triển thành cây con ở vườn ươm đạt 56%. Đồng thời, một công ty tư nhân đã tham gia sản xuất và thương mại giống dừa trên tại thị trường trong nước. Theo Eeuwens, 1978 môi trường hình thành sẹo và phát sinh phôi tốt nhất trên môi trường Y3. Theo Azpeitia và cộng sự (2003), hình thái sẹo tốt nhất cho quá trình cảm ứng tạo phôi là sẹo có màu trắng trong khoảng nuôi cấy 90 ngày. Theo M. T. PEREZ-NU NEZ1 năm 2005 đã tiến hành đồng thời nghiên cứu khả năng tái tạo phôi từ thể sẹo của phôi sơ cấp và thứ cấp. Từ đó rút ra kết luận khả năng tái tạo phôi soma từ sẹo của phôi thứ cấp là tốt nhất. Đồng thời nhóm cũng chỉ ra rằng trong quá trình nhân sẹo, sẹo được nhân liên tiếp 3 lần là tối ưu nhất. Trong các mẫu được tiến hành khảo sát tạo sẹo thể “plumule” (thể mầm) được đánh giá là nguyên liệu tốt nhất (Hornung, 1995; Chan et al., 1998).

Ở Việt Nam, về nuôi cấy phôi dừa đã có các công trình nghiên cứu từ 1993 (như Nguyễn Hữu Hổ và cộng sự, 1993; Nguyễn Thị Hiền, 1996) nhưng chỉ thực hiện với các giống dừa địa phương mà các giống này có tỷ lệ nảy mầm rất cao khi ươm từ quả, chưa có nghiên cứu nào thực hiện cho các giống dừa quý hiếm. Từ năm 1993, Viện nghiên cứu Dầu và Cây có dầu đã nghiên cứu nhân giống dừa bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi. Đến năm 2006, Viện nghiên cứu quy trình nhân giống dừa sáp bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi, tỷ lệ cây con ở giai đoạn vườn ươm đạt rất thấp 19,2%, thời gian phát triển hoàn thiện từ phôi thành cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn là 24 tháng. Năm 2010, Viện tiếp tục nghiên cứu cải tiến quy trình công nghệ nuôi cấy phôi dừa Sáp để gia tăng tỷ lệ cây con ở vườn ươm, đã gia tăng tỷ lệ thành công của quy trình lên đạt 37%, thời gian phát triển hoàn thiện từ phôi thành cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn là 15 - 16 tháng. Đến nay, quy trình nuôi cấy phôi dừa sáp vẫn đang được các nhà khoa học và các cơ quan tiếp tục nghiên cứu, hoàn thiện để nâng cao tỷ lệ cây con ở giai đoạn vườn ươm. Năm 2013, Công ty Cổ phần Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Anh Đào đã hợp tác với chuyên gia Thái Lan nghiên cứu quy trình nuôi cấy cứu phôi dừa sáp. Ưu điểm của quy trình là chỉ sử dụng một môi trường nuôi cấy từ khi đưa phôi vào môi trường nuôi cấy đến khi mang cây con ra khỏi ống nghiệm và đưa vào túi PE ươm giai

đoạn 1. Tuy nhiên quy trình còn nhiều hạn chế và cần được hoàn thiện như: tỷ lệ phôi phát triển tạo thành cây khoẻ mạnh, sạch bệnh còn thấp (55%), tỷ lệ phôi biến dị cao, môi trường tạo cây hoàn chỉnh chưa phù hợp với tiêu chuẩn đưa cây ra vườn ươm (bộ rễ phát triển yếu, chỉ phát triển rễ cọc, không có hoặc có ít rễ thứ cấp, lá nhỏ, thân nhỏ), phương pháp thuần hoá cây ngoài vườn ươm chưa phù hợp. Nguyên nhân dẫn đến hạn chế trên có thể do các hóa chất khử trùng mẫu chưa phù hợp làm ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm của phôi, hàm lượng các chất bổ sung cho từng giai đoạn chưa thích hợp, thành phần giá thể nuôi cây ở giai đoạn vườn ươm chưa kích thích sự tăng trưởng của cây con.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhân giống cây dừa Sáp (*Cocos nucifera* L.) bằng phương pháp cứu phôi (1 phôi ra 1 cây) từ trái dừa Sáp nhằm mục đích cứu phôi dừa sáp khó nảy mầm, bảo tồn nguồn gen và tăng khả năng cho tỷ lệ trái sáp cao, đạt trên 90% khi áp dụng quy trình so với phương pháp ươm giống truyền thống (chỉ thu được tỷ lệ trái sáp thấp khoảng từ 0-25% trên tổng lượng trái). Đây là tính ưu việt của quy trình nuôi cấy cứu phôi dừa Sáp. Phôi trái dừa sáp đặc ruột được tách ra và nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng có nồng độ thay đổi tùy theo giai đoạn nuôi cấy trong phòng thí nghiệm với điều kiện nhiệt độ và ánh sáng thích hợp.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây dừa sáp (*Cocos nucifera* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu, b) cảm ứng phôi, c) tạo chồi, d) tạo cụm chồi, e) tạo rễ và f) thích nghi vườn ươm.

Quy trình nhân giống trong điều kiện *in vitro* này kéo dài trong 240 ngày cho cây đạt tiêu chuẩn ra vườn ươm có 3 lá trở lên và bộ rễ khoẻ mạnh. Tỷ lệ mẫu sống, sạch bệnh khi vào mẫu bằng phương pháp vào mẫu trực tiếp đạt 96,33%. Đây là điểm khác biệt của quy trình nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy cứu phôi dừa Sáp của đơn vị so với các quy trình trước đây. Tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh cao không làm phôi bị ảnh hưởng bởi tác nhân khử trùng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là biểu đồ và hình vẽ thể hiện các chồi dừa sáp thu được trong môi trường Y_3^* bổ sung BA và IBA sau 45 ngày nuôi cấy, trong đó A1: không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng; A2: 5mg/l BA; A3: 10mg/l BA; A4: 15mg/l BA; A5: 1mg/l IBA, A6: 5mg/l BA, 1 mg/l IBA; A7: 10mg/l BA, 1mg/l IBA; A8: 15mg/l BA, 1mg/l IBA; A9:

2mg/l IBA; A10: 5mg/l BA, 2mg/l IBA; A11: 10mg/l BA, 2 mg/l IBA; và A12: 15mg/l BA, 2 mg/l IBA.

Hình 2 là biểu đồ thể hiện quy trình nhân giống cây dừa Sáp (*Cocos nucifera* L.).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây dừa Sáp (*Cocos nucifera* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu, b) cảm ứng phôi, c) tạo chồi, d) tạo cụm chồi, e) tạo rễ và f) thích nghi vườn ươm. Cụ thể là:

a) Chuẩn bị nguyên liệu

Chọn trái dừa Sáp giống từ những cây cho năng suất cao (>60 trái/cây/năm), có tỷ lệ trái sấp/quả cao (>20%), độ tuổi 11 tháng sau khi thụ phấn, trái đều đặn, không dị dạng, không sâu bệnh, bỏ vỏ xơ ngoài, tránh làm tổn thương các mắt chứa phôi, bỏ đôi trái dừa theo chiều ngang, đưa vào tủ cấy vô trùng, bỏ phần nước và nửa phần trái dừa không chứa phôi, dùng dụng cụ chuyên dụng tách một phần cơm dừa chứa phôi tạo thành một khoanh tròn để lấy phôi cho vào môi trường nuôi cấy là môi trường Y3 cải tiến (Y3*), môi trường Y3* đã được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,2 atm trong thời gian 15 phút, pH: 5,6-5,9.

BẢNG THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY (Y₃^{*})

Hợp chất	Hàm lượng mg/l
Các chất dinh dưỡng đa lượng (Y3)	
KNO ₃	2000 - 2050
KCl	1400-1500
NH ₄ Cl	500 - 550
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	300 - 350
CaCl ₂ .2H ₂ O	250 - 300
MgSO ₄ .7H ₂ O	200 - 250
Các chất dinh dưỡng vi lượng (Y3)	
MnSO ₄ .4H ₂ O	11 – 11,5
KI	8 – 8,3

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7 – 7,5
H_3PO_3	3 – 3,5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 – 0,3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 – 0,3
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2 – 0,3
$\text{NiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 – 0,03
Fe_2SO_4	41 - 42
Na_2EDTA	55 - 60
Vitamin và axit amin (UPLB + ARC)	
$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	0,05 - 1,00
$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	0,05 - 1,00
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0,05 - 1,00
$(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5)_2\text{Ca}$	0,05 - 1,00
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	0,05 - 1,00
$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$	0,05 - 1,00
$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	0,05 - 1,00
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	0,05 - 1,00
Glucoza	60,00
Agar	7,00
Than hoạt tính	2,00
pH	5,60 - 5,80

b) Cảm ứng phôi

Phôi dừa vô trùng được cho vào môi trường Y3* lỏng lắc với tốc độ 90-120 vòng/phút, đặt trong tối với thời gian nuôi cấy là 15 ngày. Tỷ lệ mẫu cảm ứng, sạch bệnh trong giai đoạn này đạt 96,33%.

c) Tạo chồi

Sau 15 ngày, cấy chuyển mẫu qua môi trường Y3* đặc có bổ sung 10mg/l BA và 1mg/l IBA để kích thích mẫu bật chồi. Mẫu được đặt ở phòng sáng có nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng 2.000 - 2500 lux, thời gian chiếu sáng 12-14 giờ/ngày. Tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 86,67% sau 45 ngày nuôi cấy.

d) Tạo cụm chồi

Các cây con sau khi hình thành chồi được chuyển vào môi trường tăng trưởng Y3* đặc bổ sung 10mg/l GA3 nhằm mục đích rút ngắn thời gian cây trong phòng thí nghiệm, để cây con tăng trưởng nhanh về chiều cao, kích thước lá, hình thái cây cân đối. Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 95 %. Quá trình này diễn ra 75 ngày.

e) Tạo rễ

Những cây con khỏe mạnh sau đó được nuôi vào môi trường Y3* đặc có bổ sung 10 mg/l NAA nhằm thúc đẩy quá trình tạo cây con hoàn chỉnh, giúp bộ rễ phát triển khỏe mạnh. Tỷ lệ cây tạo rễ đạt 95 %. Quá trình này diễn ra 45 ngày.

e) Thích nghi vườn ươm

Khi cây phát triển hoàn chỉnh, đưa chai mô trong phòng thí nghiệm ra ngoài. Sau 1 tuần, chuyển cây từ chai mô ra túi PE15 (đường kính 10 cm) với giá thể là Perlite:đất:phân bò theo tỷ lệ 2:1:1. Sau 60 ngày, tỷ lệ cây sống đạt 85,33%.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Khảo sát khả năng tạo chồi (Hình 1)

Mục đích: So sánh và xác định được môi trường phù hợp để rút ngắn thời gian và tăng khả năng tạo chồi.

Vật liệu: Mẫu sạch bệnh, không nhiễm nấm, khuẩn.

Cách tiến hành:

Mẫu được cấy vào môi trường nền Y3* đặc có hoặc không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật BA với nồng độ 0,5-10-15 mg/l kết hợp với IBA với nồng độ 0-1-2 mg/l, các nghiệm thức được bố trí như sau:

Bảng hàm lượng BA và IBA trong mỗi mẫu để khảo sát khả năng tạo chồi

BA mg/l IBA mg/l	0	5	10	15
0	A1	A2	A3	A4
1	A5	A6	A7	A8
2	A9	A10	A11	A12

Ghi chú: A1, A2,...A12: là các nghiệm thức thí nghiệm.

Thời gian tiến hành thí nghiệm: 45 ngày.

Điều kiện thí nghiệm: 12-14 giờ chiếu sáng, cường độ ánh sáng 2000 - 2500 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm trung bình 75%.

Mỗi nghiệm thức gồm 10 mẫu, thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Chỉ tiêu theo dõi: Số mẫu nảy mầm, ngày nảy mầm, kích thước chồi (cm), hình thái chồi, kích thước rễ (cm).

Kết quả: Sau 45 ngày thực hiện thí nghiệm, sáng chế ghi nhận được kết quả như sau: ở các lô thí nghiệm đều có mẫu cảm ứng tạo chồi nhưng số lượng mẫu tạo chồi cũng như hình thái chồi có sự khác biệt.

Theo chiều tăng dần nồng độ BA (0-5-10-15 mg/l) số mẫu đáp ứng tạo chồi, kích thước chồi, rễ cũng tăng dần. Ở lô thí nghiệm A1 khi không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng tỷ lệ mẫu đáp ứng tạo chồi thấp nhất 26,7%, mẫu chồi có màu xanh đậm, kích thước chồi thấp, rễ ngắn. Như vậy, nồng độ cytokinin nội sinh của phôi thấp, làm kéo dài thời gian nảy mầm và phát triển chồi của phôi.

Ở lô thí nghiệm A12 tỷ lệ mẫu đáp ứng tạo chồi đạt 83,3%. Tuy nhiên mẫu chồi bị phù ra, chồi ngả màu trắng, rễ kém phát triển. Điều này có thể do nồng độ cytokinin quá cao.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống cây dừa Sáp (*Cocos nucifera* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu: chọn trái dừa sáp giống từ những cây cho năng suất cao (>60 trái/cây/năm), có tỷ lệ trái sáp/quả cao (>20%), độ tuổi 11 tháng sau khi thụ phấn, trái đều đặn, không dị dạng, không sâu bệnh, bỏ vỏ xơ ngoài, tránh làm tổn thương các mắt chứa phôi, bỏ đôi trái dừa theo chiều ngang, đưa vào tủ cấy vô trùng, bỏ phần nước và nửa phần trái dừa không chứa phôi, dùng dụng cụ chuyên dụng tách một phần cơm dừa chứa phôi tạo thành một khoanh tròn để lấy phôi cho vào môi trường nuôi cấy là môi trường Y3 cải tiến (Y3*), môi trường Y3* đã được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,2 atm trong thời gian 15 phút, độ pH từ 5,6 đến 5,9; trong đó môi trường Y3* có thành phần như sau:

Hợp chất	Hàm lượng mg/l
Các chất dinh dưỡng đa lượng (Y3)	
KNO ₃	2000 - 2050
KCl	1400-1500
NH ₄ Cl	500 - 550
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	300 - 350
CaCl ₂ .2H ₂ O	250 - 300
MgSO ₄ .7H ₂ O	200 - 250
Các chất dinh dưỡng vi lượng (Y3)	
MnSO ₄ .4H ₂ O	11 – 11,5
KI	8 – 8,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7 – 7,5
H ₃ PO ₃	3 – 3,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,2 – 0,3
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2 – 0,3

NaMoO ₄ .H ₂ O	0,2 – 0,3
NiCl.6H ₂ O	0,02 – 0,03
Fe ₂ SO ₄	41 - 42
Na ₂ EDTA	55 - 60
Vitamin và axit amin (UPLB + ARC)	
C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	0,05 - 1,00
C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ OS.HCl	0,05 - 1,00
C ₆ H ₅ NO ₂	0,05 - 1,00
(C ₉ H ₁₆ NO ₅) ₂ Ca	0,05 - 1,00
C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,05 - 1,00
C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	0,05 - 1,00
C ₂ H ₅ NO ₂	0,05 - 1,00
C ₆ H ₁₂ O ₆	0,05 - 1,00
Glucosa	60,00
Agar	7,00
Than hoạt tính	2,00
pH	5,60 - 5,80

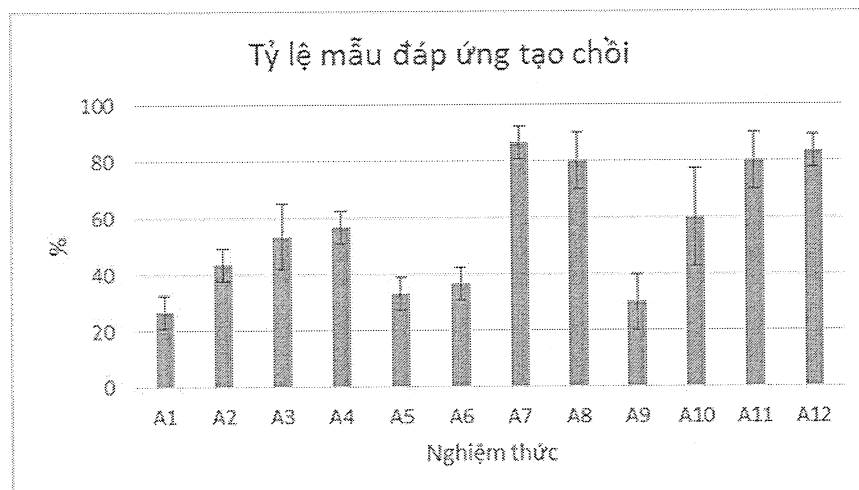
b) cảm ứng phôi: cho phôi dừa được vô trùng vào môi trường Y3* lỏng, lắc với tốc độ 90-120 vòng/phút, đặt trong tối với thời gian nuôi cấy là 15 ngày,

c) tạo chồi: cấy chuyển mẫu ở bước b) qua môi trường Y3* đặc có bổ sung 5-15 mg/l BA và 1-2 mg/l IBA để kích thích mẫu bật chồi, đặt mẫu ở phòng sáng có nhiệt độ 27±2°C, cường độ ánh sáng 2000 - 2500 lux, thời gian chiếu sáng 12-14 giờ/ngày, giai đoạn này kéo dài 45 ngày;

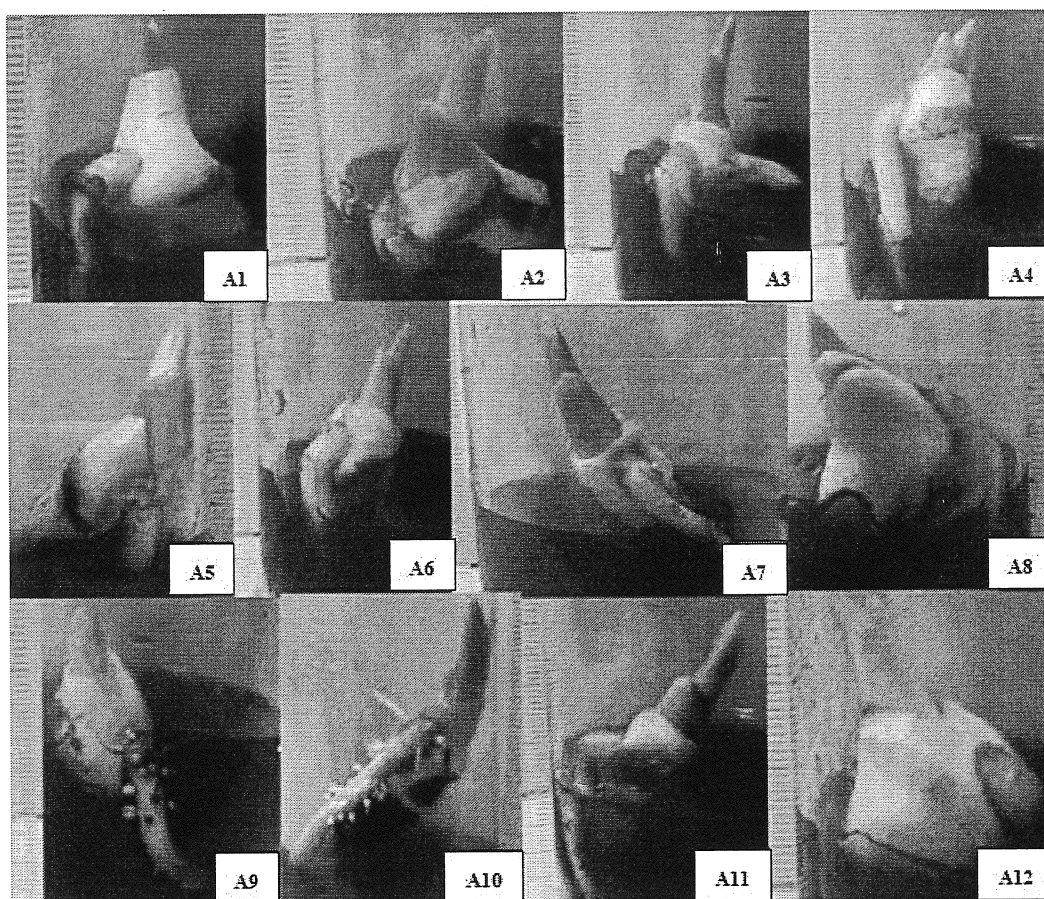
d) tạo cụm chồi: chuyển các cây con sau khi hình thành chồi vào môi trường tăng trưởng Y3* đặc bổ sung 5-15 mg/l GA3 trong 75 ngày;

e) tạo rễ: tiếp tục nuôi những cây con khỏe mạnh trong môi trường Y3* đặc có bổ sung 5-15 mg/l NAA trong 45 ngày; và

f) thích nghi vườn ươm: chọn những cây đạt 3-4 lá, chiều cao cây khoảng 15-20 cm, đầy đủ rễ, đưa những cây này từ phòng thí nghiệm ra vườn thích nghi trong thời gian 7 ngày, chuyển cây từ chai mô ra túi PE15 (đường kính 10cm) với giá thể là Perlite:đất:phân bò theo tỷ lệ 2:1:1, thời gian cây con thích nghi trong vườn ươm khoảng 60 ngày.



Biểu đồ thể hiện kết quả tỷ lệ mẫu đáp ứng tạo chồi



Hình 1

Hình 2

