



VI NHÂN GIỐNG CÂY HOA HUỆ TRẮNG (*POLIANTHES TUBEROSA*) TRONG ĐIỀU KIỆN ÁNH SÁNG TỰ NHIÊN VÀ ĐÁNH GIÁ SỰ SINH TRƯỞNG QUA MÔ HÌNH CANH TÁC

Lê Lý Vũ Vi¹, Nguyễn Bảo Toàn², Trần Văn Hậu², Trần Sỹ Hiếu² và Trần Thị Doãn Xuân²

¹ Sinh viên K35 CNSHTT, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Micropropagation of *Polianthes tuberosa* plant in natural light and evaluation of growth through demonstrations

Từ khóa:

Cây hoa huệ trắng (*Polianthes tuberosa*), nhân giống, ra rễ, thuần dưỡng, mô hình

Keywords:

Polianthes tuberosa, micropropagation, rooting, acclimatization, demonstration

ABSTRACT

Studies were conducted to determine stages of micropropagation including propagation, rooting, acclimatization and growing in the field. Studies were included two parts: in the laboratory and in the field. In the laboratory, the study was to determine factors which affected on propagation, rooting. In the field, the study was to determine factors which affected on acclimatization and evaluation of growth through demonstration. Results of studies showed that polianthes tuberosa obtained high propagation coefficient and good rooting on medium added atonik. Natural light condition ($120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) stimulated rooting better. In acclimatization stage, *Polianthes tuberosa* in atonik medium were more adaptation. In demonstration, results showed that plantlets grew very well and flowered after 5 month planting. Inflorescences obtained with high quality and low pest.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định các giai đoạn của vi nhân giống bao gồm nhân, ra rễ, thuần dưỡng và trồng thử nghiệm ngoài đồng. Nghiên cứu gồm hai phần là trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng. Thí nghiệm trong phòng xác định các yếu tố ảnh hưởng trên sự nhân chồi, ra rễ. Thí nghiệm ngoài đồng nhằm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến sự thuần dưỡng và đánh giá sự sinh trưởng thông qua mô hình canh tác. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng cây hoa huệ trắng đạt được hệ số nhân giống cao. Ra rễ tốt trên môi trường có bổ sung atonik đặt trong trong điều kiện ánh sáng tự nhiên ($120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Trong giai đoạn thuần dưỡng, cây huệ trắng đã được nuôi cấy trong môi trường có atonik thích nghi tốt. Trong mô hình canh tác cho thấy rằng cây huệ trồng từ cây cấy mô sinh trưởng và phát triển rất tốt, bắt đầu ra hoa sau khi trồng năm tháng, cho năng suất và phát hoa có chất lượng cao. Sâu bệnh gây hại tương đối ít, không đáng kể.

1 GIỚI THIỆU

Huệ trắng (*Polianthes tuberosa* L.) là loài hoa cắt cành có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Phương pháp nhân giống cây này theo kiểu truyền thống

chủ yếu bằng củ có nhiều bất lợi như hệ số nhân giống không cao, dễ mang theo mầm bệnh và côn trùng sang. Để hạn chế một số nhược điểm trên, kỹ thuật nuôi cấy phân sinh mô chồi trên cây huệ

trắng đã được nghiên cứu (Huỳnh Thị Huệ Trang và *ctv.*, 2007). Kỹ thuật này giúp phục hồi cây hoa huệ trắng bị bệnh chai bông. Vi nhân giống được Debergh and Zimmerman (1991) chia ra làm 4 giai đoạn. Trong đó giai đoạn 2 và 3 là hai giai đoạn kéo dài thời gian tương đối lâu trong phòng nuôi cấy. Vì vậy sẽ tiêu tốn nhiều năng lượng làm tăng giá thành. Trong vi nhân giống, ánh sáng nhân tạo thường được sử dụng dưới dạng các bóng đèn huỳnh quang hay đèn compact. Việc sử dụng các bóng đèn làm tiêu tốn nhiều năng lượng làm tăng giá thành cây con. Cây con được nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng nhân tạo khi mang đi thuần dưỡng trong điều kiện ánh sáng tự nhiên thường có tỉ lệ chết cao là do cây chưa thích nghi trong điều kiện ánh sáng tự nhiên. Việc sử dụng ánh sáng tự nhiên trong nuôi cấy *in vitro* đã được nghiên cứu trên nhiều loài (Talavera *et al.*, 2005, Be and Debergh, 2006). Tuy nhiên, nghiên cứu áp dụng ánh sáng tự nhiên trong nuôi cấy *in vitro* của cây huệ trắng vẫn chưa được công bố. Sau giai đoạn vi nhân giống cây con được tạo ra cần phải được thử nghiệm ngoài đồng dưới dạng mô hình để đánh giá sự sinh trưởng của cây con và giúp cho nông dân tiếp cận với những kỹ thuật mới trong canh tác hoa huệ trắng. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định các giai đoạn của vi nhân giống bao gồm nhân, ra rễ, thuần dưỡng và trồng thử nghiệm ngoài đồng dưới dạng mô hình.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Giống hoa huệ trắng có nguồn gốc từ nông dân trồng hoa huệ ở An Giang. Chồi cây huệ trắng *in vitro* được sử dụng cho thí nghiệm được nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng. Mẫu được tạo và nhân từ Phòng vi nhân giống của Trại Nghiên cứu và Thực nghiệm Nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Các thí nghiệm trong phòng thí nghiệm

a. *Thí nghiệm 1: Xác định nồng độ NAA và BA thích hợp cho hệ số nhân chồi trong điều kiện ánh sáng tự nhiên*

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung nước dừa 100 ml/l, agar 8 g/l, không đường. Các chất điều hòa sinh trưởng là NAA và BA được bổ sung vào môi trường theo tỉ lệ phối hợp tương ứng với từng nghiệm thức. Đối chứng (0/0), tỉ lệ NAA (mg/l)/BA (mg/l) là 1/4, 1/6, 1,5/4 và 1,5/6. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu

nhiên, 5 nghiệm thức, 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 bọc plastic, tương ứng 4 chồi đơn. Chỉ tiêu theo dõi: số chồi hình thành từ chồi ban đầu. Theo dõi và lấy chỉ tiêu trong vòng 2 tháng.

b. *Thí nghiệm 2: Hiệu quả của NAA và atonik lên sự ra rễ in vitro của huệ trắng trong điều kiện ánh sáng tự nhiên*

Chọn chồi có chiều cao từ 7-8 cm, mỗi bao cây 3 chồi. Sau khi cấy, gấp miệng bao lại và giữ trong phòng tăng trưởng. Đến tuần thứ 3, chồi cây được đặt trong điều kiện ánh sáng tự nhiên. Môi trường thí nghiệm là môi trường cơ bản MS có bổ sung nước dừa (80 ml/L), đường sucrose (20 g/L), NAA (naphthalene acetic acid), Atonik 1,8 DD (Công ty TNHH ADC phân phối). Thành phần của Atonik 1,8 DD gồm các nitrophenol với tỉ lệ sodium-s-nitroguaiacololate 0,03%, sodium-o-nitrophenolate 0,06%, sodium-p-nitrophenolate 0,09%. Loại gói nhỏ 10 ml/L được pha loãng với 1 lít nước. Lượng sử dụng cho thí nghiệm là lượng đã được pha loãng. Các nghiệm thức bao gồm đối chứng, NAA (0,5 mg/l, 1 mg/l; atonik, 2 ml/l và 4 ml/l. Các chỉ tiêu theo dõi: số rễ, chiều dài rễ. Chỉ ghi nhận số rễ và chiều dài rễ khi rễ dài 0,3 cm trở lên.

2.2.2 Các thí nghiệm ngoài phòng thí nghiệm

a. *Xác định tỉ lệ sống của chồi huệ vào giai đoạn thuần dưỡng trong nhà lưới*

Cây con ở từng nghiệm thức của thí nghiệm 2 được đánh giá khả năng thích nghi. Trồng 3 cây vào 1 chậu nhựa chứa giá thể xơ dừa đã được xử lý. Cây con ở các nghiệm thức đều được thuần dưỡng trong điều kiện giống nhau tại nhà lưới (bức xạ ánh sáng, $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và nhiệt độ $31 \pm 1^\circ\text{C}$). Đo ánh sáng bằng Lux meter LX-1010B FUYI sau đó quy đổi Lux sang $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (PAR). Tỉ lệ sống của cây con (%) được ghi nhận sau 30 ngày.

b. *Đánh giá sinh trưởng chồi huệ cấy mô ở ngoài đồng*

Mô hình được thực hiện tại vườn của nông dân tại ấp Tân Long A, xã Tân Thới, huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ. Thực hiện 3 mô hình, mỗi mô hình có diện tích 300 m² trong cùng một xã trên nền đất giống nhau. Cây con được thuần dưỡng làm vật liệu trồng cho mô hình để đảm bảo sạch bệnh. Theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của cây Huệ ở từng mô hình, mỗi mô hình đánh dấu 5 điểm, mỗi điểm ba bụi. Quy trình canh tác: Đào liếp sâu xuống 0,5 m, lấy lớp đất mặt bỏ phía dưới, lớp đất sét để lên trên. Liếp rộng khoảng 1,5 m; rãnh 0,5 m. Rãnh thường đào sâu để giữ nước

lấp xấp chân liếp trồng. Dùng phân hữu cơ (phân chuồng hoai) bón lót theo định mức 3 m³/1000 m² kết hợp với 10 kg phân lân (DAP), 80-100 kg vôi rải đều. Bón phân bổ sung Cho cây sau khi mọc khoảng một tháng, dùng hỗn hợp Urea, Lân và Kali hòa nước tưới cho cây định kỳ 20 ngày một lần cho đến lúc cây có hoa. Làm cỏ thường xuyên để cây không bị cạnh tranh, vun đất để gốc và rễ dễ phát triển nhưng chú ý không vùi củ quá sâu, làm ảnh hưởng đến khả năng đẻ nhánh và làm cho củ bị đất bó chặt sẽ óm yếu cho bông kém.

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Sự nảy chồi được ghi nhận 15 ngày/lần. Thời gian từ khi trồng đến khi cây bắt đầu ra hoa: Ghi nhận thời điểm cây hoa Huệ bắt đầu ra hoa đầu tiên. Đặc điểm phát hoa được ghi nhận như chiều dài, số hoa/phát hoa, thời gian thu hoạch.

Phân tích thống kê: Các số liệu được phân tích thống kê phép thử F, Duncan bằng phần mềm SPSS. Ver 10.2

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hiệu quả của tỉ lệ kết hợp NAA và BA lên sự nhân chồi huệ trắng trong điều kiện ánh sáng tự nhiên

Trong điều kiện ánh sáng tự nhiên, kết quả ghi nhận thể hiện trong Bảng 1. Sau 8 tuần nuôi cấy, số chồi gia tăng giữa các nghiệm thức sử dụng NAA và BA với tỷ lệ khác nhau có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Số chồi gia tăng giữa các nghiệm thức này biến thiên trong khoảng từ 1,3 – 7,1 (chồi).

Bảng 1: Hiệu quả của sự kết hợp giữa các nồng độ NAA và BA lên số chồi của hoa huệ trắng trong điều kiện ánh sáng tự nhiên ở 60 ngày sau khi cấy.

Nghiệm thức (mg/lít)	Số chồi
0	1,33 c
1/4 (1 NAA + 4 BA)	6,60 ab
1/6 (1 NAA + 6 BA)	7,10 a
1,5/4 (1,5 NAA + 4 BA)	5,80 b
1,5/6 (1,5 NAA + 6 BA)	5,70 b
F	**
CV (%)	23,9

Ghi chú: các số trung bình trong cùng 1 cột có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan. (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%

Trong đó, nghiệm thức sử dụng NAA và BA với tỷ lệ 1/6 có số chồi gia tăng cao nhất, không khác biệt thống kê với nghiệm thức sử dụng 1/4 NAA/BA và thấp nhất là nghiệm thức đối chứng.

3.2 Hiệu quả của NAA và atonik lên sự tạo rễ in vitro của hoa huệ trắng trong điều kiện ánh sáng tự nhiên

Kết quả Bảng 2 cho thấy các nghiệm thức có số rễ nhiều và khác biệt có ý nghĩa thống kê với những nghiệm thức còn lại là nghiệm thức có atonik 2 ml/l và atonik 4 ml/l. Các nghiệm thức atonik có số rễ nhiều có thể vì các nitrophenol trong atonik làm tăng hàm lượng IAA nội sinh trong cây bằng cách kích thích sinh tổng hợp IAA đồng thời ức chế hoạt động phân hủy IAA (Djanaguiraman *et al.*, 2005). Atonik ở nồng độ 2 ml/l và 4 ml/l có thể kích thích huệ trắng ra rễ *in vitro*. Các nghiệm thức ánh sáng tự nhiên có số rễ nhiều hơn có thể là do quang phổ đầy đủ của ánh sáng tự nhiên đã kích thích sự quang hợp của cây. Quang hợp tăng lên dẫn đến việc tạo ra nhiều carbohydrate hơn. Thêm vào đó, bức xạ ánh sáng cao làm tăng sự vận chuyển auxin từ chồi đỉnh xuống, kích thích sự tạo rễ (Halliday *et al.*, 2009).

Bảng 2: Hiệu quả của chất điều hòa sinh trưởng lên số rễ và chiều dài rễ in vitro của cây huệ trắng thời điểm 60 ngày sau khi cấy

Nghiệm thức	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
Đối chứng (0)	1,9 ^c	1,5 ^d
NAA 0,5 mg/l	6,7 ^b	2,0 ^c
NAA 1 mg/l	6,9 ^b	2,4 ^c
Atonik 2 ml/l	9,5 ^a	3,5 ^b
Atonik 4 ml/l	9,0 ^a	4,3 ^a
F	**	**
CV(%)	14,8	16,3

Những số có chữ theo sau giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt thống kê; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%

Các nghiệm thức atonik 4 ml/l (Bảng 2) cho rễ dài nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với những nghiệm thức còn lại. Trong thí nghiệm này, nồng độ atonik 4 ml/l có tác dụng rõ rệt lên sự kéo dài rễ *in vitro* cây huệ. Cây trong điều kiện ánh sáng tự nhiên có rễ dài hơn có thể là do quang phổ đầy đủ và bức xạ cao của ánh sáng tự nhiên đã kích thích cây quang hợp và vận chuyển auxin xuống rễ. Những yếu tố này dẫn đến sự sinh trưởng của cây và kéo dài của rễ để tăng diện tích tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng.

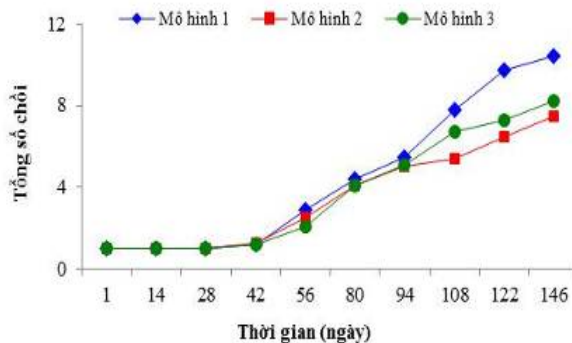
3.3 Ngoài đồng

3.3.1 Tỉ lệ sống (%) của cây con trong giai đoạn thuần dưỡng ở nhà lưới

Kết quả Bảng 3 cho thấy, tỉ lệ sống ở các nghiệm thức atonik 2 ml/l và atonik 4 ml/l cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với những

nghiệm thức khác. Các nghiệm thức NAA 0,5 mg/L và NAA 1 mg/L cho tỉ lệ sống thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với những nghiệm thức còn lại.

Nguyên nhân làm cây chết trong giai đoạn thuần dưỡng có thể vì cây bị mất nước do rễ không hấp thu đủ nước để bù lượng nước thoát hơi qua lá. Khả năng hấp thu nước của rễ liên quan đến lông hút. Như vậy, giả thuyết đặt ra là có thể các lông hút *in vitro* đã không thực hiện được chức năng trong điều kiện *ex vitro*. Theo Klerk and Mehdi Massoumi (2011), lông hút phát sinh *in vitro* rất dễ chết trong giai đoạn *ex vitro* và các lông hút này không thể len vào và hấp thu nước từ giá thể. Đối với các nghiệm thức NAA trong thí nghiệm, giả thuyết đặt ra là rễ ở các nghiệm thức này không kịp phục hồi, dẫn đến cây chết vì mất nước trước khi lông hút mới kịp hình thành trong môi trường *ex vitro*. Đối với trường hợp các nghiệm thức atonik và đối chứng, mặc dù rễ *in vitro* không có lông hút nhưng các rễ này có thể thích nghi và tạo lông hút ngay khi được đưa ra môi trường *ex vitro*. Điều này giúp cây hấp thu nước tốt hơn và tăng khả năng sống sót trong giai đoạn thuần dưỡng.



Hình 1: Sự biến thiên tổng số chồi mới trên bụi theo thời gian tại xã Tân Thới, huyện Phong Điền, Tp. Cần Thơ

Thời gian từ khi trồng đến khi ra hoa

Sau giai đoạn này cây Huệ nảy chồi rất nhanh, với số chồi cao nhất là 10,4 chồi/bụi ở giai đoạn 146 ngày sau khi trồng, trong khi mô hình sinh trưởng kém hơn chỉ đạt 7-8 chồi/bụi. Do đó, có thể nói sự tăng chồi của cây Huệ có thể biến đổi khác nhau tùy theo điều kiện chăm sóc.

Thời gian từ khi bắt đầu trồng đến khi ra hoa từ 150 ngày ở mô hình 1 (Hình 2) và 180 ngày ở mô hình 2 và 3 (Bảng 4). Thời gian bắt đầu ra hoa kéo dài từ 3-4 tuần với tỉ lệ cây ra hoa gần đạt 92-98%

Bảng 3: Tỉ lệ sống (%) của cây con sau 30 ngày thuần dưỡng tại nhà lưới

Nhân tố	Tỉ lệ sống (%)
Đối chứng (0)	80,0 ^b
NAA 0,5 mg/L	63,3 ^c
NAA 1 mg/L	63,3 ^c
Atonik 2 ml/L	100,0 ^a
Atonik 4 ml/L	96,7 ^a
F(A)	**
CV(%)	10,2

Những số có chữ theo sau giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng arcsin√x trước khi phân tích thống kê

3.3.2 Đánh giá sự sinh trưởng của cây hoa huệ ngoài đồng

Sự nảy chồi của hoa Huệ

Cây Huệ bắt đầu nảy chồi ở giai đoạn 56 ngày sau khi trồng (Hình 1). Đến giai đoạn ba tháng sau khi trồng, trung bình mỗi cây Huệ có trung bình năm chồi trên mỗi bụi.



Hình 2: Điểm trình diễn mô hình trồng hoa huệ cây mô tại xã Tân Thới, huyện Phong Điền, Tp. Cần Thơ

(196/200 và 184/200 cây). Do trồng từ cây cấy mô nên thời gian bắt đầu ra hoa tương đối chậm hơn so với cây trồng từ củ. Phát hoa có chiều dài từ 125-131 cm với số hoa/phát hoa trung bình khoảng 75 hoa/phát hoa (Bảng 4). Chiều dài phát hoa Huệ cũng là một trong những yếu tố quyết định đến giá trị kinh tế của cây hoa Huệ. Phát hoa có độ dài phần bông trên 40 cm thì được xem là loại I, có giá bán cao nhất. Số hoa/phát hoa bao gồm nụ chưa nở cũng là một trong những yếu tố quyết định vì phát hoa đạt độ dài nhưng số hoa đơn ít, xếp lựa thưa trên phát hoa vẫn không được xem là loại I.

Bảng 4: Thời gian từ khi trồng đến khi bắt đầu ra hoa, tổng số hoa/phát hoa và kích thước phát hoa Huệ của các mô hình tại xã Tân Thới, huyện Phong Điền, Tp. Cần Thơ

Chỉ tiêu	Thời gian từ khi trồng đến khi ra hoa (ngày)	Tổng số cây ra phát hoa/mô hình (200 cây)	Chiều dài phát hoa (cm)	Số hoa/phát hoa
Mô hình 1	150,5 ± 9,8	196/200	131,5 ± 5,5	74,9, ± 4,05
Mô hình 2, 3	182,4 ± 7,4	184/200	125,0 ± 5,6	74,5 ± 4,63

Tóm lại, các mô hình trồng hoa Huệ tại xã Tân Thới, huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ có năng suất và chất lượng hoa khá tốt, có hiệu quả kinh tế cao. Trong thời gian thực hiện mô hình chưa thấy sâu bệnh gây hại quan trọng, đặc biệt là bệnh “chai bông” do tuyến trùng gây hại.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng cây hoa huệ trắng đạt được số chồi 7.1 ở nghiệm thức 1 mg/l NAA + 4 mg/l BA. Cây hoa huệ trắng ra rễ tốt trên môi trường có atonik trong điều kiện ánh sáng tự nhiên (120 μmol.m⁻².s⁻¹) kích thích sự ra rễ in vitro. Trong giai đoạn thuần dưỡng, cây huệ trắng đã được nuôi cấy trong môi trường có atonik thích nghi tốt. Trong mô hình canh tác cho thấy rằng cây huệ trồng từ cây cấy mô sinh trưởng và phát triển rất tốt, bắt đầu ra hoa sau khi trồng năm tháng, cho năng suất và phát hoa có chất lượng tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Be, L.V. and P.C. Debergh, 2006. Potential low-cost micropropagation of pineapple (Ananas comosus). South African Journal of Botany. 72:191 – 194.
2. Debergh P.C And R.H. Zimmerman, 1991. Micropropagation. Technology and Applycation. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston. London. ISBN 0-7923-0818-2 pp.71-93.
3. Djanaguiraman M., M. Pandiyan and D. D. Devi, 2005. Abscission of tomato fruit follows oxidative damage and its manipulation by Atonik Spray. Asian Journal of Plant Science, 7(1):624-627.

4. Halliday, K.J., J.F. Martinez-Garcia and E. Josse, 2009. Integration of Light and Auxin Signaling. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 1(6): 1-17.
5. Hùynh thị Huế Trang, Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn, 2007. Phục hồi giống hoa huệ trắng (Polianthes tuberosa Linn) nhiễm bệnh chai bông bằng công nghệ nuôi cấy phân sinh mô chồi.
6. Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học thực vật trong lai tạo và nhân nhanh giống hoa.(Scientific Conference. Plant Biotechnology in Breeding and Rapid Propagation of Flower Species), Đà Lạt, NXB Nông nghiệp.
7. Klerk, G and E. Massoumi, 2011. The roots of rooting. In: T. Ruys, J. Ruiten and J. Timmerman (Editors). Prophyta Annual 2011. Blue Birds Publisher. Velsen-Zuid. 50 pp.
8. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
9. Talavera, C., F. Contreras, F. Espadas, G. Fuentes and J.M. Santamaria, 2005. Cultivating in vitro coconut palms (Cocos nucifera) under glasshouse conditions with natural light, improves in vitro photosynthesis nursery survival and growth. Plant Cell Tissue and Organ Cultue. 83(3):287-292.