

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trương Hoài Phong

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ
ĐẾN QUÁ TRÌNH RA HOA VÀ BƯỚC ĐÀO TẠO QUẢ
CỦA CÂY CHANH DÂY TÍM (*Passiflora edulis Sims f. edulis*)
NUÔI CÂY *IN VITRO***

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Trương Hoài Phong

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ
ĐẾN QUÁ TRÌNH RA HOA VÀ BƯỚC ĐẦU TẠO QUẢ
CỦA CÂY CHANH DÂY TÍM (*Passiflora edulis Sims f. edulis*)
NUÔI CÂY *IN VITRO*

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Mã số: 9.42.01.12

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Thầy hướng dẫn 1

Thầy hướng dẫn 2

GS.TS. Dương Tấn Nhựt

TS. Nguyễn Bá Nam

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) nuôi cấy *in vitro*” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của GS.TS. Dương Tấn Nhựt và TS. Nguyễn Bá Nam. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Tất cả kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận án



Trương Hoài Phong

LỜI CẢM ƠN

Giai đoạn soạn những lời cảm ơn này có lẽ một hành trình nữa sắp đi về điểm đích. Thời gian thực hiện luận án có lẽ là thời gian để lại cho tôi rất nhiều niềm vui, sự hy vọng và cả những lo lắng. Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án, tôi đã nhận được rất nhiều sự quan tâm, giúp đỡ rất tận tình từ Quý Thầy Cô, gia đình và bạn bè.

Đầu tiên, tôi xin biết ơn sâu sắc nhất đến Thầy GS.TS. Dương Tấn Nhật. Thầy đã tận tình hướng dẫn, định hướng và tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi có thể hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn tới Thầy TS. Nguyễn Bá Nam. Thầy luôn tận tình giúp đỡ và cho những góp ý thiết thực giúp tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới các Quý Thầy Cô, anh chị ở Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng đã giúp đỡ và động viên tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu. Tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn đến các Quý Thầy Cô của Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang đã tạo điều kiện để tôi có thể hoàn thành chương trình học một cách thuận lợi.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo và cán bộ nhân viên của Học viện Khoa học và Công nghệ, cùng với Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã tạo điều kiện thuận lợi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến nguồn hỗ trợ từ các đề tài VAST - [NCXS01.03/22-24], NAFOSTED - [106.01-2020.10] và Quỹ VINIF - [VINIF.2022.TS094] trong quá trình thực hiện đề tài.

Cuối cùng, luận án này sẽ không được hoàn thành nếu không có sự cảm thông của gia đình, người thân và bạn bè đã luôn sát cánh động viên trong từng bước chân theo đuổi con đường khoa học.

Xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất và hẹn gặp lại ở một trang hành trình mới!

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận án



Trương Hoài Phong

MỤC LỤC

| | |
|---|-----|
| LỜI CAM ĐOAN | i |
| LỜI CẢM ƠN | ii |
| MỤC LỤC..... | iii |
| DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ VIẾT TẮT..... | vii |
| DANH MỤC BẢNG..... | ix |
| DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ | x |
| MỞ ĐẦU..... | 1 |
| Mục tiêu nghiên cứu | 2 |
| Ý nghĩa khoa học | 2 |
| Ý nghĩa thực tiễn..... | 2 |
| Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài | 3 |
| Đối tượng nghiên cứu..... | 3 |
| Phạm vi nghiên cứu..... | 3 |
| Những đóng góp mới của luận án..... | 3 |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU..... | 4 |
| 1.1. Sự ra hoa và ra hoa <i>in vitro</i> ở thực vật..... | 4 |
| 1.1.1. Ý nghĩa của sự ra hoa và ra hoa <i>in vitro</i> ở thực vật | 4 |
| 1.1.2. Các giai đoạn chính của sự ra hoa ở thực vật..... | 6 |
| 1.1.3. Một số con đường ra hoa chủ yếu ở thực vật | 6 |
| 1.1.3.1. Con đường ra hoa dựa trên ánh sáng | 7 |
| 1.1.3.2. Con đường thò hàn / xuân hóa | 8 |
| 1.1.3.3. Con đường ra hoa tự chủ..... | 8 |
| 1.1.3.4. Con đường dựa trên hoạt động của Gibberellin..... | 9 |
| 1.1.4. Một số mô hình phát triển hoa ở thực vật | 9 |
| 1.2. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự ra hoa ở thực vật..... | 11 |
| 1.2.1. Độ tuổi..... | 11 |
| 1.2.2. Nhiệt độ | 12 |
| 1.2.3. Ánh sáng..... | 12 |
| 1.2.4. Chất điều hoà sinh trưởng thực vật | 13 |
| 1.2.5. Một số chất khác ảnh hưởng đến sự ra hoa ở thực vật..... | 15 |

| | |
|---|----|
| 1.2.5.1. Polyamine..... | 15 |
| 1.2.5.2. Bạc và Coban | 16 |
| 1.3. Một số nghiên cứu ra hoa và tạo quả <i>in vitro</i> | 18 |
| 1.4. Khái quát về cây chanh dây tím..... | 23 |
| 1.4.1. Giới thiệu..... | 23 |
| 1.4.1.1. Phân loại..... | 23 |
| 1.4.1.2. Đặc điểm thực vật học | 24 |
| 1.4.1.3. Thích nghi và phân bố..... | 24 |
| 1.4.1.4. Giá trị của cây chanh dây..... | 25 |
| 1.4.2. Một số nghiên cứu trên cây chanh dây tím trong điều kiện <i>in vitro</i> | 25 |
| 1.4.2.1. Nghiên cứu tái sinh chồi dựa trên kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào | 27 |
| 1.4.2.2. Nghiên cứu phát sinh phôi soma..... | 29 |
| 1.4.3. Sự ra hoa và tạo quả trên cây chanh dây tím..... | 31 |
| 1.4.3.1. Đặc điểm cấu trúc hoa..... | 31 |
| 1.4.3.2. Hiện tượng tự bất hợp | 31 |
| 1.4.3.3. Sự ra hoa và tạo quả..... | 33 |
| CHƯƠNG 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP | 35 |
| NGHIÊN CỨU | 35 |
| 2.1. Nội dung nghiên cứu..... | 35 |
| 2.2. Vật liệu nghiên cứu..... | 36 |
| 2.2.1. Vật liệu thực vật | 36 |
| 2.2.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất | 37 |
| 2.2.3. Môi trường nuôi cấy..... | 38 |
| 2.3. Phương pháp nghiên cứu | 39 |
| 2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm..... | 39 |
| 2.3.1.1. Nội dung 1: Nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây chanh dây tím | 39 |
| 2.3.1.2. Nội dung 2: Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy <i>in vitro</i> | 42 |
| 2.3.2. Một số phương pháp và kỹ thuật dùng trong nghiên cứu | 46 |
| 2.3.2.1. Thu nhận và đánh giá một số chỉ tiêu theo dõi trong đề tài..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2.2. Định lượng hormone nội sinh | 46 |
| 2.3.2.3. Định lượng Ethylene | 47 |
| 2.3.2.4. Quan sát hình thái giải phẫu..... | 47 |
| 2.3.2.5. Phân tích và xử lý số liệu | 47 |
| 2.3.3. Điều kiện nuôi cấy..... | 48 |
| 2.3.4. Địa điểm và thời gian thực hiện luận án | 48 |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... | 49 |
| 3.1. Nội dung 1: Nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây chanh dây tím..... | 49 |
| 3.1.1. Nghiên cứu tái sinh chồi từ các mẫu cây TCL lóng thân <i>ex vitro</i> | 49 |
| 3.1.1.1. Ảnh hưởng của vị trí lóng thân đến sự cảm ứng chồi từ mẫu cây tTCL | 49 |
| 3.1.1.2. Sự cảm ứng chồi của mẫu cây tTCL và ITCL từ lóng thân..... | 51 |
| 3.1.1.3. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi từ mẫu cây ITCL và oTCL lóng thân..... | 52 |
| 3.1.2. Nghiên cứu phát sinh phôi soma từ mẫu cây lá <i>ex vitro</i> | 55 |
| 3.1.2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và NAA đến sự phát sinh SE | 55 |
| 3.1.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs đối với quá trình phát sinh SE gián tiếp từ mẫu lá..... | 57 |
| 3.1.3. Ảnh hưởng của AgNPs đến quá trình nhân nhanh chồi..... | 62 |
| 3.2. Nội dung 2: Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy <i>in vitro</i> | 64 |
| 3.2.1. Ảnh hưởng của một số PGR ngoại sinh đến quá trình ra hoa <i>in vitro</i> | 64 |
| 3.2.1.1. Ảnh hưởng của GA ₃ đến sự sinh trưởng và ra hoa <i>in vitro</i> | 64 |
| 3.2.1.2. Ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng và ra hoa <i>in vitro</i> | 66 |
| 3.2.2. Ảnh hưởng của Bạc và Coban đến quá trình ra hoa và tạo quả <i>in vitro</i> .. | 69 |
| 3.2.2.1. Ảnh hưởng của AgNO ₃ đến sự sinh trưởng và ra hoa <i>in vitro</i> | 69 |
| 3.2.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa <i>in vitro</i> | 71 |
| 3.2.2.3. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tạo quả <i>in vitro</i> | 81 |
| 3.2.2.4. Ảnh hưởng của CoNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa <i>in vitro</i> | 86 |
| 3.2.3. Ảnh hưởng của Spermidine đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả <i>in vitro</i> | 90 |
| 3.2.3.1. Ảnh hưởng của Spd đơn lẻ đến sự sinh trưởng và ra hoa <i>in vitro</i> | 90 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.3.1. Ảnh hưởng của Spd kết hợp với AgNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa và tạo quả <i>in vitro</i> | 92 |
| KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ..... | 101 |
| DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN..... | 103 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO..... | 104 |
| PHỤ LỤC..... | 123 |

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ VIẾT TẮT

| Chữ viết tắt | Tiếng Anh | Tiếng Việt |
|---------------------|--|-----------------------------------|
| 2,4-D | 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid | Axit 2,4-Dichlorophenoxyacetic |
| ABA | Abscisic acid | Axit abscisic |
| AgNPs | Silver nanoparticles | Các hạt nano bạc |
| BA | 6-Benzyladenine | |
| CoNPs | Cobalt nanoparticles | Các hạt nano coban |
| ETH | Ethylene | |
| ETR | Ethylene receptor | Thụ thể ethylene |
| GA ₃ | Gibberellic acid A ₃ | Axit gibberellic A ₃ |
| GAs | Gibberellins | Nhóm gibberellin |
| HPLC | High performance liquid chromatography | Sắc ký lỏng hiệu năng cao |
| IAA | Indole-3-acetic acid | Axit indole-3-acetic |
| IBA | Indole-3-butyric acid | Axit indole-3-butyric |
| ITCL | Longitudinal thin cell layer | Lớp mỏng tế bào cắt dọc |
| MS | Murashige and Skoog (1962) | Murashige và Skoog (1962) |
| mT | <i>meta</i> -Topoline | |
| NAA | 1-Naphthaleneacetic acid | Axit 1-Naphthaleneacetic |
| NT | | Nghiệm thức |
| oTCL | Outer longitudinal thin cell layer | Lớp mỏng tế bào bên ngoài cắt dọc |
| PA | Polyamine | |

| | | |
|------|---------------------------------|------------------------------------|
| PGR | Plant growth regulator | Chất điều hoà sinh trưởng thực vật |
| Put | Putrescine | |
| SAM | Shoot apical meristem | Mô phân sinh đỉnh chồi |
| SE | Somatic embryo | Phôi soma |
| SPAD | Soil Plant Analysis Development | Chỉ số diệp lục tố |
| Spd | Spermidine | |
| Spm | Spermine | |
| TCL | Thin cell layer | Lớp mỏng tế bào |
| TDZ | Thidiazuron | |
| tTCL | Transverse thin cell layer | Lớp mỏng tế bào cắt ngang |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|--|----|
| Bảng 1.1. Một số PGR ảnh hưởng đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở một số loài thực vật..... | 19 |
| Bảng 1.2. Sự tạo quả và hạt ở một số loài thực vật trong điều kiện nuôi cấy <i>in vitro</i> | 21 |
| Bảng 1.3. Một số nghiên cứu trên cây chanh dây tím trong điều kiện <i>in vitro</i> | 25 |
| Bảng 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi từ mẫu cây ITCL và oTCL sau 60 ngày nuôi cấy. | 53 |
| Bảng 3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D hoặc NAA lên sự phát sinh SE từ mẫu cây lá sau 60 ngày nuôi cấy. | 56 |
| Bảng 3.3 Ảnh hưởng của GA ₃ đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây sau 60 ngày nuôi cấy. | 64 |
| Bảng 3.4 Ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím sau 60 ngày nuôi cấy. | 66 |
| Bảng 3.5 Ảnh hưởng của AgNO ₃ đến sự sinh trưởng của chồi sau 60 ngày nuôi cấy. | 69 |
| Bảng 3.6 Ảnh hưởng của AgNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa <i>in vitro</i> của chồi sau 60 ngày nuôi cấy. | 71 |
| Bảng 3.7. Ảnh hưởng của AgNPs đến quá trình tạo quả <i>in vitro</i> sau 90 ngày nuôi cấy. | 82 |
| Bảng 3.8. Ảnh hưởng của CoNPs trong môi trường MS đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím sau 60 ngày nuôi cấy. | 86 |
| Bảng 3.9. Ảnh hưởng của CoNPs trong môi trường MS không bổ sung CoCl ₂ đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím sau 60 ngày nuôi cấy. | 88 |
| Bảng 3.10 Ảnh hưởng của Spd đến sự sinh trưởng của chồi sau 90 ngày nuôi cấy.. | 90 |
| Bảng 3.11. Ảnh hưởng của Spd trong môi trường bổ sung AgNPs đến sự ra hoa <i>in</i> <i>vitro</i> sau 90 ngày nuôi cấy. | 92 |

DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH, ĐỒ THỊ

| | |
|--|----|
| Hình 1.1. Mô hình ABC về sự phát triển của hoa | 10 |
| Hình 1.2. Cấu trúc hoa và “mô hình bộ tứ” của đặc điểm cơ quan hoa ở <i>Arabidopsis</i> | 11 |
| Hình 1.3. Sơ đồ thể hiện con đường sinh tổng hợp ETH từ methionine và vị trí tác động của chất ức chế (coban và bạc) | 16 |
| Hình 1.4. Sự phân bố của chi <i>Passiflora</i> | 24 |
| Hình 1.5. Một số ưu điểm của kỹ thuật nuôi cấy TCL..... | 28 |
| Hình 1.6. Đặc điểm đốt thân chứa chồi hoa và cấu trúc hoa của cây chanh dây tím. | 31 |
| Hình 2.1. Sơ đồ thể hiện khái quát các nội dung nghiên cứu..... | 36 |
| Hình 2.2. Các nguồn mẫu cây ban đầu của nghiên cứu. | 37 |
| Hình 2.3. Thiết lập các mẫu cây tTCL và ITCL từ lóng thân <i>ex vitro</i> | 39 |
| Hình 2.4. Sơ đồ thiết lập mẫu cây ITCL và oTCL từ lóng thân <i>ex vitro</i> | 41 |
| Hình 2.5. Sơ đồ mô tả các giai đoạn bố trí thí nghiệm nghiên cứu sự ra hoa <i>in vitro</i> của cây chanh dây tím. | 43 |
| Hình 3.1. Tỷ lệ cảm ứng chồi của mẫu cây tTCL từ các lóng thân <i>ex vitro</i> tại vị trí từ 1 đến 5 tính từ ngọn sau 60 ngày nuôi cấy..... | 49 |
| Hình 3.2. Sự cảm ứng chồi của mẫu cây tTCL từ các lóng thân <i>ex vitro</i> | 50 |
| Hình 3.3. Sự cảm ứng chồi của các mẫu cây TCL từ lóng thân <i>ex vitro</i> sau 60 ngày nuôi cấy | 51 |
| Hình 3.4. So sánh hiệu quả tái sinh chồi giữa mẫu cây ITCL và oTCL từ các lóng thân ở vị trí thứ 3 sau 60 ngày nuôi cấy | 52 |
| Hình 3.5. Chồi tái sinh từ mẫu cây ITCL và oTCL trong môi trường bổ sung AgNPs | 54 |
| Hình 3.6. Cảm ứng SE từ mẫu cây lá sau 60 ngày nuôi cấy | 56 |
| Hình 3.7. Ảnh hưởng của AgNPs đối với sự phát sinh SE gián tiếp từ mẫu lá. | 58 |
| Hình 3.8. Sự phát sinh SE gián tiếp từ mẫu cây lá trên môi trường bổ sung 2,0 mg/L AgNPs sau 75 ngày nuôi cấy | 59 |

| | |
|---|----|
| Hình 3.9. Sự hình thành cây con từ SE có nguồn gốc từ mẫu cây lá trong môi trường bổ sung AgNPs sau 120 ngày nuôi cấy..... | 59 |
| Hình 3.10. Ảnh hưởng của AgNPs đến hiệu quả nhân chồi trong môi trường bổ sung cố định 1,0 mg/L mT sau 60 ngày nuôi cấy..... | 62 |
| Hình 3.11. Chồi chanh dây tím nuôi cấy trên các môi trường bổ sung GA ₃ ở các nồng độ khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy..... | 65 |
| Hình 3.12. Chồi chanh dây nuôi cấy trên các môi trường bổ sung ABA ở các nồng độ khác nhau | 67 |
| Hình 3.13. Chồi chanh dây phát triển trong môi trường bổ sung AgNO ₃ ở các nồng độ khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy..... | 70 |
| Hình 3.14. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự ra hoa <i>in vitro</i> , sự thay đổi hormone nội sinh của chồi và sự tích lũy ETH sau 60 ngày nuôi cấy. | 72 |
| Hình 3.15. Sự hình thành và phát triển của chồi hoa <i>in vitro</i> trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs..... | 75 |
| Hình 3.16. Sự chuyển đổi từ chồi sinh dưỡng sang chồi sinh sản sau 40 - 45 ngày nuôi cấy | 76 |
| Hình 3.17. Giải phẫu chồi hoa từ chồi <i>in vitro</i> nuôi cấy trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs sau 45 ngày nuôi cấy..... | 77 |
| Hình 3.18. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự nở hoa <i>in vitro</i> sau 70 ngày nuôi cấy.... | 78 |
| Hình 3.19. Đặc điểm của nụ hoa ngoài tự nhiên và nụ hoa <i>in vitro</i> | 79 |
| Hình 3.20. Một số đặc điểm của hoa chanh dây ngoài tự nhiên từ cây 2 năm tuổi và hoa từ chồi <i>in vitro</i> | 80 |
| Hình 3.21. Sự nở hoa và tạo quả <i>in vitro</i> trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs | 83 |
| Hình 3.22. Mặt bao phấn hướng lên ở hoa <i>in vitro</i> (trái) và hướng xuống ở hoa ngoài tự nhiên (phải) | 84 |
| Hình 3.23. Ảnh hưởng của CoNPs đến sự sinh trưởng của chồi sau 60 ngày nuôi cấy. | 87 |
| Hình 3.24. Ảnh hưởng của CoNPs trong môi trường không bổ sung CoCl ₂ đến sự sinh trưởng của chồi sau 60 ngày nuôi cấy | 88 |

| | |
|--|----|
| Hình 3.25. Hàm lượng GAs, ABA của chồi và hàm lượng ETH tích lũy trong bình nuôi cấy ở nghiệm thức bổ sung 0,3 mg/L CoNPs và đối chứng. | 89 |
| Hình 3.26. Chồi <i>in vitro</i> trong môi trường bổ sung các nồng độ Spd khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy | 91 |
| Hình 3.27. Sự sinh trưởng và ra hoa của chồi trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs kết hợp với các nồng độ Spd khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy | 93 |
| Hình 3.28. Một số đặc điểm của ngọn chồi và đốt thân của chồi chanh dây trong môi trường bổ sung 0,05 mM Spd và 7,0 mg/L AgNPs sau 60 ngày nuôi cấy..... | 93 |
| Hình 3.29. Hình ảnh giải phẫu của sơ khởi hoa cảm ứng từ chồi <i>in vitro</i> sau 65 ngày nuôi cấy. | 94 |
| Hình 3.30. Sự chuyển đổi từ giai đoạn sinh trưởng ra giai đoạn ra hoa của chồi <i>in vitro</i> | 95 |
| Hình 3.31. Sự hình thành chồi hoa của cây chanh dây tím ở điều kiện tự nhiên và <i>in vitro</i> | 96 |
| Hình 3.32. So sánh sự ra hoa và tạo quả <i>in vitro</i> của chồi chanh dây tím trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs riêng lẻ và kết hợp với 0,05 mM Spd..... | 97 |
| Hình 3.33. Sự ra hoa và tạo quả <i>in vitro</i> từ chồi nuôi cấy trong môi trường bổ sung AgNPs riêng lẻ và kết hợp với Spd..... | 98 |

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Vòng đời của thực vật có hoa bắt đầu từ sự nảy mầm của hạt, sau đó là sinh trưởng sinh dưỡng, ra hoa và tạo quả, và cuối cùng kết thúc bằng sự hình thành hạt. Các kiến thức về sự ra hoa và tạo quả cung cấp một nền tảng lý thuyết hữu ích để phát triển các phương pháp thích hợp trong quá trình nghiên cứu sinh lý, tăng cường năng suất và quyết định các chiến lược chọn tạo giống cây trồng [1]. Nắm bắt được các cơ chế và yếu tố ảnh hưởng đến sự ra hoa góp phần vào việc tối ưu hóa thời gian ra hoa, số lượng hoa, quá trình thụ phấn, tạo quả và hạt ở thực vật [2, 3]. Ngoài ra, việc kiểm soát chính xác thời điểm ra hoa có thể cải thiện đáng kể hiệu quả của các phương pháp lai tạo, đặc biệt là phương pháp lai giữa các loài xa [4].

Tuy nhiên, sự ra hoa ở điều kiện tự nhiên của thực vật thường phụ thuộc theo mùa và quá trình này bị ảnh hưởng đáng kể bởi nhiều yếu tố môi trường khác nhau, điều này gây nhiều khó khăn cho các công tác nghiên cứu và lai tạo [5]. Trong hoàn cảnh đó, các phương pháp tiếp cận công nghệ sinh học có thể góp phần giải quyết những hạn chế này. Hệ thống ra hoa *in vitro* được coi là một công cụ hiệu quả để nghiên cứu cảm ứng ra hoa và sự phát triển của các cơ quan hoa. Kỹ thuật này tạo điều kiện thuận lợi và đồng nhất để tìm hiểu về sinh lý ra hoa bằng cách kiểm soát tác động của các yếu tố như nhiệt độ, ánh sáng, các chất điều hoà sinh trưởng thực vật (PGR) và khoáng chất [1, 6]. Ngoài ra, kỹ thuật ra hoa *in vitro* còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình lai tạo ở cây trồng, đặc biệt là trong kỹ thuật lai sử dụng phấn hoa từ các giống cây trồng quý hiếm. Nghiên cứu ra hoa *in vitro* mang lại tiềm năng lớn trong các chương trình nhân giống cải tiến cây trồng dựa trên ưu điểm là rút ngắn và đồng bộ thời gian ra hoa [5]. Nếu quá trình ra hoa *in vitro* được mô tả tốt, nó có thể tạo ra một hệ thống mô hình để nghiên cứu các cơ chế ra hoa [7]. Hiện tại, sự ra hoa *in vitro* chủ yếu được quan sát và mô tả trong quá trình vi nhân giống một số loài cây cảnh và cây rau [6-13].

Mặt khác, *Passiflora* là chi lớn nhất trong họ Passifloraceae; trong đó, chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) là một trong những loài mang lại giá trị đáng kể cả về mặt thương mại và dược liệu [14]. Ở thời điểm hiện tại, dựa trên những báo cáo đã được xuất bản, chưa có tài liệu nào ghi nhận về sự ra hoa *in vitro* của cây

chanh dây tím. Hơn nữa, sự ra hoa *in vitro* không phải là hiện tượng phổ biến ở chi *Passiflora*, chỉ có sự ra hoa ở cây *P. suberosa* L. được ghi nhận trong điều kiện *in vitro* [15]. Do đó, việc nghiên cứu sự ra hoa *in vitro* mang lại ý nghĩa quan trọng trong việc tạo nền tảng để tìm hiểu sâu hơn sự ra hoa trên chi này. Vì vậy, nghiên cứu điều khiển ra hoa *in vitro* trên cây chanh dây tím là một hướng nghiên cứu cần thiết và có tính ứng dụng cao trên nhiều phương diện. Bên cạnh đó, chanh dây tím là loài có hoa lưỡng tính, dựa trên cơ sở đặc tính tự thụ của hoa thì việc nghiên cứu vấn đề tạo quả *in vitro* có tính khả thi cao.

Xuất phát từ những vấn đề trên, đề tài “**Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) nuôi cấy *in vitro***” mở ra một hướng nghiên cứu mới và tiềm năng trên đối tượng cây trồng này.

Mục tiêu nghiên cứu

Xác định được tác động của một số yếu tố bao gồm PGR (axit gibberellic A₃ - GA₃, axit abscisic - ABA), muối và nano kim loại (bạc nitrate - AgNO₃, các hạt nano bạc - AgNPs, các hạt nano coban - CoNPs), và polyamine (spermidine - Spd) đến sự sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả *in vitro* trên cây chanh dây tím.

Ý nghĩa khoa học

Kết quả của đề tài cung cấp các dẫn liệu khoa học về ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả trên cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

Ý nghĩa thực tiễn

Đề tài đã thiết lập một hệ thống ra hoa và tạo quả *in vitro* có thể tham khảo để nghiên cứu trên cây chanh dây tím. Tạo tiền đề cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng hệ thống ra hoa *in vitro* trong nghiên cứu sinh lý và công tác chọn tạo giống trên đối tượng cây trồng này.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đối tượng nghiên cứu

Đề tài tiến hành nghiên cứu sự sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) dưới ảnh hưởng của một số yếu tố bổ sung trong môi trường nuôi cấy, bao gồm GA₃, ABA, AgNO₃, AgNPs, CoNPs và Spd trong điều kiện *in vitro*.

Phạm vi nghiên cứu

Phạm vi nội dung: Các thí nghiệm tập trung chủ yếu vào khảo sát sự sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả dưới ảnh hưởng của một số yếu tố bổ sung trong môi trường nuôi cấy đối với các chồi chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*.

Phạm vi không gian và thời gian: Nghiên cứu được tiến hành ở quy mô phòng thí nghiệm, tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (VAST) từ năm 2020 đến năm 2023.

Những đóng góp mới của luận án

Nghiên cứu đã góp phần cải thiện đáng kể hiệu quả tái sinh chồi và phát sinh SE của cây chanh dây tím. Kết quả đề tài cung cấp một quy trình tái sinh có thể tham khảo để ứng dụng trong quá trình vi nhân giống loài cây trồng này.

Các kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin đáng tin cậy về tác động của các yếu tố như PGR, các hạt nano kim loại và PA đến sự sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả từ chồi chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*.

Các kết quả cung cấp thông tin về một số đặc điểm khác biệt về thời gian và một số đặc điểm ra hoa và tạo quả giữa điều kiện *in vitro* và ngoài tự nhiên. Kết quả đề tài cung cấp một quy trình có thể tham khảo để ứng dụng tạo hoa và quả *in vitro* dựa trên tác động AgNPs, từ đó tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo (Quy trình khái quát thể hiện ở Phụ lục 1.1 và 1.3).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Sự ra hoa và ra hoa *in vitro* ở thực vật

1.1.1. Ý nghĩa của sự ra hoa và ra hoa *in vitro* ở thực vật

Quá trình chuyển đổi sự phát triển chủ yếu ở thực vật có hoa là chuyển từ phát triển sinh dưỡng sang phát triển sinh sản. Xác định chính xác thời điểm của quá trình chuyển đổi này là điều cần thiết để sự sinh sản thành công do yêu cầu về sự ra hoa đồng bộ và sự phụ thuộc vào các điều kiện thuận lợi để tạo những hạt giống tối ưu. Nhiều loài thực vật phản ứng với các tín hiệu môi trường để kiểm soát thời gian ra hoa, đặc biệt là những loài ra hoa theo mùa. Ví dụ, sự ra hoa của cây *Arabidopsis* được thúc đẩy nhanh chóng vào đầu của mùa xuân và mùa hè khi đã trải qua thời gian mùa đông [16]. Trong khi đó, một số giống lúa được kích thích ra hoa trong điều kiện ngày ngắn [17]. Sự ra hoa cũng có thể được thúc đẩy khi thực vật phản ứng với các stress như mật độ cây dày đặc (chất lượng ánh sáng thay đổi), sự thiếu hụt chất dinh dưỡng, sự thay đổi nhiệt độ [18]. Nhiều loài thực vật sau giai đoạn cây non không thể ra hoa do không đảm bảo tích lũy đủ chất dự trữ để duy trì sự phát triển của hoa, tạo quả và hình thành hạt. Ở thực vật, hầu hết sự phát triển xảy ra ở dạng mô phân sinh thông qua việc sản xuất liên tục các tế bào gốc ở mô phân sinh đỉnh chồi và rễ. Sơ khởi lá và hoa xuất hiện từ hai bên sườn của mô phân sinh đỉnh chồi và chuyển sang phản ứng đối với nhiều tín hiệu nội sinh và môi trường để thực hiện việc điều hòa các gen nhận dạng mô phân sinh hoa [18]. Các giai đoạn của quá trình ra hoa, các yêu cầu nhất định như hormone thực vật, nguồn dinh dưỡng, v.v đối với sự cảm ứng và phát triển hoa ở từng loài thực vật là khác nhau. Do đó, khó có thể để trình bày một cách tổng quát hoá quá trình ra hoa một cách chính xác ở thực vật.

Đa phần thực vật ra hoa khi các yếu tố di truyền đáp ứng với điều kiện môi trường thích hợp. Các điều kiện này thường có thể được biến đổi để cây có thể tiến tới giai đoạn sinh sản sớm. Do đó, sự ra hoa *in vitro* tạo điều kiện thuận lợi để nghiên cứu về sinh lý học của sự ra hoa cũng như nghiên cứu các mức độ và sự tương tác của các yếu tố ảnh hưởng tại các giai đoạn của sự ra hoa [1]. Kỹ thuật ra hoa *in vitro* có ý nghĩa quan trọng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng, đặc biệt là trong nghiên cứu sinh học phát triển thực vật, chọn giống và lai xa. Việc sử dụng kỹ thuật

này không chỉ mở ra những hướng đi mới trong nghiên cứu khoa học cơ bản mà còn mang lại những lợi ích thực tiễn to lớn trong nông nghiệp và công nghệ sinh học.

Trong nghiên cứu sinh học phát triển thực vật, ra hoa *in vitro* tạo điều kiện thuận lợi để quan sát quá trình phát triển hoa trong điều kiện kiểm soát chặt chẽ. Việc kiểm soát môi trường nuôi cấy *in vitro* giúp tách biệt và phân tích tác động của các yếu tố nội sinh (như hormone) và ngoại sinh (như ánh sáng, nhiệt độ) lên sự ra hoa. Kỹ thuật này giúp hiểu rõ hơn về các cơ chế điều hòa sự ra hoa, từ đó tạo cơ sở cho việc điều chỉnh và tối ưu hóa quá trình này trong sản xuất nông nghiệp.

Trong lĩnh vực chọn giống, kỹ thuật này giúp rút ngắn thời gian cần thiết để cây trồng ra hoa và tạo quả, từ đó tăng tốc quá trình chọn lọc và phát triển các giống cây mới. Chẳng hạn, ra hoa và tạo hạt *in vitro* đã được áp dụng thành công trong việc đánh giá các giống lúa, giúp nhanh chóng phát hiện và nhân giống những cá thể có đặc tính mong muốn như năng suất cao, có khả năng chống chịu hạn, mặn [19]. Ra hoa và tạo quả *in vitro* cũng góp phần rút ngắn quá trình nhân giống và đánh giá đặc tính hoa ở một số loài lan. Quá trình nhân giống ở lan thông thường là một quá trình kéo dài, có thể kéo dài 3 - 5 năm. Nhưng khi sử dụng nguồn hạt lan, đặc biệt là hạt *in vitro* kết hợp với các kỹ thuật công nghệ sinh học có thể rút ngắn đáng kể quá trình này [20].

Bên cạnh đó, ra hoa và tạo quả *in vitro* là công cụ hỗ trợ đắc lực trong lai tạo và chọn lọc giống cây trồng, đặc biệt là sử dụng phân hoa từ các loài thực vật hiếm, và có thể hướng tới khả năng tái tổ hợp vật liệu di truyền thông qua thụ tinh *in vitro* ở các dòng không lai tạp [2]. Nhiều loài cây trồng gặp khó khăn trong việc ra hoa tự nhiên do điều kiện môi trường không phù hợp hoặc sự khác biệt sinh học giữa các loài. Kỹ thuật *in vitro* không chỉ giúp các loài này ra hoa mà còn tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thụ phấn và tạo quả. Ngoài ra, kỹ thuật này còn giúp bảo tồn và phục hồi các giống cây trồng quý hiếm hoặc có nguy cơ tuyệt chủng, bằng cách tạo điều kiện cho chúng sinh sản trong môi trường kiểm soát.

Nhìn chung, sự ra hoa *in vitro* không chỉ là một công cụ hữu ích trong nghiên cứu cơ bản về sinh học phát triển thực vật, mà còn có những ứng dụng rộng rãi và quan trọng trong nông nghiệp và công nghệ sinh học thực vật. Kỹ thuật này mở ra

những triển vọng mới cho việc cải thiện và phát triển các giống cây trồng, đồng thời góp phần bảo vệ và duy trì đa dạng sinh học.

1.1.2. Các giai đoạn chính của sự ra hoa ở thực vật

Mô phân sinh đỉnh chồi (SAM) là một cấu trúc khá phẳng, hình đĩa, thường khó quan sát và nó liên tục tạo ra các sơ khởi lá. Trong quá trình phát triển, đỉnh chồi tăng kích thước và phình to lên theo dạng hình vòm. Ở nhiều loài thực vật, đặc điểm hình thái này thường được quan sát đi kèm với sự gia tăng số lần nguyên phân ở dưới vùng trung tâm và phía trên sườn bên vùng mô phân sinh, và tăng dần đến vùng trung tâm để vùng đỉnh có hình dạng của một nhân nhu mô, được bao phủ bởi các tế bào có khả năng phân bào nhanh. Sơ khởi hoa được tạo thành ở lớp ngoài của vùng tế bào của SAM.

Sự ra hoa ở thực vật có thể chia thành 3 giai đoạn chính [21]:

Giai đoạn cảm ứng hình thành hoa: Khi thực vật có hoa đạt đến độ tuổi nhất định, các tín hiệu môi trường có thể kích hoạt quá trình chuyển đổi từ phát triển sinh dưỡng sang sinh sản. SAM, bao gồm một nhóm nhỏ các tế bào ngừng sản xuất sơ khởi lá và cam kết hình thành mô phân sinh hoa.

Giai đoạn hình thành mầm hoa: Liên quan đến sự biến đổi mô phân sinh ngọn thành mô phân sinh hoa dẫn tới hình thành sơ khởi hoa. Mô phân sinh hoa hình thành ở phía ngoài của vùng mô phân sinh đỉnh, vùng đã cam kết hình thành mô phân sinh hoa.

Giai đoạn hình thành và phát triển cơ quan hoa: Khi quá trình chuyển sang mô phân sinh hoa đã diễn ra, các cơ quan của hoa phát sinh tại các vị trí xác định từ bên trong các mô phân sinh này dưới sự điều khiển của các nhóm gen khác nhau. Nụ hoa sau khi tượng hoa có thể tiếp tục tăng trưởng và nở hoa, hoặc vào trạng thái ngủ.

1.1.3. Một số con đường ra hoa chủ yếu ở thực vật

Trong nhiều thập kỷ, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để làm sáng tỏ các cơ chế phân tử cơ bản của quá trình chuyển đổi hoa ở các cây mô hình, cũng như ở các cây trồng khác. Mặc dù mạng lưới điều hòa của các gen tích hợp hoa dường như khá khác biệt giữa các loài thực vật, tuy nhiên, chúng tập trung chủ yếu ở bốn con đường ra hoa chính được bảo tồn, bao gồm con đường ra hoa dựa trên ánh sáng, con

đường thọ hàn (xuân hóa), con đường tự chủ và con đường gibberellin. Trong đó, những hiểu biết khá toàn diện về các cơ chế phân tử cơ bản của quá trình chuyển đổi hoa trong cây mô hình *Arabidopsis thaliana* đã làm sáng tỏ các cơ chế phân tử kiểm soát sự chuyển đổi hoa ở các cây trồng khác. Những hiểu biết hiện tại về các con đường ra hoa chủ yếu tập trung vào việc tìm hiểu con đường ra hoa ở *Arabidopsis* cũng như ở một số loài cây trồng, bao gồm cả những cây thuộc chi *Brassica* [22].

1.1.3.1. Con đường ra hoa dựa trên ánh sáng

Ở các vĩ độ khác nhau, độ dài ngày thay đổi là một đặc điểm cơ bản của quá trình diễn biến theo mùa. Sự tăng tốc của quá trình chuyển đổi hoa của nhiều loài thực vật chịu ảnh hưởng bởi các điều kiện quang kỳ dài ngắn khác nhau [23]. Quang kỳ rất quan trọng vì nó giúp thực vật xác định thời điểm tốt nhất để ra hoa, đảm bảo sự sinh sản thành công trong các điều kiện môi trường thay đổi theo mùa. Ở *Arabidopsis*, ánh sáng được cảm nhận bởi các tế bào cảm thụ ánh sáng (Phytochrome A và E) và các flavoprotein nhạy cảm với ánh sáng xanh (Cryptochrome 1 và 2). Mối liên hệ giữa độ dài ngày và thời gian nở hoa là protein CONSTANS (CO). Nhất quán với điều này, sự biểu hiện của *FLOWERING LOCUS T (FT)*, một mục tiêu tức thời của CO, tương quan với những thay đổi trong sự biểu hiện CO trong các thể khác nhau. Trong quang kỳ dài, mức độ CO dồi dào ở thời điểm cuối và đầu của chu kỳ quang kỳ, nhưng trong quang kỳ ngắn, mức độ CO cao nhất xảy ra trong bóng tối. Nếu quá trình chuyển dịch, hoạt động hoặc độ ổn định của CO được kiểm soát bằng ánh sáng, điều này có thể cung cấp cơ chế mà hoạt động của CO chỉ có hiệu quả trong những ngày dài. Do đó, CO có thể hoạt động trong một tích hợp nhận biết về độ dài ngày và các cơ chế để thúc đẩy sự ra hoa [22].

Bên cạnh đó, sự ra hoa ở một số loài thực vật chịu tác động của chất lượng ánh sáng [22]. Chẳng hạn, ánh sáng đỏ xa (735 nm) và xanh lam (440 nm) thúc đẩy quá trình ra hoa thông qua Phytochrome A và Cryptochrome 1 và 2, tương ứng. Ánh sáng đỏ (660 nm) ức chế sự ra hoa thông qua Phytochrome B, D và E. Đối với thực vật được trồng dưới tán cây dày đặc hoặc ở mật độ trồng cao, ánh sáng phản xạ từ thảm thực vật lân cận làm giảm tỉ lệ đỏ/đỏ xa do diệp lục hấp thụ ánh sáng đỏ. Sự thay đổi về ánh sáng này đóng vai trò như một tín hiệu về sự cạnh tranh, gây ra một loạt phản

ứng ở thực vật, dẫn đến việc ra hoa nhanh hơn để hoàn thành vòng đời trong một môi trường cạnh tranh ánh sáng do mật độ cao [24].

1.1.3.2. Con đường thọ hàn / xuân hóa

Sự ra hoa của thực vật ở nhiệt độ thích hợp sau một thời gian dài ở nhiệt độ lạnh là một quá trình được gọi là thọ hàn. Yêu cầu đối với thọ hàn là một chiến lược sinh sản ở nhiều loài và ứng dụng lai tạo thành một số loại cây trồng để đảm bảo chúng chuyển đổi sinh sản trong mùa đông và ra hoa trong điều kiện thuận lợi của mùa xuân. Ở cây *Arabidopsis*, điều này có thể được lập bản đồ như một tính trạng đơn gen với các alen trội của *FRIGIDA (FRI)* đối với sự thọ hàn. *FRI* mã hóa một protein mới có chức năng thúc đẩy sự tích tụ của RNA thông tin của *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *FLC* mã hóa yếu tố phiên mã kìm hãm quá trình chuyển đổi hoa và có mối quan hệ định lượng giữa mức mRNA *FLC* và thời gian ra hoa. Bằng cách thúc đẩy sự tích tụ mRNA *FLC*, *FRI* ngăn chặn quá trình chuyển đổi hoa đến mức độ nó lấn át ảnh hưởng của các điều kiện thuận lợi khác. Sự thọ hàn dẫn đến giảm lượng mRNA *FLC* sao cho mức độ mRNA *FLC* tương quan với thời gian ra hoa. Mức độ mRNA *FLC* vẫn ở mức thấp sau khi cây được đưa trở lại nhiệt độ ấm hơn, điều này giải thích sự ổn định phân bào của quá trình thọ hàn; tuy nhiên, mức mRNA *FLC* được thiết lập lại sau quá trình giảm phân. Sự thọ hàn vẫn có thể đẩy nhanh quá trình nở hoa trên nền tảng không biểu hiện *FLC*, cho thấy rằng *FLC* không phải là mục tiêu duy nhất của quá trình này. Sự thọ hàn mang tính chuẩn bị cho cây ra hoa hơn là gọi lên việc tự ra hoa. Điều này cho thấy có một sự tách biệt rõ ràng về mặt thời gian giữa xử lý lạnh và ra hoa, điều này cho thấy rằng sự ra hoa có cơ sở biểu sinh [18].

1.1.3.3. Con đường ra hoa tự chủ

Koornneef và cộng sự (1991) đã phân lập các đặc trưng của tập hợp các đột biến *Arabidopsis* ra hoa muộn. Ông đã phân loại các đột biến thành các con đường khác nhau trên cơ sở các kiểu hình riêng biệt của chúng và phân tích biến đổi kép. Bốn trong số các thể đột biến mà ông đã xác định là *FCA*, *FY*, *FPA* và *FVE* đã ra hoa muộn hơn so với cây đại ở cả quang kỳ ngày dài và quang kỳ ngày ngắn [25]. Những locus này tạo nên con đường ra hoa tự chủ, phản ánh vai trò của chúng trong việc thúc đẩy sự ra hoa độc lập với độ dài ngày. Các thành phần của con đường này ngăn chặn sự tích tụ của các mRNA mã hóa *FLC*, một yếu tố ngăn chặn sự ra hoa. Tác

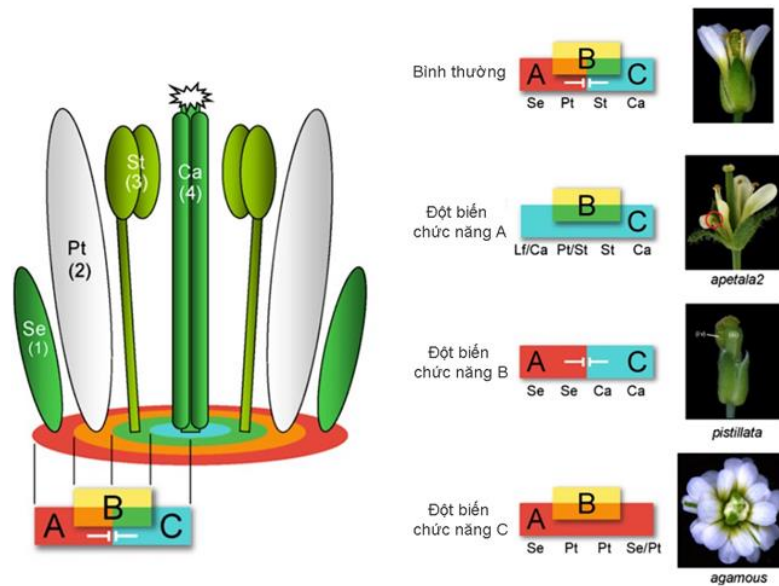
động này của *FLC* phụ thuộc vào hàm lượng, và do đó *FLC* hoạt động như một yếu tố xác định khả năng của các con đường ra hoa để đáp ứng với các tín hiệu. Vì vậy, con đường tự chủ thúc đẩy sự ra hoa một cách gián tiếp bằng cách tạo điều kiện đáp ứng các tín hiệu tích cực thúc đẩy sự ra hoa [26].

1.1.3.4. Con đường dựa trên hoạt động của Gibberellin

Gibberellin (GAs) là hormone thực vật có liên quan đến nhiều khía cạnh về tăng trưởng và phát triển của thực vật, bao gồm sự nảy mầm của hạt, kéo dài trụ lá mầm, sinh tổng hợp diệp lục và cảm ứng ra hoa [27]. Các đột biến ngăn chặn tín hiệu GAs (*GAI*) hoặc sinh tổng hợp GAs (*GAL-3*) làm chậm quá trình ra hoa, đặc biệt trong những ngày ngắn [18]. Xử lý bằng GAs có thể bắt đầu quá trình chuyển đổi hoa ở nhiều loài thực vật, bao gồm cả cây *Arabidopsis*. Các đột biến trong các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp GAs hoặc con đường tín hiệu GAs dẫn đến sự thay đổi thời gian ra hoa [28]. GAs dường như hoạt động độc lập với con đường quang chu kỳ bởi vì sự trì hoãn ở đột biến *GAI* là tương đối nhỏ trong điều kiện ngày dài so với điều kiện ngày ngắn. Hơn nữa, một đột biến kép của *GAI* với đồng đột biến quang chu kỳ biểu hiện một kiểu hình cộng gộp là sự ra hoa trễ trong điều kiện ngày dài [29]. GAs được cho là đã thúc đẩy sự hình thành hoa bằng cách thúc đẩy sự biểu hiện của các yếu tố tích hợp hoa, chẳng hạn như *LEAFY (LFY)* và *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)*. Do đó, các con đường tạo hoa do quang chu kỳ và GAs gây ra hoạt động độc lập để thúc đẩy quá trình chuyển đổi hoa bằng cách kích hoạt sự biểu hiện của các tích hợp hoa như *LFY* và *SOC1* [28].

1.1.4. Một số mô hình phát triển hoa ở thực vật

Hầu hết các cấu trúc phổ biến của hoa cơ bản bao gồm lá đài, cánh hoa, nhị hoa và lá noãn, bốn thành phần này được sắp xếp theo các vòng đồng tâm. Để đảm bảo khả năng sinh sản, các loài thực vật hạt kín đều có nhị hoa và lá noãn. Tuy nhiên, một số hoa có lá đài và cánh hoa xuất hiện không riêng lẻ, khiến hoa chỉ có 3 bộ phận. Để giải thích sự đa dạng trong cấu trúc hoa, các nhà khoa học đã nghiên cứu các đột biến về cấu trúc hoa trên các cây mô hình, như *Arabidopsis thaliana* và *Antirrhinum majus*. Các nghiên cứu đã dẫn đến sự đề xuất mô hình ABC, một mô hình tương đối đơn giản và hiệu quả để giải thích cho sự phát triển của cấu trúc hoa (Hình 1.1) [30].

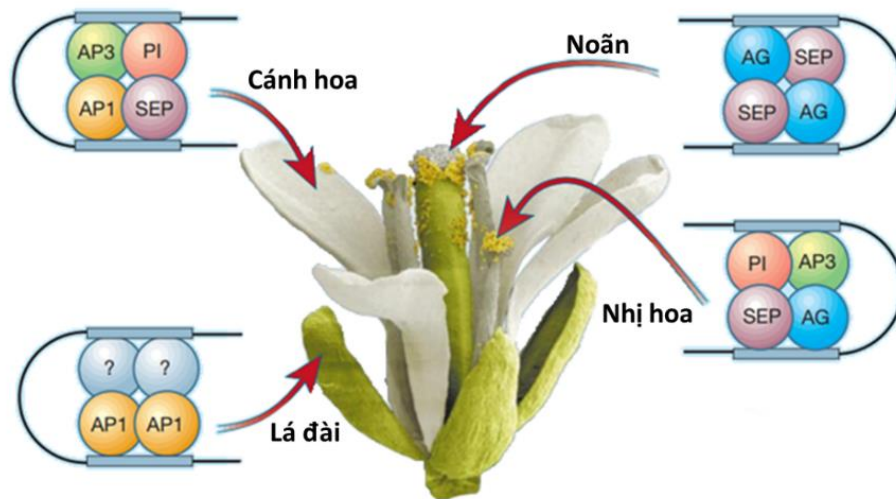


Hình 1.1. Mô hình ABC về sự phát triển của hoa. Các vòng xoắn của hoa *Arabidopsis thaliana* được ký hiệu: Se (1): lá đài, Pt (2): cánh hoa, St (3): nhị hoa, Ca (4): lá noãn. Góc bên phải thể hiện các đột biến hoa được nhìn thấy khi xảy ra biểu hiện đột biến của các chức năng A, B và C [30].

Mô hình này phân chia các đột biến hoa thành 3 nhóm chính bao gồm nhóm A, nhóm B và nhóm C. Nhóm A có lá noãn ở vòng ngoài cùng, tiếp theo là vòng nhị. Nhóm B có lá đài ở vòng thứ hai, tiếp theo là vòng lá noãn. Nhóm C có cánh hoa ở vòng thứ ba, tiếp theo là vòng lá đài. Các cá thể đột biến kép ở hoa có đặc điểm chung là đột biến trên một gen chỉ ảnh hưởng đến sự phát triển của hai vòng hoa liền kề, không phải toàn bộ hoa. Điều này được giải thích bởi sự tương tác kết hợp của các gen thuộc ba nhóm gen quy định sự hình thành các vòng hoa (đài hoa, cánh hoa, nhị hoa và lá noãn). Các gen này được phân nhóm tương tự như các đột biến là A, B và C. Trong đó, gen thuộc nhóm A liên quan đến hình thành đài hoa, A và B liên quan đến hình thành cánh hoa, B và C liên quan đến hình thành nhị hoa và C liên quan đến hình thành lá noãn (Hình 1.1).

Sau khi các nhà nghiên cứu tìm ra thêm được một gen *SEPALLATA* (*SEP*) là *SEP4*, hoạt động bù trừ của 4 gen *SEP* đối với cấu trúc hoa đã được chứng tỏ. Khi cả 4 gen *SEP* đều bị bất hoạt, hoa sẽ có cấu trúc hoàn toàn khác, giống như lá. Đột biến bộ ba gen *SEP1,2,3* cũng gây ra hiện tượng tương tự, khiến hoa chỉ toàn gồm lá đài. Qua đó có thể nhận định rằng gen *SEP4* có liên quan mật thiết đến các gen nhóm A.

Sự khám phá ra chức năng quan trọng của các gen *SEP* trên toàn bộ hoa đã dẫn đến sự ra đời của các biến thể của mô hình ABC truyền thống, bao gồm mô hình ABCE và mô hình Quartet (bộ tứ) (Hình 1.2). Trong các mô hình này, các gen *SEP* được xếp vào nhóm E. Theo mô hình bộ tứ, bốn tổ hợp protein hoa xác định các cơ quan hoa khác nhau, bao gồm lá đài, cánh hoa, nhị hoa và lá noãn. Đây là những yếu tố phiên mã, có thể hoạt động bằng cách liên kết với các vùng khởi động của các gen mục tiêu, chúng kích hoạt hoặc kìm hãm để thích hợp cho sự phát triển của các cơ quan hoa khác nhau. Tuy nhiên, các cấu trúc chính xác của các phức hợp đa phân tử của các protein kiểm soát sự nhận dạng của các cơ quan hoa vẫn chỉ là giả thuyết [31].



Hình 1.2. Cấu trúc hoa và “mô hình bộ tứ” của đặc điểm cơ quan hoa ở *Arabidopsis*. (?) Biểu thị các thành phần chưa xác định. Protein: AG, AGAMOUS; AP1, APETALA1; AP3, APETALA3; PI, PISTILLATA; SEP, SEPALLATA [31].

1.2. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự ra hoa ở thực vật

1.2.1. Độ tuổi

Để chuyển đổi chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản, thực vật cần bước vào giai đoạn trưởng thành. Ở giai đoạn này, mô phân sinh ngọn có đủ khả năng đáp ứng với các kích thích ra hoa và cây có khả năng tạo hormone ra hoa [32]. Mỗi nhóm cây có thời gian đạt trạng thái trưởng thành khác nhau. Chẳng hạn, cà chua đạt trạng thái trưởng thành rất sớm khoảng vài tuần, táo khoảng 4 - 8 năm và cây phong ngô đồng là 25 - 30 năm. Trong một số trường hợp, sự ra hoa bị ngăn cản bởi điều kiện tăng

trường một cách quá mức, ngược lại, hạn chế tăng trưởng trong chừng mực nào đó cũng có thể kích thích ra hoa, tạo quả trong một số trường hợp [33].

Hầu hết thực vật hạt kín đều phải trải qua một giai đoạn sinh trưởng cần thiết trước khi đạt đến trạng thái ra hoa. Tuổi ra hoa là đặc tính di truyền của thực vật và thay đổi theo loài; tuy nhiên các tác động bên ngoài như chế độ dinh dưỡng, nhiệt độ, quang kỳ có thể có ảnh hưởng đến việc thay đổi độ tuổi ra hoa. Chẳng hạn, sự ra hoa và tạo quả ở cây Đậu bắp (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) bị ảnh hưởng bởi độ tuổi bắt đầu cảm ứng quang kỳ và thời gian cảm ứng quang kỳ [34].

1.2.2. Nhiệt độ

Sự thay đổi nhiệt độ giữa đông sang xuân là một trong các tín hiệu để thực vật thực hiện quá trình sinh sản. Hiện tượng cây nở hoa sau khi trải qua một khoảng thời gian tiếp xúc với nhiệt độ thấp được gọi là hiện tượng thọ hàn (xuân hoá). Hiện tượng này có hai giai đoạn. Đầu tiên, thực vật sẽ nhận tín hiệu từ sự thay đổi môi trường xung quanh về thời gian lạnh kéo dài. Tiếp theo, thực vật dựa vào tín hiệu đó để cảm ứng cho sự hình thành hoa vào mùa xuân hoặc hạ. Đa số ở thực vật chịu sự ảnh hưởng của sự thọ hàn sẽ mất khoảng vài tuần đến vài tháng mới đến giai đoạn ra hoa. Thông thường, nhiệt độ lạnh dùng để xử lý thọ hàn nằm trong khoảng giá trị và khác nhau tùy theo loài. Nơi nhận nhiệt độ lạnh là mô phân sinh ngọn, vị trí phân chia tế bào. Mô phân sinh nhận biết nhiệt độ thấp, tạo và duy trì tín hiệu ra hoa sau nhiều lần phân chia tế bào và thoát khỏi trạng thái sinh dưỡng sau một thời gian dài. Sự truyền tín hiệu thọ hàn liên quan tới quá trình kiểm soát di truyền biểu sinh [33]. Nhiệt độ cũng được xem là một yếu tố được sử dụng để kích thích sự ra hoa *in vitro* ở thực vật. Chẳng hạn, cây con *Plumbago auriculata* Lam. được duy trì ở nhiệt độ luân phiên 35°C và 25°C trong 12 giờ cho sự hình thành nụ hoa *in vitro* với tỉ lệ hơn 90% [5].

1.2.3. Ánh sáng

Sự đa dạng về mặt phân bố của thực vật ngoài tự nhiên có liên quan mật thiết đến thời gian và cường độ chiếu sáng tại khu vực phân bố. Ánh sáng rất quan trọng với hầu hết các loài thực vật để tiến hành các quá trình tổng hợp các chất cho các hoạt động sống. Ngoài ra, ánh sáng còn là thông tin môi trường cần thiết đối với sự phát triển ở thực vật. Một số loài thực vật dựa trên sự thay đổi độ dài ngày (quang kỳ) để

điều chỉnh thời gian ra hoa của chúng phù hợp với những thay đổi theo mùa nhằm tăng khả năng sinh sản thành công. Dựa vào nhu cầu ánh sáng có thể chia thực vật ra làm ba nhóm: cây ngày dài, cây ngày ngắn và cây trung tính [35]. Bên cạnh đó, chất lượng ánh sáng không chỉ đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng của cây mà còn trong giai đoạn sinh sản của cây [24]. Tuy nhiên, phần lớn các loài thực vật có tính chất ban ngày và phần lớn ra hoa sau một thời gian phát triển sinh dưỡng, bất kể quang kỳ [35].

1.2.4. Chất điều hoà sinh trưởng thực vật

Auxin thường được tổng hợp ở đỉnh chồi, lá non và mô phân sinh, sau đó vận chuyển theo hướng gốc đến rễ và tích tụ ở đó [33]. Các sự kiện do auxin kiểm soát bao gồm phân chia tế bào, mở rộng tế bào và biệt hóa tế bào, điều chỉnh các mô hình tăng trưởng và phát triển ở thực vật. Sự phân bố của auxin trong toàn bộ cây chủ yếu xảy ra thông qua quá trình vận chuyển phân cực. Do đó, auxin được phân bố khác nhau giữa các mô, tạo ra một khoảng nồng độ kích hoạt các phản ứng phát triển ở các cơ quan thực vật khác nhau. Sự phát triển hoa là kết quả của sự điều hoà cân bằng giữa kích cỡ mô phân sinh và phối hợp với sự hình thành cơ quan hoa. Kích cỡ của mô phân sinh hoa được điều hoà bởi cytokinin, GAs và auxin, trong đó auxin đóng vai trò chính trong sự khởi phát cơ quan hoa cũng như sự phát sinh cơ quan của thực vật. Tín hiệu auxin đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của thực vật và trong các phản ứng tăng trưởng của các cơ quan thực vật đối với các tín hiệu môi trường. Tùy thuộc vào nồng độ và đặc điểm nhận dạng mô, auxin có thể kích thích hoặc ức chế sự kéo dài tế bào ở một bên của một cơ quan nhất định, dẫn đến sự phát triển khác biệt và do đó, dẫn đến sự uốn cong của cơ quan hoa [36].

Cytokinin có liên quan đến nhiều quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, nhiều bằng chứng cũng chỉ ra rằng chúng cũng có vai trò trong quá trình chuyển hoá hoa. Cytokinin làm tăng số lượng hoa, những thay đổi về cấu trúc cơ quan và những nụ hoa thứ cấp trên cây *Rosa damascena* [37]. Nó cũng có thể ảnh hưởng đến biểu hiện của các gen cấu trúc hoa. Cytokinin làm tăng số lượng cánh hoa ở cây *Arabidopsis* và tăng kích thước mô phân sinh hoa vì nó thúc đẩy sự biểu hiện gen *WUSCHEL* và ức chế biểu hiện gen *CLAVATA*. Tác động phối hợp của gen *CLAVATA* và *WUSCHEL* kiểm soát sự tăng sinh tế bào và phân hóa ở mô phân sinh ngọn [38].

Cytokinin cũng được chứng minh là có ảnh hưởng đến việc kích hoạt sự phân bào và ảnh hưởng cho sự phát triển của hạt phấn ở thực vật [39].

GAs được tổng hợp chủ yếu trong các cơ quan đang sinh trưởng như phôi đang sinh trưởng, lá non, rễ non, quả non, và trong tế bào thì được tổng hợp mạnh ở trong lục lạp. GAs kích thích kéo dài tế bào bởi cơ chế kiểm soát hướng các vi sợi cellulose mới được tổng hợp trong các tế bào, hiện tượng có tầm quan trọng hàng đầu trong sự tăng trưởng hữu cực của tế bào. Nó cũng có tác dụng kéo dài lông do sự phối hợp hoạt động kéo dài và phân chia tế bào thân. Ngoài tác dụng chính là kéo dài tế bào, GAs còn có tác động kích thích sự tăng trưởng của chồi và phá vỡ sự ngủ của chồi, kích thích sự nảy mầm, nảy chồi, sự ra hoa, v.v [33]. Trong quá trình ra hoa, GAs kích thích sự ra hoa ở một số loài nhưng nó cũng ức chế sự ra hoa ở một số loài khác. Mặt khác, GAs ít ảnh hưởng đến sự cảm ứng ra hoa ở thực vật ngày ngắn [40].

Axit abscisic (ABA) thường được biết đến với vai trò trung tâm trong các phản ứng liên quan đến các stress ở thực vật. Sự đóng góp của ABA vào quá trình cảm ứng ra hoa vẫn còn gây tranh cãi, vì cả tác động tích cực và tiêu cực đã được ghi nhận [41]. ABA thường ức chế sự hình thành nụ hoa, tuy nhiên, nó được báo cáo thúc đẩy sự ra hoa của một số cây ngày ngắn. Ở điều kiện hạn hán, sự tích lũy ABA thường gắn liền với các phản ứng ra hoa sớm ở nhiều loài thực vật [42]. Việc sử dụng ABA ngoại sinh gây ra sự thay đổi thời gian ra hoa, cho thấy ABA có thể là thành phần nội sinh ảnh hưởng đến giai đoạn cảm ứng hình thành hoa. Ở cây *Arabidopsis*, ABA đã tham gia vào việc kiểm soát quá trình chuyển hoá mầm hoa. Trong lá, tín hiệu ABA ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các gen ra hoa chịu trách nhiệm sản xuất florigen là *FT*. Ở đỉnh chồi, các yếu tố phiên mã *FD* tương tác với các protein FT để điều chỉnh phản ứng của ABA. Tuy nhiên, ABA cũng điều chỉnh một cách tiêu cực quá trình chuyển đổi hoa bằng cách thúc đẩy trực tiếp quá trình phiên mã *FLC* [42].

Ethylene (ETH) là một hormone thực vật có chức năng điều chỉnh nhiều khía cạnh của sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Là một hormone thể khí, ETH có thể tự do khuếch tán qua màng và được cho là được tổng hợp tại hoặc gần vị trí hoạt động của nó, điều này khác với các hormone thực vật khác. Những thay đổi về mức độ ETH gây ảnh hưởng đến các tín hiệu khác nhau để điều chỉnh thời điểm ra hoa ở thực vật. ETH đóng vai trò như một tín hiệu có thể tương tác với sự phát triển của sơ

khởi hoa, có chức năng như chất điều chỉnh tích cực nhận dạng cơ quan hoa và các gen tăng trưởng, cùng với các con đường truyền tín hiệu nội tiết tố [43]. Trong quá trình phát triển hoa, ETH điều chỉnh sự phát triển và trưởng thành của cơ quan sinh sản và cánh hoa cho đến khi nở hoa. Các phân tích phiên mã, các thể đột biến, và ứng dụng bên ngoài của các chất kích thích và ức chế ETH đã chứng minh rằng ETH điều chỉnh sự kéo dài của nhị hoa, sự phát triển và trưởng thành của bao phấn và phấn hoa, sự hình thành và trưởng thành của nhụy hoa và noãn, và sự lão hóa và rụng của cánh hoa. ETH cũng liên quan đến quá trình chuyển đổi hình thành hoa cái, phần lớn ở các cây đơn tính họ bầu bí. Các sự kiện thụ phấn và thụ tinh thành công kích thích đậu quả và phát triển quả sớm ở các loài như cà chua và bí xanh cũng phụ thuộc vào việc giảm sản xuất ETH ở hoa [44].

1.2.5. Một số chất khác ảnh hưởng đến sự ra hoa ở thực vật

1.2.5.1. Polyamine

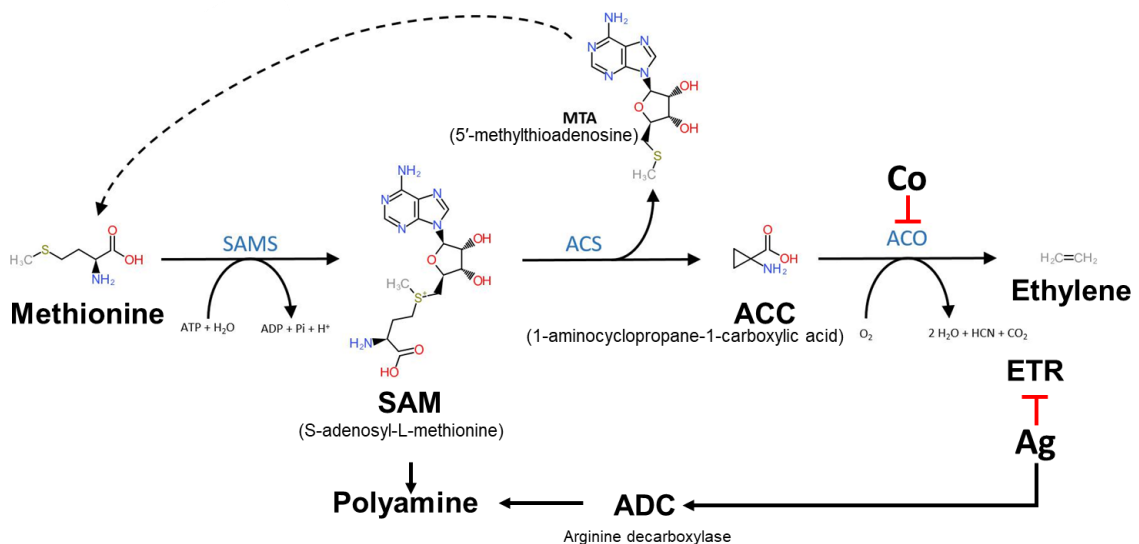
Polyamine (PA), là những hợp chất hữu cơ bao gồm có 2 hoặc nhiều nhóm amin, hoạt động như chất điều hòa sinh trưởng và được coi là phổ biến trong tất cả các sinh vật sống. Putrescine (Put), Spermidine (Spd), Spermine (Spm) là các loại PA có mặt phổ biến trong sinh vật sống bao gồm cả thực vật. Ở thực vật, các PA này đóng một vai trò quan trọng trong các quá trình sinh học trong suốt vòng đời. Vì PA có thể tương tác với các đại phân tử của tế bào, chẳng hạn như DNA, RNA, chất nhuộm sắc và phospholipid, cũng như với protein; sự tương tác này giải thích mối quan hệ của chúng với nhiều quá trình cơ bản của tế bào, bao gồm điều hòa biểu hiện gen, dịch mã, tái cấu trúc chất nhuộm sắc, kích hoạt protein, tăng sinh tế bào, điều hòa tín hiệu tế bào, ổn định màng và điều chỉnh sự chết của tế bào [45].

PA liên quan đến việc điều chỉnh các quá trình sinh trưởng và phát triển ở thực vật. Chúng ảnh hưởng đến sự phát triển rễ sơ cấp, bên và bất định, cấu trúc thực vật, quá trình tạo phôi soma (SE) và phát sinh cơ quan, ra hoa, quá trình chín của quả, và sự lão hóa của lá và hoa. Các phương pháp di truyền, sinh hóa và chuyển gen đã chứng minh rằng quá trình trao đổi chất của các loại PA khác nhau được điều hòa chặt chẽ và sự mất cân bằng trong cân bằng nội môi của chúng dẫn đến các kiểu hình bất thường. Hơn nữa, mỗi PA có thể có tác động khác nhau đến quá trình trao đổi chất, tăng trưởng và phát triển ở thực vật [46].

PA đóng vai trò quan trọng đối với sự cảm ứng ra hoa và sự phát triển của các cơ quan hoa. Ở hoa *Phaseolus vulgaris* trưởng thành, nõn chứa nồng độ PA tự do cao hơn những cơ quan hoa khác, trong khi đó, nhị chứa nhiều PA liên kết. Trong giai đoạn đầu của sự phát triển hoa ở hoa hồng, hàm lượng Put và Spd là 2 loại PA xuất hiện chủ yếu. Mặt khác, PA gây ức chế sự ra hoa dưới điều kiện cảm ứng quang kỳ ở cây *Lemna pansicostata*. Ở hoa của cây *Citrus sinensis*, sự tổng hợp Put và Spd tăng trong suốt giai đoạn đầu phát triển, tiếp đến giảm rồi tăng lên sau đó ở giai đoạn nở hoa [47]. Vì vậy, có thể thấy rằng nhu cầu về loại và hàm lượng PA phụ thuộc lớn vào giai đoạn của quá trình ra hoa và loài thực vật.

1.2.5.2. Bạc và coban

Việc bổ sung ion kim loại như bạc và coban trong môi trường nuôi cấy có thể tác động đến các quá trình phát sinh cơ quan, phát sinh phôi, ra rễ *in vitro*, hoặc cảm ứng ra hoa một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Hiện tại, cơ chế chính xác của tác dụng của ion bạc và ion coban đối với thực vật không rõ ràng. Tuy nhiên, một số bằng chứng hiện có cho thấy sự can thiệp của nó vào hoạt động của ETH. Ion bạc đã được biết là có tác động ức chế hoạt động của ETH và các ion coban được biết là có tác dụng ức chế quá trình tổng hợp ETH (Hình 1.3).



Hình 1.3. Sơ đồ thể hiện con đường sinh tổng hợp ETH từ Methionine và vị trí tác động của chất ức chế (coban và bạc) [48, 49].

Đồng là một yếu tố kết hợp với các thụ thể ETH (*ETR1*). Sự có mặt của đồng là cần thiết để ETH có thể gắn kết chặt chẽ với *ETR1*. Bạc có thể thay thế đồng trong

phức hợp *ETR1*-Cu, do đó có thể gây rối loạn hoạt tính của protein *ETR1*. Trong khi đó, coban ức chế quá trình tổng hợp ETH thông qua cản trở quá trình chuyển đổi ACC thành ETH [48, 50]. Ở một số loài, ETH có vai trò kích thích sự ra hoa, đặc biệt là ra hoa ở thom và xoài. Tuy nhiên, ở đa số các loài thực vật khác, ETH lại gây ức chế sự ra hoa [2].

Trong điều kiện *in vitro*, việc bổ sung AgNO_3 và CoCl_2 ngoại sinh trong môi trường MS đã ảnh hưởng đến sự ra hoa *in vitro* trên cây *Capsicum frutescens*. Các hoa *in vitro* được ghi nhận sau 25 và 45 ngày tương ứng với AgNO_3 ở nồng độ 40 μM và CoCl_2 ở nồng độ 30 μM [50]. Một số nghiên cứu khác đã báo cáo sự ra hoa và tạo quả *in vitro* ở *Capsicum* spp. [2], *Solanum americanum* và *Solanum villosum* [10] trong môi trường được bổ sung AgNO_3 hoặc $\text{Ag}_2\text{O}_3\text{S}_2$. Tuổi thọ hoa *in vitro* của *Dianthus chinensis* cũng được cải thiện trong môi trường bổ sung AgNO_3 [11].

Mặt khác, công nghệ nano là một lĩnh vực khoa học và công nghệ đang phát triển nhanh chóng, liên quan đến việc phát triển các giải pháp mới bằng cách hiểu và kiểm soát vật chất ở cấp độ nano. Công nghệ nano tiến hành nghiên cứu và thao tác trên các hạt ở kích thước nano nhằm sử dụng các đặc tính độc đáo của chúng để tìm ra giải pháp cho các vấn đề trong các lĩnh vực khác nhau. Về nguyên tắc, hạt nano là những hạt có kích thước ít nhất một chiều (chiều dài, chiều rộng và chiều cao) từ 1 đến 100 nm [51]. Các hạt nano thể hiện các đặc tính vật lý, hóa học và sinh học độc đáo không giống như ở dạng khối. Các đặc tính hóa lý của chúng như nhiệt độ nóng chảy, tính thấm, độ dẫn nhiệt và điện, hoạt tính xúc tác và hấp thụ ánh sáng có thể được điều chỉnh, mang lại lợi thế cho chúng so với dạng khối và dẫn đến hiệu suất nâng cao [52]. Sự thay đổi này có thể là do tỉ lệ diện tích bề mặt trên thể tích tương đối lớn hơn, phân bố và tỉ lệ điện tích bề mặt [53]. Các đặc tính độc đáo của các hạt nano đã dẫn đến các ứng dụng rộng rãi trong hầu hết các lĩnh vực khoa học và công nghệ.

Các hạt nano bạc (Silver nanoparticles - AgNPs) là một trong những vật liệu nano được công nhận và ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực do các đặc tính độc đáo của chúng. AgNPs có thể được tổng hợp bằng các phương pháp vật lý (nghiền cơ học), hóa học (laser, khử điện hóa và khử hóa chất) và sinh học [54]. AgNPs đã được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực nghiên cứu nông nghiệp để tăng năng

suất, hiệu quả và tính bền vững của cây trồng [55]. Bên cạnh đó, cơ chế hoạt động được đề xuất của AgNPs trên thực vật và những hạn chế gặp phải khi áp dụng các hạt nano này trên quy mô thương mại cũng được quan tâm nghiên cứu. Trong khi AgNPs đã chứng tỏ tiềm năng to lớn trong nuôi cấy mô thực vật, ứng dụng của chúng trong việc tăng cường sự phát triển tổng thể của cây trồng đã cho thấy những kết quả trái ngược nhau ở các loài thực vật khác nhau. Điều này rõ ràng nhấn mạnh rằng cần phải nghiên cứu sâu hơn để hiểu được những phức tạp liên quan đến hoạt động của các hạt nano và các tác động của chúng đến thực vật [56].

Trong những năm gần đây, việc ứng dụng AgNPs trong công nghệ sinh học thực vật và nông nghiệp đã nhận được sự quan tâm đáng kể của các nhà khoa học [56]. Đặc biệt, ảnh hưởng tích cực của AgNPs trong vi nhân giống thực vật đã được báo cáo ở nhiều khía cạnh như khử trùng mẫu cây, hình thành và tăng sinh SE, tăng hiệu quả tái sinh chồi và tăng sự tích lũy các hợp chất thứ cấp [56-59]. Đối với sự ra hoa, Ngan và cộng sự (2019) cũng đã báo cáo về sự ra hoa *in vitro* của cây *Rosa hybrida* trong môi trường bổ sung 5,0 ppm AgNPs [60]. AgNPs ở nồng độ 6,0 mg/L được bổ sung trong môi trường MS đã tăng cường đáng kể sự ra hoa *in vitro* ở cây *Dendrocalamus strictus*. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu trên cũng cho thấy tính đồng nhất di truyền của cây con trong môi trường chứa AgNPs với cây cho mẫu ban đầu [61].

AgNPs được cho là có thể tác động đến quá trình ra hoa *in vitro* thông qua tương tác với nhiều yếu tố. Sự tương tác của chúng với phytohormones, biểu hiện gen và truyền tín hiệu qua các trung gian như các loại oxy phản ứng (ROS), từ đó tác động phối hợp đến quá trình cảm ứng và phát triển của hoa. Thêm vào đó, các loài thực vật khác nhau thường cho phản ứng không đồng nhất đối với các loại và liều lượng của AgNPs [61]. Do đó, việc nghiên cứu các tác động của AgNPs cho quá trình ra hoa *in vitro* của các loài thực vật có thể là một hướng nghiên cứu mới và tiềm năng.

1.3. Một số nghiên cứu ra hoa và tạo quả *in vitro*

Một trong những giai đoạn quan trọng nhất trong vòng đời của thực vật là chuyển đổi từ quá trình sinh dưỡng sang sinh sản [62]. Quá trình này bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác nhau, chẳng hạn như PGR, ánh sáng, nhiệt độ và những yếu tố khác đóng vai trò là các yếu tố kích hoạt hình thái di truyền cho quá trình chuyển đổi

[1, 9]. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự ra hoa *in vitro* như dinh dưỡng, khoáng, ánh sáng, nhiệt độ, các PGR. Chẳng hạn, nhiệt độ tác động lên hoạt động của enzyme ascorbate peroxidase và gây ra sự ra hoa của cây *Arabidopsis thaliana*; hoặc điều kiện ánh sáng khác nhau ảnh hưởng đến sự ra hoa sớm ở tre. Giảm dinh dưỡng và khoáng làm tăng tốc độ ra hoa *in vitro* ở *A. thaliana*. Paclobutrazole, đèn LED và sucrose ảnh hưởng đáng kể đối với sự ra hoa của cây *Euphorbia milii* nuôi cấy *in vitro*. Sử dụng AgNO₃ ảnh hưởng tốt đến sự ra hoa của một số loài chi *Capsicum* [2]. Trong số đó, các chất điều hoà sinh trưởng là nhân tố quan trọng trong lĩnh vực ra hoa *in vitro* ở thực vật. Một số nghiên cứu sử dụng nguồn mẫu và chất điều hoà sinh trưởng khác nhau lên sự ra hoa *in vitro* của một số cây trồng được trình bày ở Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Một số PGR ảnh hưởng đến sự ra hoa *in vitro* ở một số loài thực vật [1, 9, 63, 64].

| Loài | Mẫu cây ban đầu | PGR |
|---|--------------------|--|
| <i>Ammi majus</i> L. | Đốt thân | IAA, kinetin, casein hydrolysate, adenin, glutamine, IBA |
| <i>Ananas bracteatus</i> var. <i>tricolor</i> | Mô sẹo | BA, NAA |
| <i>Artemisia annua</i> L. | Cơ quan sinh dưỡng | Myo inositol, NAA, BA, GA ₃ , L-asparagine, L-arginine, glutamine |
| <i>Basilicum polystachyon</i> (L.) Moench | Chồi ngọn | BA, kinetin, IBA, IAA |
| <i>Capsicum annuum</i> L. Cv. Sweet Banana | Phôi hợp tử | NAA, Ag ₂ O ₃ S ₂ |
| <i>Ceropegia bulbosa</i> var. <i>bulbosa</i> | Đốt thân | GA ₃ , BA |
| <i>Ceropegia jainii</i> Ansari & B.G.Kulk. | Đốt thân | BA, spermine |
| <i>Chenopodium murale</i> L. | Đốt thân | BA, IAA, GA ₃ |
| <i>Cichorium intybus</i> L. | TCL | NAA, BA, IAA |
| <i>Cichorium intybus</i> L. | Mô sẹo | 2iP, GA ₃ , AgNO ₃ |
| <i>Citrus nobilis</i> Lour x <i>C. delicoisa</i> Tenora (Kinnow mandarin) | Noãn | Kinetin, sucrose |
| <i>Cymbidium goeringii</i> Rchb.f | Thân rễ | NAA, BA, GA ₃ |

| Loài | Mẫu cây ban đầu | PGR |
|--|-----------------------------|--|
| <i>Dendrobium</i> Second Love | Mô phân sinh đỉnh | TDZ, IAA, zeatin |
| <i>Gardenia jasmonoides</i> Ellis cv. 'Veitchii' | Đốt thân | Paclobutrazole |
| <i>Kniphofia leucocephala</i> | Chồi | BA, 2iP, zeatin, GA ₃ |
| <i>Lilium rubellum</i> Baker | Vảy | BA |
| <i>Lolium temulentum</i> L. | Hạt | GAs |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Lá, đoạn thân | BA, ABA, IAA |
| <i>Momordica charantia</i> L. | Chồi đỉnh | BA, Kinetin |
| <i>Nicotiana tabacum</i> L. | TCL | IAA, kinetin |
| <i>Ocimum basilicum</i> L. | Đốt thân | Kinetin, BA, IAA, GA ₃ , NAA |
| <i>Ocimum basilicum</i> L. | Chồi ngọn | GA ₃ |
| <i>Oxalis corniculata</i> | Chồi ngọn | NAA, kinetin |
| <i>Phalaenopsis hybrida</i> Vilm. | Đốt thân | ABA |
| <i>Phyllanthus niruri</i> L. | Đốt thân | BA, kinetin, GA ₃ |
| <i>Pisum sativum</i> L. | Lá mầm, đốt thân, chồi ngọn | BA, IBA, NAA, GA ₃ |
| <i>Ptilotus spicatus</i> Benth. | Đốt thân | Ethephon, ETH |
| <i>Pyrus pyrifolia</i> (Burm.) Nak. | Chồi đỉnh, chồi nách | GA ₃ , GA ₄ , B ₉ |
| <i>Rhododendron</i> spp. | Nụ hoa/ Nhị | TDZ, 2iP |
| <i>Ribes nigrum</i> L. | Đốt thân | GA ₃ , IBA, cytokinins |
| <i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turez.) Schishk | Rễ, đốt thân, lá | 2,4-D, NAA, BA, ABA, ethephon |
| <i>Scoparia dulcis</i> L. | Mô sẹo | IAA, BA, NAA, IBA, kinetin |
| <i>Talinum paniculatum</i> (Jaeq) Gaertn. | Tế bào trần | 2,4-D, NAA, BA, zeatin |

Kỹ thuật *in vitro* tạo điều kiện thuận lợi để hiểu được vai trò của PGR, đường, khoáng, ion Bạc, v.v đối với sự ra hoa và đặc biệt là sự tạo quả trong môi trường được kiểm soát hoàn toàn, nơi tất cả các yếu tố khác (như yếu tố hóa học, vật lý, sinh học) là không đổi. Một số nghiên cứu về tạo quả *in vitro* được ghi nhận ở một số loài thực vật khác nhau thể hiện ở Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Sự tạo quả và hạt ở một số loài thực vật trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

| Loài | Mẫu cấy ban đầu | Tạo quả | Tạo hạt | Hạt có khả năng nảy mầm | Nguồn |
|--|-----------------|---------------|------------|-------------------------|-------|
| <i>Phyllanthus niruri</i> | Đốt thân | + (97%) | <i>kth</i> | <i>kth</i> | [65] |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill | Lá | + | + | + | [66] |
| <i>Begonia parvula</i> | Hạt | + | + | <i>kth</i> | [67] |
| <i>Lens culinaris</i> Medik. | Hạt | + (58%) | + | + (70%) | [68] |
| <i>Cleome viscosa</i> | Đốt thân | + (72,74%) | + | + (75%) | [7] |
| <i>Scrophularia takesimensis</i> Nakai | Chồi | + | + | <i>kth</i> | [69] |
| <i>Vicia faba</i> | Hạt | + | + (90%) | + | [70] |
| <i>Withania somnifera</i> | Chồi ngọn | + (74,9%) | + | + (66%) | [8] |
| <i>Capsicum</i> spp. | Chồi ngọn | + | + | <i>kth</i> | [2] |
| <i>Ceropegia rollae</i> Hemadri | Đốt thân | + | <i>kth</i> | <i>kth</i> | [71] |
| <i>Cucumis sativus</i> | Đốt thân | + | <i>kth</i> | <i>kth</i> | [72] |
| <i>Solanum americanum</i> , <i>Solanum villosum</i> | Cây con | + | + | + (86,4 - 94,5%) | [10] |
| <i>Portulaca pilosa</i> | Thân | + | + | + (78%) | [12] |
| <i>Oxalis corniculata</i> | Đốt thân | + | + | + (75%) | [64] |

(+: có khả năng, *kth*: không thể hiện)

Thông thường, sự tạo quả *in vitro* thường được ghi nhận gắn liền với các nghiên cứu ra hoa *in vitro* và khả năng tạo quả khác nhau trên mỗi loài thực vật đã được ghi nhận. Chẳng hạn, cây *Lycopersicon esculentum* tái sinh từ các mẫu cây lá đã ra hoa *in vitro* trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA, 1 mg/L ABA và 0,5 mg/L IAA. Quả *in vitro* hình thành trong vòng 162 ngày sau khi thụ phấn [73]. Sự ra hoa và tạo quả ở cà chua cũng được ghi nhận trong điều kiện *in vitro*. Cây tái sinh từ các mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường chứa Timentin (100 - 400 mg/L) bổ sung kết hợp IAA (0,1 mg/L) và Zeatin (2,0 mg/L) đã ra hoa và tạo quả *in vitro* với tần suất cao. Ngoài ra, hạt cũng được hình thành trong điều kiện *in vitro* và cho thấy sự nảy mầm bình thường [66].

Việc bổ sung $Ag_2O_3S_2$ đã cải thiện cảm ứng ra hoa và tạo quả *in vitro* với tần suất cao ở hai loài *Solanum* (*S. americanum* và *S. villosum*). Hoa được tạo ra trong vòng 90 ngày nuôi cấy trong môi trường chứa 40 μM $Ag_2O_3S_2$. Việc tăng nồng độ sucrose lên 5,0% và thụ phấn bằng tay đã nâng cao hiệu suất đậu quả *in vitro*. Tất cả hoa và quả đều có kích thước và màu sắc bình thường so với cây *in vivo*. Tần số nảy mầm của hạt được tạo *in vitro* là 86,4% (*S. americanum*) đến 94,5% (*S. villosum*) [10]. $AgNO_3$ (hoặc $Ag_2O_3S_2$) cũng được sử dụng để gây ra hoa và đậu quả *in vitro* với tần suất cao ở một số giống *Capsicum* [2].

Sự ra hoa và đậu quả *in vitro* trên 97% số chồi đã được báo cáo trên cây *Phyllanthus niruri* L. khi nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung PGR. Sự ra hoa *in vitro* đầu tiên được quan sát thấy sau 12 ngày kể từ khi phát sinh ban đầu của mẫu đốt thân, trong khi sự tạo quả xảy ra sau 20 ngày nuôi cấy. Việc bổ sung 0,5 mg/L GA_3 vào môi trường MS đã gây ra hoa *in vitro* trong vòng một tuần nhưng lại ức chế sự đậu quả [65]. Sự ra hoa *in vitro* và hình thành hạt trên các chồi được tái sinh từ mẫu cây đốt thân của cây *Cleome viscosa* được ghi nhận. Các chồi hoa bắt đầu từ các chồi tái sinh trên $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 0,25 mg/L BA; 0,5 mg/L IBA và 40 g/L sucrose. Những nụ hoa này nở trong điều kiện ánh sáng yếu với chu kỳ chiếu sáng 15 giờ/ngày trong vòng 3 tuần kể từ khi bắt đầu nuôi cấy. Các chồi không ra hoa trong bóng tối. Quả *in vitro* hình thành sau 5 tuần nuôi cấy. Hạt được tạo ra từ quả *in vitro* có khả năng hình thành cây mới [7].

Cây con *Dendrobium officinale* Kimura et Migo có chiều cao 2 - 4 cm, được duy trì *in vitro* và cảm ứng ra hoa với tỉ lệ cụm hoa cao nhất (83,2%) và hoa bình thường (73,6%) được tạo ra trên môi trường MS bổ sung 15% nước dừa và 0,1 mg/L TDZ trong vòng 9 tuần. Hoa *in vitro* được thụ phấn nhân tạo và hầu hết các hạt tạo thành đều nảy mầm trên môi trường MS [74]. Trên cây *Scrophularia takesimensis* Nakai, tần số cảm ứng ra hoa lớn nhất (96,8%) thu được khi các chồi được nuôi cấy trên môi trường MS cải tiến có chứa 6% sucrose dưới đèn LED xanh lam trong vòng 45 ngày. Cây phát triển hoa được duy trì *in vitro* có khả năng hình thành quả [69]. Cây *Ceropegia rollae* Hemadri cho tỉ lệ cảm ứng chồi hoa tối đa (91,67%) và số chồi hoa trên mỗi mẫu cấy (7,33 chồi hoa) trên môi trường MS bổ sung 6% sucrose và NAA. Người ta cũng quan sát thấy nang quả *in vitro* do kết quả của quá trình tự thụ phấn [71].

Ảnh hưởng của PGR, đường sucrose và nhiệt độ lên sự tái sinh chồi, ra hoa và đậu quả *in vitro* của cây *Withania somnifera* đã được nghiên cứu. Tần suất ra hoa cao nhất (88%) với trung bình 8,3 hoa trên mỗi chồi và tần suất đậu quả lớn nhất (74,9%) thu được khi các ngọn chồi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/L BA và 60 g/L sucrose. Hạt hình thành từ hoa *in vitro* nảy mầm với tỉ lệ 66% trên môi trường MS có chứa 0,3 mg/L GA₃ [8].

1.4. Khái quát về cây chanh dây tím

1.4.1. Giới thiệu

1.4.1.1. Phân loại

| | |
|------------------|--|
| Giới (regnum) | : Thực vật (Plantae) |
| Ngành (division) | : Hạt kín (Magnoliophyta) |
| Lớp (class) | : Hai lá mầm (Magnoliopsida) |
| Bộ (ordo) | : Sơ Ri (Malpighiales) |
| Họ (familia) | : Lạc Tiên (Passifloraceae) |
| Chi (genus) | : <i>Passiflora</i> |
| Loài (species) | : <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>edulis</i> |

1.4.1.2. Đặc điểm thực vật học

Thân: cây chanh dây có thân dạng dây leo bán thân gỗ lâu năm, thường xanh hoặc bán thường xanh. Mỗi đốt có một tua cuốn phát triển ở nách lá.

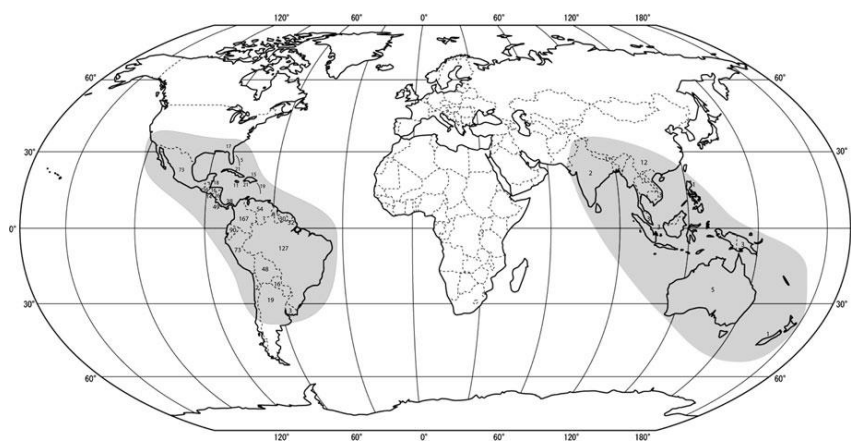
Lá: Lá có dạng ba thùy, màu xanh, viền ngoài có dạng răng cưa, cây non lá ít chia thùy và có hình trái xoan.

Hoa: Hoa phát triển ở nách lá, hoa lưỡng tính.

Quả: Quả có dạng hình bầu dục, vỏ quả trơn láng và cứng, đường kính từ 5 - 7 cm, trọng lượng quả từ 80 - 110 gam, có khoảng 100 - 180 hạt/quả [14].

1.4.1.3. Thích nghi và phân bố

Chanh dây phát triển tốt nhất ở khí hậu cận nhiệt đới. Lượng mưa hàng năm cần tối thiểu là 900 mm/năm. Loài cây này có rễ ăn nông nhưng chịu được khô hạn bằng cách làm rụng lá. Chanh dây chịu được nhiều loại đất và phát triển tốt nhất trên đất thịt pha cát, thoát nước tốt, độ pH từ 6,5 đến 7,5. Nhìn chung, chanh dây thích nghi với nhiều dạng khí hậu, độ cao (0 - 4.500 m) và hệ sinh thái (từ rừng ẩm nhiệt đới đến các vùng khô hạn) [14].



Hình 1.4. Sự phân bố của chi *Passiflora* (thể hiện tại vùng màu xám) [14].

Các loài *Passiflora* tập trung chủ yếu vùng Trung và Nam Mỹ, trong đó Nam Mỹ chiếm phần lớn tổng số loài (Hình 1.4). Một số loài cũng được tìm thấy ở các vùng cận nhiệt đới, thậm chí ôn đới ở Bắc và Nam Mỹ và 24 loài có nguồn gốc từ Đông Nam Á, Úc và các đảo ở Thái Bình Dương. Sự đa dạng về loài cao nhất trong họ Passifloraceae được tìm thấy là ở Colombia, tại đây đã tìm thấy 167 loài (trong đó có 165 loài bản địa), tiếp theo là Brazil (127 loài) và Ecuador (90 loài). Giống chanh

dây tím phổ biến ngày nay có nguồn gốc từ miền nam Brazil, Paraguay kéo dài đến miền bắc Argentina [75].

1.4.1.4. Giá trị của cây chanh dây

Họ Passifloraceae bao gồm hơn 600 loài. Trong đó, chi *Passiflora* là chi lớn nhất với hơn 520 loài, nhưng phần lớn các loài là hoang dại và ít được biết đến, chỉ một số loài có giá trị thương mại đáng kể. Trên thế giới, ngành thương mại chanh dây chủ yếu dựa trên giống chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) và chanh dây vàng (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) [14].

Chanh dây thường được ăn tươi hoặc ép lấy nước và chế biến thành các dạng thực phẩm thương mại khác nhau. Qua phân tích cho thấy có 3 nhóm hoạt chất chính trong chanh dây là alkaloid, glycosid và flavonoid và một số chất như tannin, phenol, axit béo [76]. Chanh dây được sử dụng trong các bài thuốc dân gian và dùng trong mỹ phẩm ở nhiều quốc gia. Các bộ phận khác nhau của cây được chứng minh là có tác dụng giảm đau, chống lo âu, chống viêm, giảm ho, lợi tiểu, ổn định huyết áp và an thần. Nó có tác dụng đầy hứa hẹn đối với việc hỗ trợ chữa trị các rối loạn thần kinh, các bệnh tim mạch và ung thư [77]. Ngoài ra, hạt chanh dây cũng cung cấp nhiều dinh dưỡng như chất xơ, protein, carbohydrate và các khoáng chất thiết yếu có thể bổ sung vào chế độ ăn uống của con người và thức ăn chăn nuôi. Bên cạnh đó hạt chanh dây có thể được sử dụng làm nguyên liệu để chiết xuất dầu [78].

1.4.2. Một số nghiên cứu trên cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*

Các nghiên cứu về cây chanh dây tím nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* được ghi nhận hiện tại chủ yếu tập trung vào một số giai đoạn trong quá trình vi nhân giống (Bảng 1.3).

Bảng 1.3. Một số nghiên cứu trên cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*.

| STT | Tên | Năm | Nguồn |
|-----|--|------|-------|
| 1 | Nghiên cứu quá trình vi nhân giống ở một số giống chanh dây | 2004 | [79] |
| 2 | Những hiểu biết mới đối với quá trình phát sinh cơ quan <i>in vitro</i> trên chi <i>Passiflora</i> | 2007 | [80] |

| STT | Tên | Năm | Nguồn |
|-----|--|------|-------|
| 3 | Sự phát sinh cơ quan từ mẫu rễ của loài chanh dây thương mại <i>Passiflora edulis</i> Sims và loài chanh dây hoang dại <i>Passiflora cincinnata</i> Masters | 2011 | [81] |
| 4 | Tạo phôi soma từ phôi hợp tử trưởng thành của kiểu gen cây chanh dây thương mại (<i>Passiflora edulis</i> Sims) | 2011 | [82] |
| 5 | Phân tích giải phẫu và cấu trúc của sự phát sinh cơ quan <i>in vitro</i> từ mẫu rễ của cây chanh dây thương mại (<i>Passiflora edulis</i> Sims) | 2012 | [83] |
| 6 | Các phản ứng đối với việc tạo phôi soma ở một số loài <i>Passiflora</i> spp. | 2015 | [84] |
| 7 | Sự chuyển đổi phát sinh chồi <i>de novo</i> hoặc sự tạo phôi soma từ nuôi cấy <i>in vitro</i> phôi hợp tử trưởng thành của chanh dây (<i>Passiflora edulis</i> Sims) được điều chỉnh bằng tỷ lệ giữa auxin và cytokinin trong môi trường nuôi cấy | 2015 | [85] |
| 8 | Những thay đổi về tế bào và phân tử liên quan đến quá trình tạo phôi soma của chanh dây: mô tả đặc tính cấu trúc và phân tích biểu hiện gen <i>SERK</i> | 2016 | [86] |
| 9 | Ảnh hưởng của PGR và chất chống oxy hóa đến khả năng tái sinh cây <i>in vitro</i> và tạo mô sẹo từ mẫu lá chanh dây tím | 2017 | [87] |
| 10 | Nghiên cứu tạo mô sẹo <i>in vitro</i> trên <i>Passiflora edulis</i> Sims: một cây thuốc quý | 2017 | [88] |
| 11 | Kích thích sự phát sinh chồi thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào lá ở <i>Passiflora edulis</i> Sims | 2018 | [89] |
| 12 | Tái sinh cây tam bội <i>in vitro</i> từ nuôi cấy nội nhũ của cây chanh dây thương mại | 2018 | [90] |
| 13 | Thiết lập nguồn mẫu cây vô tính cây chanh dây tím và cây chanh dây vàng | 2018 | [91] |
| 14 | Sự tái sinh chồi và vi nhân giống ở cây chanh dây tím thông qua nuôi cấy các mẫu cấy lớp mỏng tế bào cắt dọc | 2019 | [92] |
| 15 | Topoline và ánh sáng đỏ cải thiện hiệu quả vi nhân giống trên cây chanh dây (<i>Passiflora edulis</i> Sims) ‘Tainung No. 1’ | 2020 | [93] |

| STT | Tên | Năm | Nguồn |
|-----|--|------|-------|
| 16 | Nhân giống <i>in vitro</i> cây <i>Passiflora edulis</i> từ đoạn thân dưới ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy | 2021 | [94] |
| 17 | Polyethylene glycol thúc đẩy sự trưởng thành của phôi soma ở <i>Passiflora edulis</i> Sims 'UENF Rio Dourado' bằng cách tích lũy các protein và điều chỉnh hàm lượng các PA nội sinh | 2022 | [95] |
| 18 | Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng ở chanh dây trong tái sinh thực vật và vi nhân giống | 2022 | [96] |
| 19 | Các hạt nano selen thúc đẩy sự ra rễ bất định mà không hình thành mô sẹo ở gốc chồi chanh dây thông qua thay đổi cân bằng hormone | 2023 | [97] |
| 20 | Sản xuất chồi <i>in vitro</i> chanh dây sạch virus bằng phương pháp nuôi cấy mô phân sinh đỉnh | 2023 | [98] |

Các nghiên cứu về cây chanh dây tím nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* được ghi nhận hiện tại chủ yếu tập trung vào một số giai đoạn trong quá trình vi nhân giống (Bảng 1.3). Chẳng hạn, Hiếu và cộng sự (2018) đã nghiên cứu tạo nguồn mẫu *in vitro* từ chồi đỉnh, đốt thân và đoạn thân nhằm lựa chọn nguồn mẫu ban đầu và phương pháp khử trùng mẫu phù hợp cho quy trình vi nhân giống. Kết quả cho thấy rằng mẫu đốt thân *ex vitro* được khử trùng bằng AgNPs (0,1%) trong thời gian 15 phút cho hiệu quả khử trùng và hệ số tái sinh chồi cao hơn so với các nguồn mẫu (chồi đỉnh, đoạn thân) và các chất khử trùng khác (NaOCl, HgCl₂) [91]. Chen và cộng sự (2020) đã nghiên cứu và báo cáo rằng sử dụng *meta*-Topoline (mT) và ánh sáng đỏ đã cải thiện đáng kể hiệu quả nhân chồi giống cây chanh dây tím [93]. Ngoài ra, Antoniazzi và cộng sự (2018) đã báo cáo về việc tạo và nhân giống cây chanh dây tím tam bội thành công từ nuôi cấy nội nhũ hạt [90]. Riêng đối với công tác tái sinh thực vật *in vitro*, kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL) và phát sinh phôi soma (SE) là hai kỹ thuật được sử dụng chủ yếu trên đối tượng cây trồng này.

1.4.2.1. Nghiên cứu tái sinh chồi dựa trên kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Kỹ thuật TCL được phát triển từ năm 1973 và trở thành một trong những kỹ thuật nhân giống đơn giản và hiệu quả hiện nay. Mẫu cây TCL bao gồm các mẫu cây có kích thước nhỏ, được thiết lập từ các cơ quan khác nhau của thực vật (thân, lá, các

cơ quan hoa, lá mầm, trụ lá mầm, phôi, v.v). Các mẫu cây TCL thường được cắt theo chiều dọc (lTCL, 1 mm × 0,5 - 10 mm) hoặc theo chiều ngang (tTCL, dày khoảng 0,2 - 0,5 mm hoặc vài mm). Các mẫu cây lTCL chỉ chứa một hoặc một vài loại mô, chẳng hạn như một lớp tế bào biểu bì hoặc dưới biểu bì, trong khi mẫu cây tTCL bao gồm nhiều tế bào từ các loại mô khác nhau.

Các phương pháp dựa trên các kỹ thuật TCL đã được phát triển và ứng dụng thành công cho nhiều loài thực vật để nhân giống *in vitro*, chuyển gen, sản xuất hạt nhân tạo, bảo quản lạnh và chọn lọc *in vitro*. Đối với lĩnh vực nuôi cấy mô thực vật, việc sử dụng kỹ thuật TCL có thể mang lại lợi ích theo nhiều phương diện như mô tả ở Hình 1.5. Vì vậy, tầm quan trọng của TCL trong công tác nuôi cấy mô và công nghệ sinh học thực vật ở hiện tại và trong tương lai là không thể phủ nhận.



Hình 1.5. Một số ưu điểm của kỹ thuật nuôi cấy TCL.

Khi sử dụng mẫu cây TCL, diện tích bề mặt của mẫu tiếp xúc với môi trường tương đối lớn hơn so với mẫu cây thông thường và việc vận chuyển các thành phần của môi trường hiệu quả hơn vì chúng có thể tiếp cận các tế bào tiềm năng của mẫu cây; điều này cho phép quá trình hình thành cơ quan hoặc phản ứng tạo phôi dễ dàng hơn so với các loại mẫu cây thông thường. Do đó, TCL được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy trong quá trình nhân giống *in vitro* của nhiều loài thực vật, cũng như cần thiết cho việc nhân giống và bảo tồn các loài thực vật có nguy cơ tuyệt chủng và các loài có giá trị thương mại cao [96]. Kỹ thuật TCL đã được ứng dụng trên nhiều loài

cây dược liệu như *Scutellaria ocmulgee* [99], *Withania coagulans* [100], *Panax vietnamensis* var. *langbianensis* [101]. Kỹ thuật này cũng được sử dụng trong tái sinh nhiều loài cây rau và cây ăn quả, chẳng hạn như *Rubus* spp. [102], *Ficus carica* [103], *Actinidia chinensis* Planch [104]. Kỹ thuật TCL đã được ứng dụng thành công trong vi nhân giống hơn 20 loài phong lan [105-108] và nhiều loài cây cảnh khác như *Lilium* [109], *Cattleya forbesii* Lindl [110], *Begonia* × *tuberhybrida* Voss [111], *Clivia miniata* Regel [112]. Ngoài ra, kỹ thuật này cũng mang lại tiềm năng tái sinh khả thi cho các mô khó tái sinh của cây hạt trần và cây rừng [113]. Ví dụ, một quy trình tạo phôi *in vitro* hiệu quả từ các mẫu cấy TCL có nguồn gốc từ phôi hợp tử của *Pinus patula* đã được báo cáo, vượt qua những hạn chế do sự không tương thích về tăng trưởng *in vitro* của loài cây này [114].

Đối với chanh dây tím, nhân giống *in vitro* chủ yếu dựa vào tái sinh chồi [115]. Quá trình tái sinh này đã được thực hiện thành công từ một số loại mô và cơ quan khác nhau, chẳng hạn như trụ lá mầm [80, 116], rễ [81], lá [87], nội nhũ [90] và đốt thân [93]. Trong đó, kỹ thuật TCL đóng vai trò quan trọng trong quá trình tái sinh chồi của chanh dây tím; tuy nhiên, nguồn mẫu TCL được sử dụng chủ yếu từ lá và lóng thân *in vitro* [89, 92, 96]. Đối với lóng thân *ex vitro*, Hiếu và cộng sự (2018) cũng báo cáo rằng các mẫu đoạn lóng chỉ tạo ra mô sẹo chứ không tạo chồi trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* [91]. Do đó, việc khảo sát sự tái sinh dựa trên các mẫu cấy TCL đối với các nguồn mẫu *ex vitro* sẽ góp phần cải thiện hiệu suất và tăng cường nguồn mẫu ban đầu cho quá trình sản xuất cây chanh dây tím *in vitro*.

1.4.2.2. Nghiên cứu phát sinh phôi soma

Phát sinh cơ quan là con đường chính cho hệ thống tái sinh *in vitro* của nhiều loài chanh dây [117]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự tái sinh cây chanh dây có thể thu được thông qua quá trình hình thành cơ quan từ các mô khác nhau [81, 87, 96, 118]. Mặt khác, tái sinh sinh dưỡng thông qua sự phát sinh SE đã được đề xuất để mang lại lợi thế so với phát sinh cơ quan về hiệu quả nhân giống và giảm sự hình thành các thể biến dị [119]. Tái sinh thực vật thông qua SE rất được mong đợi đối với vi nhân giống để cải thiện sự phát triển của cây con đồng nhất [120]. Bên cạnh đó, sự phát sinh SE đóng vai trò quan trọng trong nhân giống *in vitro* và bảo tồn nguồn gen của nhiều loài thực vật [115, 121]. Ngoài ra, sự phát sinh SE còn có một số ứng dụng

thiết yếu khác trong nhân giống cây trồng dựa trên các công cụ công nghệ sinh học [122]. Con đường tái tạo này cung cấp một nền tảng hiệu quả cho việc nhân giống cây trồng bằng các kỹ thuật di truyền như công nghệ chuyển gen, công cụ chỉnh sửa bộ gen [123], hoặc đa bội hóa nhân tạo [124]. Vì vậy, tái sinh thực vật thông qua sự phát sinh SE là một hướng nghiên cứu tiềm năng.

Sự phát sinh SE là sự chuyển đổi của các tế bào sinh dưỡng thành các cấu trúc lưỡng cực (sự phân hóa ở các cực đối diện của mô phân sinh chồi và rễ) [121]. Đó là sự biến đổi phức tạp của tế bào sinh dưỡng dưới tác động của nhiều yếu tố. Trong hệ thống tái sinh *in vitro*, thành phần môi trường, loại mẫu cây và kiểu gen thực vật được đề xuất là những yếu tố thiết yếu trong quy trình này [119, 125, 126]. Hơn nữa, SE có thể được hình thành theo con đường trực tiếp hoặc gián tiếp phụ thuộc đáng kể vào tín hiệu của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGR), đặc biệt là auxin và cytokinin [85, 127]. Ngoài ra, một số yếu tố có tác động tích cực đến sự cảm ứng và tăng sinh SE như AgNPs cũng đang được nghiên cứu trong nhiều quá trình tái sinh cây trồng [58, 124, 128]. Tuy nhiên, mỗi loài thực vật thường có phản ứng khác nhau đối với các nhân tố ảnh hưởng. Vì vậy, để có thể tái sinh cây thành công thông qua phát sinh SE, việc lựa chọn nguồn mẫu, chuẩn hóa loại và nồng độ PGR cũng như một số yếu tố tích cực khác là rất cần thiết.

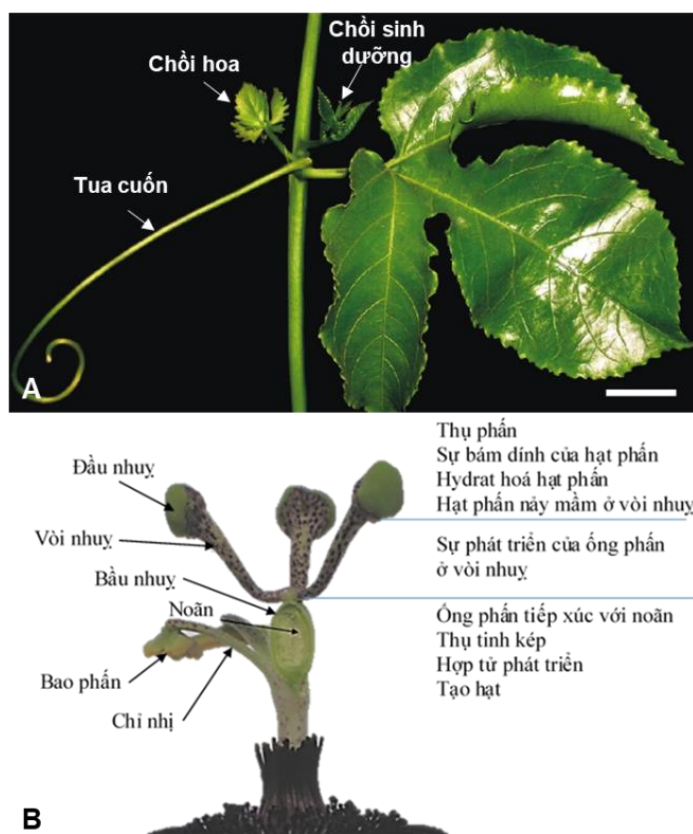
Đối với chanh dây tím, quá trình tạo cây con chủ yếu dựa trên cơ chế phát sinh cơ quan [115]. Sự tái sinh này đã được thực hiện thành công từ các loại mô và cơ quan khác nhau, chẳng hạn như trụ dưới lá mầm [80, 116], lá [87], rễ [81], đốt thân [93], và nội nhũ [90]. Ngược lại, hầu hết các hệ thống phát sinh SE đã được thiết lập đều sử dụng phôi hợp tử có nguồn gốc từ hạt trưởng thành làm mẫu cây [82, 85, 95]. Hub và cộng sự (2017) cũng quan sát thấy sự hình thành các mô giống như SE từ mô sẹo có nguồn gốc từ các mảnh lá. Tuy nhiên, sự hình thành các mô giống như SE chưa được mô tả rõ ràng về con đường cảm ứng cũng như hiệu quả tái sinh [87]. Do đó, tiềm năng của các mô thực vật khác đối với phát sinh SE ở loài cây trồng này vẫn chưa được biết rõ và cần được tiến hành nghiên cứu.

Nhìn chung, kỹ thuật nuôi cấy TCL và phát sinh SE là hai kỹ thuật mang lại hiệu quả tái sinh cao trên cây chanh dây tím. Do đó, đây là hai quá trình tái sinh tiềm năng để tạo nguồn mẫu số lượng lớn cho các thí nghiệm ra hoa và tạo quả *in vitro*.

1.4.3. Sự ra hoa và tạo quả trên cây chanh dây tím

1.4.3.1. Đặc điểm cấu trúc hoa

Các chồi hoa chanh dây tím hình thành dưới các nách lá tại các đốt. Mỗi đốt bao gồm một bông hoa duy nhất, bên cạnh một tua cuốn (Hình 1.6A). Dây dưa như là cấu tạo phổ biến được thiết lập ở loài này [129]. Hoa chanh dây tím là hoa lưỡng tính, mọc từ nách lá. Mỗi hoa mang 5 nhị đực với 5 chỉ dính nhau thành ống ở đáy và tách rời ở phần mang bao phấn. Hoa có 3 đầu nhụy sắp xếp trên 3 vòi nhụy nối liền với bầu nhụy (Hình 1.6B). Cây chanh dây chủ yếu tự thụ phấn, nhưng những loài thụ phấn như ong, chim ruồi, dơi có thể giúp tăng cường tỉ lệ đậu quả. Ở chanh dây tím, sự thụ phấn diễn ra vào buổi sáng [14].



Hình 1.6. Đặc điểm đốt thân chứa chồi hoa và cấu trúc hoa của cây chanh dây tím. **A.** Đặc điểm của đốt thân chứa chồi hoa (Thước: 2 cm) [129]. **B.** Mặt cắt hoa thể hiện các cơ quan của hoa và các sự kiện sau thụ phấn [130].

1.4.3.2. Hiện tượng tự bắt hợp

Sự thụ phấn và thụ tinh rất quan trọng đối với việc tạo quả trên cây chanh dây và mức độ đậu quả phụ thuộc vào hiệu quả của các quá trình này. Nhiều loài chanh

dây không đậu quả trừ khi hoa của chúng được thụ phấn từ một cây khác tương thích về mặt di truyền. Điều này tùy thuộc vào hai kiểu hiện tượng xuất hiện trên cây chanh dây là tự bất hợp (*Self - incompatibility*) và tự tương thích (*Self - compatibility*).

Khoảng 50% số loài thực vật hạt kín được báo cáo rằng có cơ chế tự bất hợp sinh hóa. Sự bất hợp sinh hóa dẫn đến việc hạt phấn và noãn của cùng một cá thể không thể tiến hành quá trình thụ tinh, cho dù hạt phấn được tạo ra trên cùng một hoa hay trên một hoa khác. Khi nghiên cứu về cơ chế này trên một số họ thực vật, cơ chế tự bất hợp này có thể do sự kiểm soát quá trình tự thụ tinh do một locus di truyền duy nhất, locus S. Vị trí S không đại diện cho một gen đơn lẻ, mà là một vùng liên kết chặt chẽ của nhiễm sắc thể chứa một số gen kiểm soát sự tự tương đồng. Locus S tồn tại ở nhiều dạng, được gọi là “haplotype” (thay vì allele, vì có nhiều gen, mặc dù thuật ngữ “allele S” cũng thường được sử dụng) [131]. Đặc tính tự bất hợp là một cơ chế di truyền ở thực vật hạt kín ngăn cản quá trình tự thụ. Do đặc tính này, các ống phấn phát triển chậm và thường bị giữ lại hoàn toàn trong vòi nhụy do một tổ hợp không tương thích. Những quan sát về siêu cấu trúc trong quá trình tương tác không tương thích cho thấy hệ thống màng của ống phấn bị hư hỏng, và quá trình thụ tinh không được quan sát hoặc bị trì hoãn đáng kể khi so sánh với tương tác tự tương thích. Cây chanh dây loại bỏ hạt phấn không tương thích được cho là do những thay đổi cấu trúc mạnh mẽ trong cả hạt phấn và ống phấn [132].

Tính tự bất hợp ở thực vật là cơ chế ngăn cản quá trình tự thụ tinh và thúc đẩy quá trình thụ tinh chéo, từ đó tăng cường sự đa dạng di truyền. Một số cá thể của loài tự bất hợp lại biểu hiện tính tự không tương thích một phần (partial self-incompatibility), nghĩa là chúng vẫn có khả năng tự thụ phấn nhưng số lượng hạt tạo ra khác nhau. Nhiều loại chanh dây vàng không đậu quả trừ khi hoa của chúng được thụ phấn từ một cây khác có gen tương thích. Cơ chế tự bất hợp này ở chanh dây tím khuyến khích sự thụ phấn chéo, trong đó phấn hoa được chuyển giữa hoa của các cây khác nhau. Sự thụ phấn chéo này thường được tạo điều kiện thuận lợi bởi các loài thụ phấn như ong, bướm hoặc chim ruồi. Việc thụ tinh chéo đảm bảo sự đa dạng di truyền ở thế hệ sau và góp phần vào khả năng thích ứng của quần thể thực vật. Ở một số giống chanh dây, bao gồm cả giống tím và vàng, mức độ tự bất hợp diễn ra không

hoàn toàn tùy thuộc vào từng giống và chúng có thể thay đổi bởi các yếu tố như nhiệt độ, tuổi cây, v.v.

1.4.3.3. Sự ra hoa và tạo quả

Trong điều kiện *in vitro*, hiện tượng ra hoa không phải là một hiện tượng phổ biến đối với chi *Passiflora* trong quá trình nuôi cấy. Theo các báo cáo hiện tại, sự ra hoa *in vitro* chỉ được ghi nhận trên cây *P. suberosa* [15]. Trong báo cáo này, cây *P. suberosa* được nuôi cấy trong vòng 21 ngày trên môi trường MS bổ sung 3% sucrose, glycine, vitamin và cytokinin đã ra hoa *in vitro*. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sự ra hoa *in vitro* phụ thuộc vào vị trí và nguồn gốc mẫu cây. Các mẫu lá và mẫu lóng chỉ ra hoa nếu chúng có nguồn gốc gần các ngọn; các mẫu cây có nguồn gốc dưới đốt thứ 5 chỉ tạo ra các chồi không ra hoa. Bên cạnh đó, hầu hết các hoa được hình thành *in vitro* đều thiếu nhị, chỉ một số hoa hoàn chỉnh được tạo ra. Nghiên cứu trên cũng cho thấy rằng các loài *P. caerulea*, *P. edulis* Sims., *P. foetida* và *P. trifasciata* chỉ tạo chồi nhưng không ra hoa khi được nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* tương tự [15].

Nhìn chung, trong lĩnh vực ra hoa *in vitro*, các nghiên cứu trên chi *Passiflora* còn rất hạn chế. Dựa trên các báo cáo ở thời điểm hiện tại, chưa có công bố nào được ghi nhận cho sự ra hoa *in vitro* đối với loài chanh dây tím (*P. edulis* Sims f. *edulis*), một trong những loài có giá trị thương mại cao trong chi này. Việc nghiên cứu ra hoa và tạo quả *in vitro* là một hướng nghiên cứu mới trên cây chanh dây tím. Vì vậy, nghiên cứu điều khiển ra hoa *in vitro* trên cây chanh dây tím là một hướng nghiên cứu cần thiết và có tính ứng dụng cao trên nhiều phương diện.

Mặt khác, không giống như một số loài thực vật có đặc điểm rõ ràng với quang kỳ, sự khởi đầu của quá trình ra hoa ở chanh dây không phụ thuộc lớn vào quang kỳ ngoài điều kiện tự nhiên. Giống chanh dây tím bắt đầu ra hoa và tạo quả sau khi trải qua giai đoạn non. Tuy nhiên, sự phát triển hoa bình thường đòi hỏi phải tiếp xúc liên tục với chu kỳ sáng dài. Đỉnh chồi liên tục tạo ra các đốt mới, mỗi đốt chứa một lá, tua cuốn và chồi hoa. Chanh dây tím hạn chế ra hoa ở các đốt phát triển trong điều kiện không thuận lợi bằng cách ngăn chặn sự phát triển của hoa thay vì kích thích ra hoa, và sử dụng những thay đổi theo mùa trong chu kỳ quang để xác định thời điểm ra hoa và tạo quả một cách chính xác [133]. Do đó, thời gian chiếu sáng dài có thể là một yêu cầu cần thiết trong quá trình nghiên cứu ra hoa *in vitro*.

Bên cạnh đó, PGR như các nhóm auxin, cytokinin, GAs, ABA thường được sử dụng để kích thích sự ra hoa *in vitro* ở nhiều loài thực vật. Ở cây chanh dây tím, các nhóm auxin và cytokinin ở nhiều loại và nồng độ khác nhau thường được sử dụng trong quá trình nuôi cấy các chồi nhằm mục đích nhân nhanh các chồi và tạo ra các rễ *in vitro* [134]. Tuy nhiên, chưa có báo cáo nào về sự ra hoa *in vitro* được ghi nhận đối với các nhóm chất này; do đó, các nhóm PGR khác như GAs và ABA là các yếu tố tiềm năng cần được xem xét đối với sự ra hoa *in vitro* ở đối tượng này. Đồng thời, nhóm chất có tác động tích cực đến quá trình ra hoa và tạo quả *in vitro* như PA, và nhóm các kim loại tác động đáng kể đến quá trình ra hoa được ghi nhận gần đây như bạc và coban, là những yếu tố tiềm năng cần được xem xét để khảo sát.

CHƯƠNG 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu được thực hiện theo các nội dung được thể hiện ở Hình 2.1, cụ thể với 2 nội dung chính như sau:

Nội dung 1: Nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây *in vitro* cây chanh dây tím

Mục đích: Tạo nguồn mẫu cây số lượng lớn phục vụ cho các thí nghiệm về sự ra hoa và bước đầu tạo quả *in vitro*.

Nội dung tiến hành:

Nghiên cứu tái sinh chồi từ các mẫu cây TCL từ lóng thân *ex vitro*

Nghiên cứu phát sinh phôi soma (SE) từ mẫu cây lá *ex vitro*

Nghiên cứu nhân nhanh nguồn mẫu cây chồi thích hợp

Nội dung 2: Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Mục đích: Xác định các ảnh hưởng của một số yếu tố như chất điều hoà sinh trưởng thực vật (PGR), một số muối và hạt nano kim loại, và polyamine (PA) đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*.

Nội dung tiến hành:

Khảo sát ảnh hưởng của PGR ngoại sinh đến quá trình ra hoa và tạo quả *in vitro*:

- *Khảo sát ảnh hưởng của GA₃ đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả in vitro*
- *Khảo sát ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả in vitro*

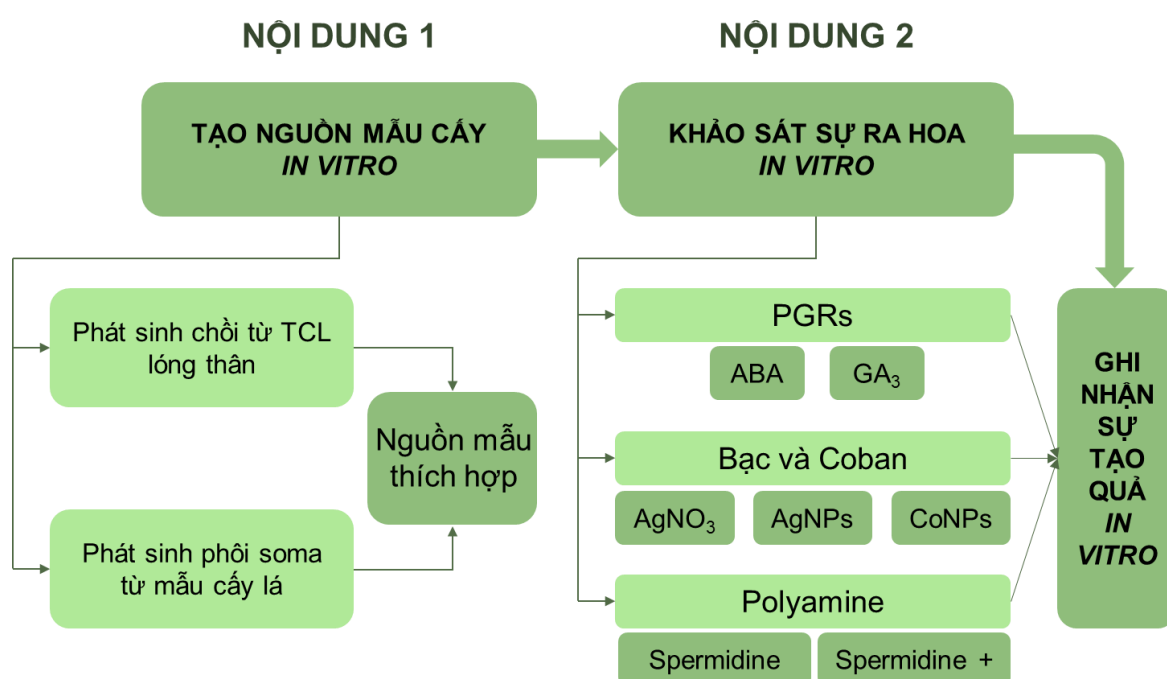
Khảo sát ảnh hưởng của bạc và coban đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*:

- *Khảo sát ảnh hưởng của AgNO₃ đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả in vitro*

- Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*
- Khảo sát ảnh hưởng của CoNPs đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Khảo sát ảnh hưởng của PA đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*:

- Khảo sát ảnh hưởng của spermidine (Spd) đơn lẻ đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*
- Khảo sát ảnh hưởng của Spd kết hợp đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*



Hình 2.1. Sơ đồ thể hiện khái quát các nội dung nghiên cứu.

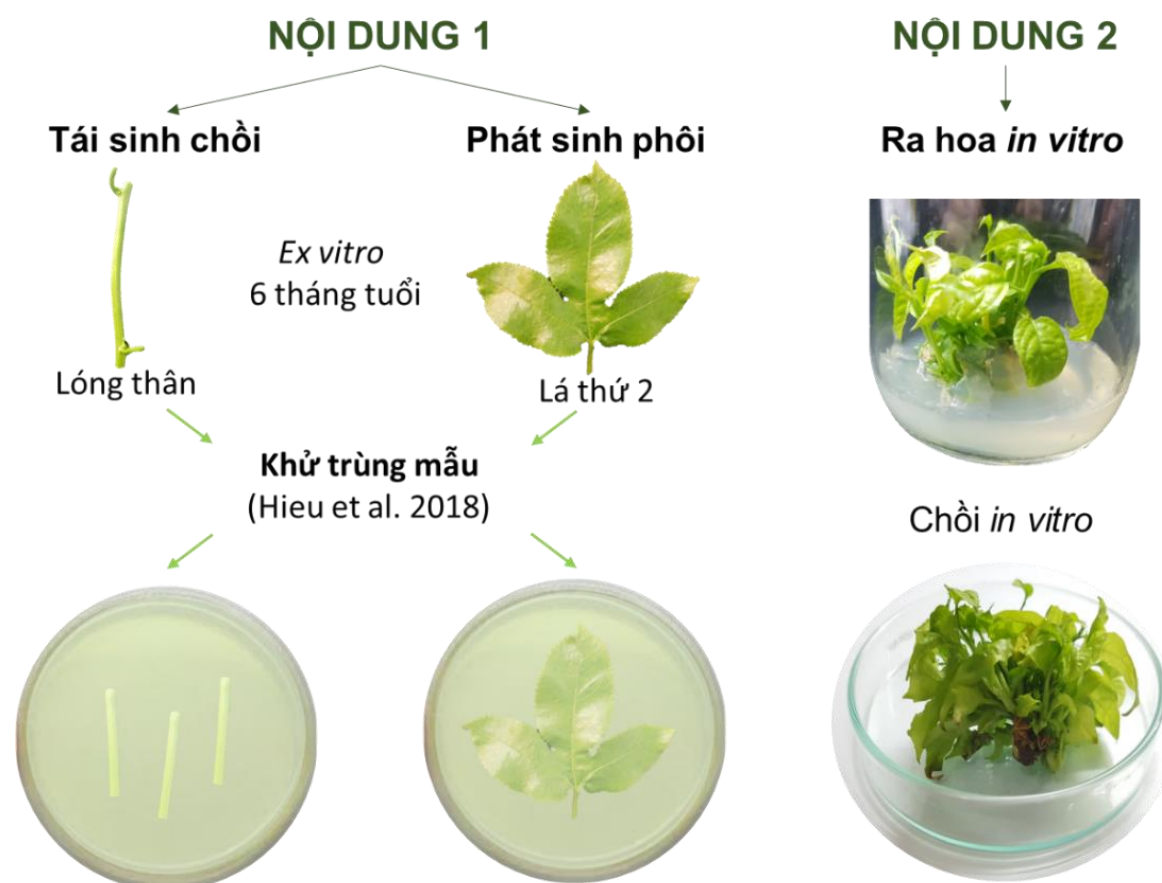
2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu thực vật

Trong nội dung 1, các mẫu lá và lóng thân của cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) 6 tháng tuổi, được lưu giữ tại vườn ươm Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên được sử dụng làm vật liệu ban đầu. Các nguồn mẫu này được khử trùng theo quy trình của Hieu và cộng sự (2018) [91]. Theo quy trình này, các mẫu lá và lóng thân (từ ngọn chồi) được thu thập từ các cây khỏe mạnh và được đặt dưới vòi nước chảy trong 10 phút. Tiếp theo, các mẫu này được khử trùng bằng ethanol (70%)

trong 30 giây rồi rửa lại bằng nước cất 3 lần. Sau đó, mẫu được khử trùng bằng dung dịch AgNPs (0,1%) trong 15 phút. Cuối cùng, các mẫu được rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng và nuôi cấy trong môi trường Murashige and Skoog (MS) [135] trong 7 ngày. Các mẫu cây không nhiễm vi khuẩn và nấm được thu nhận và được sử dụng để bố trí các thí nghiệm.

Trong nội dung 2, các ngọn chồi từ các chồi tái sinh của cây chanh dây tím *in vitro* trong môi trường thích hợp được sử dụng để bố trí các thí nghiệm ra hoa. Các nguồn vật liệu thực vật ban đầu được thể hiện sơ lược trong Hình 2.2. Các mẫu cây trong từng thí nghiệm được mô tả cụ thể trong phần Phương pháp nghiên cứu.



Hình 2.2. Các nguồn mẫu cây ban đầu của nghiên cứu.

2.2.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

Thiết bị và dụng cụ:

Một số thiết bị chính được sử dụng bao gồm: máy đo hàm lượng diệp lục SPAD-502 (Nhật Bản), tủ an toàn sinh học ESCO (Singapore), tủ sấy Sanyo MOV-112, tủ sấy Memmert, cân kỹ thuật Precisa (Nhật Bản), cân điện tử, thước cặp điện

tử Mitutoyo (Nhật bản), đèn UV hai bước sóng 254 nm và 365 nm, máy cất nước, máy đo pH, nồi hấp vô trùng. Các dụng cụ sử dụng bao gồm dao cắt, đĩa cấy, panh cấy, kéo, ống nghiệm thủy tinh, bình nuôi cấy 250 ml, màng lọc vô trùng, bơm tiêm 5 mL, dây thun, túi nilon chịu nhiệt, găng tay và một số dụng cụ hỗ trợ khác. Các dụng cụ chuyên dụng được khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong 30 phút.

Hóa chất:

Dung dịch các hạt nano bạc (AgNPs, 500 ppm) và dung dịch các hạt nano coban (CoNPs, 500 ppm) do Viện Công nghệ Môi trường (VAST) cung cấp. Dung dịch AgNPs (kích thước nhỏ hơn 20 nm) thu được theo tỉ lệ: $[AgNO_3] = 750 - 1000$ ppm, $[\beta\text{-chitosan}] = 250 - 300$ ppm, $[NaBH_4] = 200$ ppm, tỉ lệ mol $[NaBH_4]/[AgNO_3] = 1/4$, tốc độ nhỏ giọt của $NaBH_4$ là 10 - 12 giọt/phút [136]. Dung dịch CoNPs (20 - 60 nm) thu được dựa trên chất khử $NaBH_4$ và chất ổn định carboxymethyl cellulose [137].

Các PGR bao gồm: Axit 1-Naphthaleneacetic (NAA, > 98%, Duchefa Biochemie, Hà Lan), axit 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D, > 96%, Duchefa Biochemie, Hà Lan), 6-Benzyladenine (BA, Sigma-Aldrich, Mỹ), *meta*-Topoline (mT, > 99%, Duchefa Biochemie, Hà Lan), axit gibberellic A3 (GA_3 , $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich, Mỹ), axit abscisic (ABA, $\geq 99,5\%$), Các chất khác bao gồm spermidine (Spd, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich, Mỹ), bạc nitrate ($AgNO_3$, 99,99%, Sigma-Aldrich, Mỹ), agar (Việt Xô, Việt Nam), sucrose (Biên Hòa, Việt Nam).

2.2.3. Môi trường nuôi cấy

Môi trường Murashige and Skoog (MS) [135] bổ sung 30 g/L sucrose và 8 g/L agar được sử dụng làm môi trường nuôi cấy cơ bản trong nghiên cứu này. Các PGR hoặc các chất khác được thêm vào môi trường MS tùy thuộc vào từng thí nghiệm cụ thể được mô tả trong mục Phương pháp nghiên cứu. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh đến pH = 5,8 trước khi được hấp tiệt trùng trong vòng 30 phút ở 121°C (1 atm). Các môi trường bổ sung GA_3 hoặc Spd được bổ sung lạnh vào môi trường nuôi cấy (đã hấp khử trùng) sau khi được vô trùng thông qua màng lọc vô trùng (0,22 μ m, Sigma-Aldrich, Mỹ).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.3.1.1. Nội dung 1: Nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây *in vitro* cây chanh dây tím

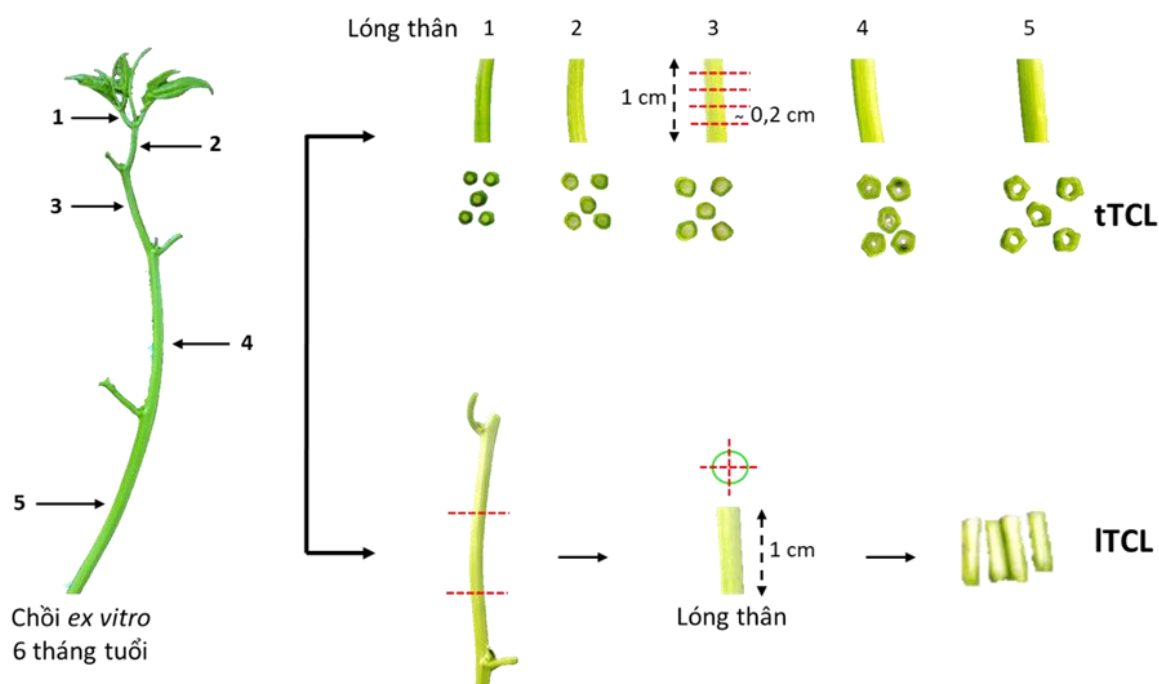
- *Thí nghiệm 1*: Nghiên cứu tái sinh chồi từ các mẫu cây TCL từ lóng thân *ex vitro*

Thí nghiệm 1.1. Khảo sát ảnh hưởng của vị trí lóng thân đến sự cảm ứng chồi

Mục đích: Tìm ra vị trí lóng thân thích hợp cho sự cảm ứng chồi *in vitro* từ các mẫu cây tTCL.

Phương pháp tiến hành:

Các đoạn lóng thân *ex vitro* (1 cm) ở vị trí lóng thứ 1 đến thứ 5 (tính từ ngọn chồi) được cắt theo chiều ngang với độ dày khoảng 0,2 cm để tạo ra các mẫu cây tTCL như mô tả ở Hình 2.3. Các mẫu cây tTCL được tiến hành nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung kết hợp 1,5 mg/L BA và 1,0 mg/L NAA [138] để so sánh tỉ lệ cảm ứng chồi tại các vị trí lóng khác nhau. Tỉ lệ cảm ứng chồi (%) được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy.



Hình 2.3. Thiết lập các mẫu cây tTCL và ITCL từ lóng thân *ex vitro*.

Thí nghiệm 1.2. Khảo sát sự cảm ứng chồi từ các loại mẫu cây TCL lóng thân

Mục đích: So sánh hiệu quả cảm ứng chồi *in vitro* của mẫu cây tTCL và ITCL tại vị trí lóng thân thích hợp.

Phương pháp tiến hành:

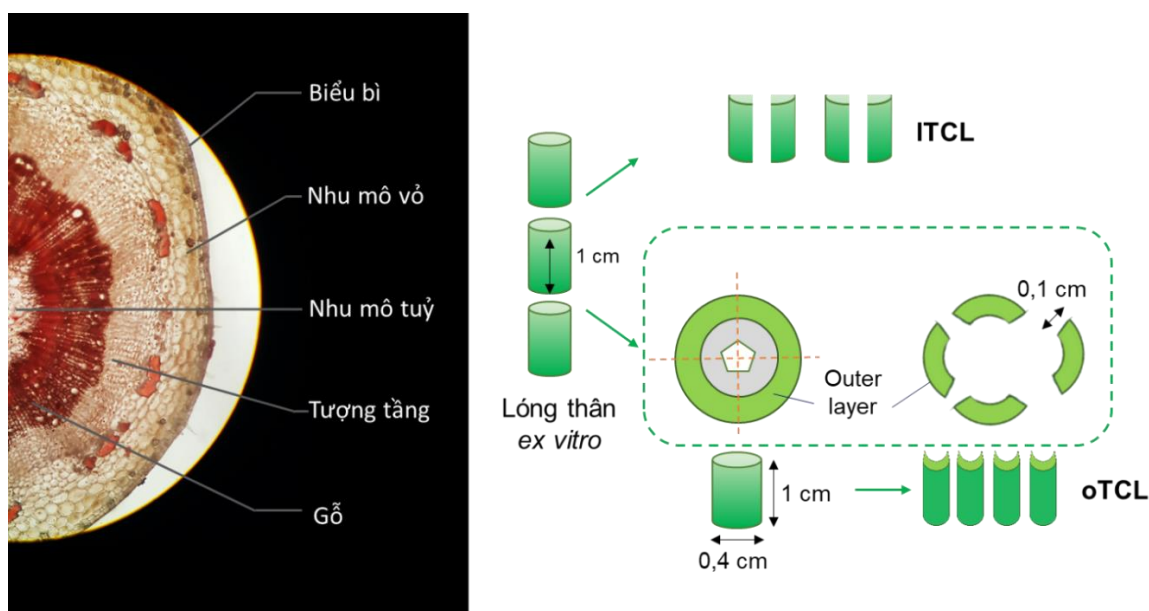
Trong thí nghiệm này, các đoạn lóng thân *ex vitro* ở vị trí lóng cho sự cảm ứng chồi tối ưu (khảo sát ở thí nghiệm phía trên) được sử dụng làm nguồn mẫu cây. Các đoạn lóng thân (1 cm) được cắt ngang thành 5 mẫu tTCL hoặc cắt dọc thành 4 mẫu ITCL như mô tả ở Hình 2.3. Các mẫu cây được nuôi cấy trong môi trường tương tự như thí nghiệm 1.1 để so sánh hiệu quả cảm ứng chồi giữa hai loại mẫu cây. Các chỉ tiêu về tỉ lệ cảm ứng chồi (%) và số chồi (lớn hơn 0,5 cm)/mẫu được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm 1.3. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi từ mẫu cây TCL

Mục đích: Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs đến quá trình tái sinh chồi từ mẫu cây ITCL và oTCL lóng thân.

Phương pháp tiến hành:

Tương tự như thiết lập mẫu cây ITCL, các đoạn lóng thân có chiều dài khoảng 1 cm và đường kính khoảng 0,4 cm được cắt dọc thành 4 mẫu, tiến hành loại bỏ phần bên trong của mẫu và chỉ giữ lại các lớp tế bào bên ngoài (độ dày khoảng 0,1 cm) để tạo thành các mẫu cây oTCL (Hình 2.4). Sau đó, mặt dưới (phần vết thương) của mẫu cây oTCL được đặt tiếp xúc với bề mặt của môi trường nuôi cấy. Các mẫu cây ITCL và oTCL được nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA; 1,0 mg/L NAA [138] và các nồng độ AgNPs (0; 1,0; 3,0; 5,0 và 7,0 mg/L) để khảo sát hiệu quả cảm ứng chồi từ hai nguồn mẫu cây này. Các chỉ tiêu về tỉ lệ cảm ứng chồi (%) và số chồi/mẫu được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy.



Hình 2.4. Sơ đồ thiết lập mẫu cây ITCL và oTCL từ lóng thân *ex vitro*.

- **Thí nghiệm 2:** Nghiên cứu phát sinh phôi soma (SE) từ mẫu cây lá *ex vitro*

Thí nghiệm 2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và NAA đến sự phát sinh SE

Mục đích: Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D và NAA đến sự phát sinh SE từ mẫu cây lá.

Phương pháp tiến hành:

Mẫu cây từ lá *ex vitro* ($1,0 \times 1,0$ cm) được sử dụng làm mẫu cấy ban đầu. Trong thí nghiệm này, các mẫu cấy được nuôi cấy trong môi trường MS được bổ sung 2,4-D (0; 1,0; 2,0; 3,0 và 4,0 mg/L) hoặc NAA (0; 1,0; 2,0; 3,0 và 4,0 mg/L) để khảo sát sự cảm ứng SE. Mỗi nghiệm thức (NT) được tiến hành với 30 bình nuôi cấy, với 3 mẫu mỗi bình. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỉ lệ cảm ứng SE (%) và số phôi/mẫu được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm 2.2. Ảnh hưởng của auxin kết hợp với AgNPs đến sự phát sinh SE

Mục đích: Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs trong môi trường chứa auxin đến sự phát sinh SE từ mẫu cây lá.

Phương pháp tiến hành:

Để nghiên cứu tác động của AgNPs đối với sự phát sinh SE, các mẫu lá (1×1 cm) được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung loại và nồng độ auxin thích hợp (được nghiên cứu ở thí nghiệm phía trước) và bổ sung AgNPs ở các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0 mg/L). Mỗi NT được tiến hành với 30 bình nuôi cấy, với 1 mẫu cấy mỗi bình. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỉ lệ cảm ứng SE (%) và

số phôi/mẫu được ghi nhận sau 75 ngày nuôi cấy, chỉ tiêu số cây con/mẫu được thu nhận sau 90 ngày nuôi cấy.

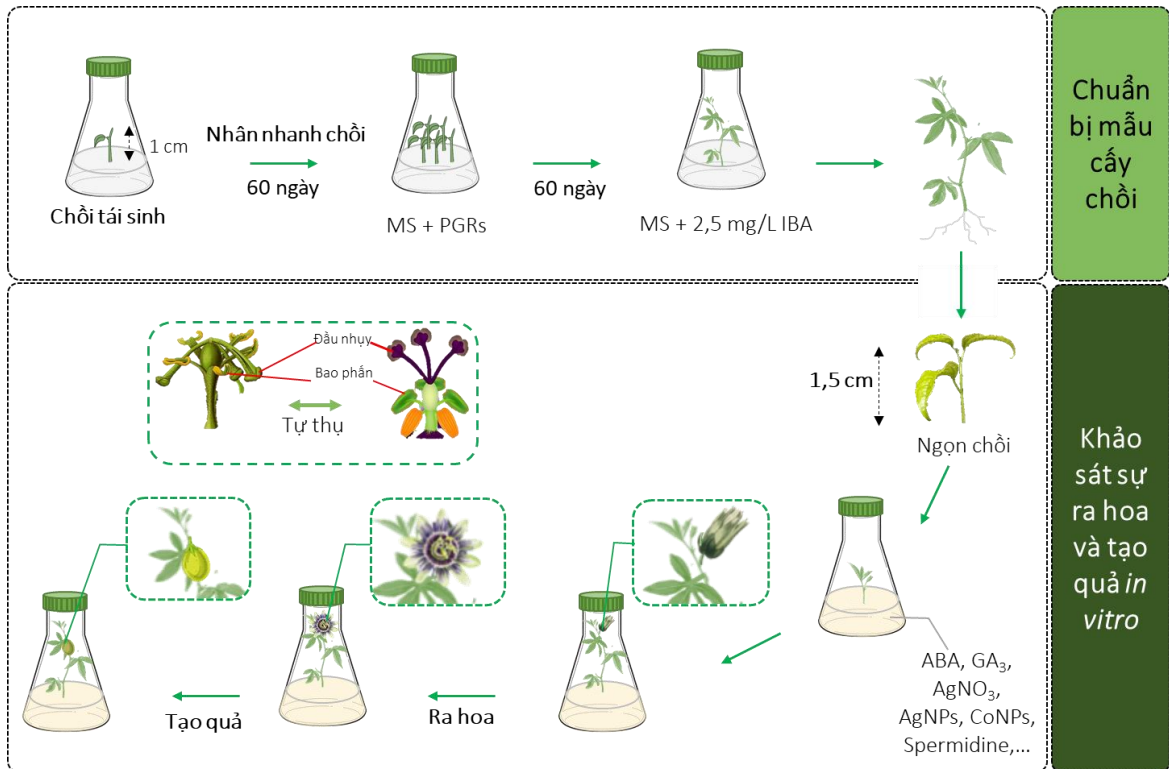
- *Thí nghiệm 3*: Nghiên cứu nhân nhanh nguồn mẫu cây chồi thích hợp

Tiếp theo, các chồi tái sinh từ nguồn mẫu cây ở NT tối ưu được khảo sát ở các thí nghiệm trước được chọn và được chuyển sang môi trường nuôi cấy để tiến hành nhân nhanh chồi. Các chồi có chiều dài khoảng 1 cm được thu nhận và nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung cố định 1,0 mg/L *meta*-Topolin (mT) [93] và AgNPs ở các nồng độ khác nhau (0; 1,0; 3,0; 5,0 và 7,0 mg/L). Mỗi NT được bố trí 30 bình nuôi cấy (mỗi bình 1 chồi). Các chỉ tiêu về tỉ lệ cảm ứng chồi (%), số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), và chỉ số SPAD được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy.

2.3.1.2. Nội dung 2: Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy in vitro

Mục đích: Xác định các ảnh hưởng của một số yếu tố như chất điều hoà sinh trưởng thực vật (PGR), một số muối và hạt nano kim loại, và polyamine (PA) đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*.

Vật liệu thí nghiệm: Chồi chanh dây (từ quá trình tái sinh thích hợp được khảo sát phía trên) được nhân lên trong môi trường tối ưu được khảo sát ở Nội dung 1. Các chồi sau khi tái sinh được chuyển sang môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L IBA [138] để kích thích tạo rễ trong vòng 60 ngày. Ngọn chồi (từ các chồi đã hình thành rễ) với chiều cao khoảng 1,5 cm (bao gồm 1 ngọn và 3 lá) được sử dụng làm nguồn mẫu cây cho các thí nghiệm ra hoa và tạo quả *in vitro* (Hình 2.5).



Hình 2.5. Sơ đồ mô tả các giai đoạn bố trí thí nghiệm nghiên cứu sự ra hoa *in vitro* của cây chanh dây tím.

- Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của PGR ngoại sinh đến quá trình ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 1.1. Khảo sát ảnh hưởng của GA_3 đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Phương pháp tiến hành: Chồi chanh dây *in vitro* cao khoảng 1,5 cm được chuyển sang môi trường MS cơ bản chứa 30 g/L sucrose và 8 g/L agar và bổ sung các nồng độ GA_3 (0; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg/L). Sau khi môi trường MS cơ bản được hấp khử trùng, GA_3 sẽ được lọc qua màng lọc khử trùng và bổ sung lạnh vào môi trường nuôi cấy trong tủ cấy vô trùng. Các chỉ tiêu liên quan đến quá trình sinh trưởng và ra hoa (được trình bày phía sau) được theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm 1.2. Khảo sát ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Phương pháp tiến hành: Chồi chanh dây *in vitro* cao khoảng 1,5 được chuyển sang môi trường MS cơ bản chứa 30 g/L sucrose và 8 g/L agar và bổ sung ABA ở

các nồng độ khác nhau (0; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg/L). Các chỉ tiêu liên quan đến quá trình sinh trưởng và ra hoa được theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy.

- Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của bạc và coban đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Mục đích:

Thí nghiệm 2.1. Khảo sát ảnh hưởng của AgNO_3 đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Phương pháp tiến hành: Các ngọn chồi có chiều dài khoảng 1,5 cm được nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar và bổ sung AgNO_3 (0; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; và 9,0 mg/L) tại các nồng độ khác nhau để khảo sát sự ra hoa *in vitro*. Các chỉ tiêu liên quan đến quá trình sinh trưởng và ra hoa được theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm 2.2. Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Phương pháp tiến hành: Các ngọn chồi có chiều dài khoảng 1,5 cm được nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản có bổ sung AgNPs ở các nồng độ khác nhau (0; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; và 9,0 mg/L). Các NT không bổ sung AgNPs được sử dụng làm đối chứng. Các chỉ tiêu liên quan đến quá trình sinh trưởng và ra hoa được theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm 2.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của CoNPs đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Phương pháp tiến hành: Các ngọn chồi có chiều dài khoảng 1,5 cm được chuyển sang môi trường MS cơ bản hoặc MS loại bỏ thành phần muối CoCl_2 , có chứa 30 g/L sucrose và 8 g/L agar và bổ sung CoNPs ở các nồng độ khác nhau (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 và 0,5 mg/L) để khảo sát sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*. Các chỉ tiêu liên quan đến quá trình sinh trưởng và ra hoa được theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy.

- Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của polyamine đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 3.1. Khảo sát ảnh hưởng của spermidine (Spd) đơn lẻ đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Phương pháp tiến hành: Các chồi ngọn chanh dây *in vitro* cao khoảng 1,5 cm được chuyển sang môi trường MS bổ sung các nồng độ Spd (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 mM) để khảo sát sự ra hoa *in vitro*. Sau khi môi trường MS cơ bản được hấp khử trùng, Spd sẽ được lọc qua màng lọc khử trùng và bổ sung lạnh vào môi trường nuôi cấy trong tủ cấy vô trùng. Các chỉ tiêu liên quan đến quá trình sinh trưởng và ra hoa được theo dõi sau 90 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm 3.2. Khảo sát ảnh hưởng của spermidine kết hợp đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Phương pháp tiến hành: Tương tự với thí nghiệm trước, các chồi ngọn chanh dây *in vitro* cao khoảng 1,5 cm được nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung các nồng độ Spd (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 mM) kết hợp với các yếu tố thích hợp được khảo sát ở thí nghiệm phía trên để tăng cường sự ra hoa *in vitro*. Các chỉ tiêu liên quan đến quá trình sinh trưởng và ra hoa được theo dõi sau 90 ngày nuôi cấy.

- Theo dõi sự ra hoa và tạo quả *in vitro*:

Sự tạo quả của tất cả các thí nghiệm ở phía trên được ghi nhận cùng với sự ra hoa trên môi trường bổ sung các chất tương ứng. Bố trí và ghi nhận các chỉ tiêu ra hoa và tạo quả *in vitro* được tiến hành như sau:

Đối với các thí nghiệm ra hoa: Mỗi bình cấy 1 mẫu chồi. Mỗi NT được tiến hành với 60 bình nuôi cấy và lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, chỉ số SPAD, tỉ lệ ra hoa (%), số nụ hoa/mẫu, tỉ lệ nở hoa (%), đường kính hoa (cm).

Theo dõi và ghi nhận sự tạo quả đối với các chồi trong các NT có sự hình thành hoa *in vitro*. Các chỉ tiêu được ghi nhận bao gồm tỉ lệ tạo quả (%), số quả/chồi và đường kính quả (cm). Thời gian ghi nhận tạo quả *in vitro* tùy thuộc vào thời gian cụ thể của từng thí nghiệm.

Đặc điểm ra hoa và tạo quả trong quá trình này được giải phẫu và quan sát theo các giai đoạn phát triển. Các đặc điểm ra hoa và tạo quả của cây chanh dây tím 2 năm tuổi ngoài tự nhiên được dùng để so sánh với các cây trong điều kiện *in vitro*.

2.3.2. Một số phương pháp và kỹ thuật dùng trong nghiên cứu

2.3.2.1. Thu nhận và đánh giá một số chỉ tiêu theo dõi trong đề tài

Đo chỉ số SPAD ở lá: Chỉ số SPAD được đo bằng máy SPAD-502 (Nhật Bản). Mỗi chồi được đo ở 3 lá mở đầu tiên tính từ ngọn và được tính trung bình.

Chiều cao chồi trung bình = \sum Chiều cao chồi / \sum Số chồi.

Tỉ lệ ra hoa (%) = \sum Số chồi ra hoa / \sum Số chồi.

Số nụ hoa trung bình/chồi = \sum Số nụ hoa / \sum Số chồi ra hoa.

Tỉ lệ hoa nở = \sum Số hoa nở / \sum Số nụ hoa.

Tỉ lệ tạo quả = \sum Số chồi tạo quả / \sum Số chồi ra hoa.

Số quả/chồi = \sum Số quả / \sum Số chồi ra hoa.

2.3.2.2. Định lượng hormone nội sinh

Việc phân tích hormone nội sinh được thực hiện bằng phương pháp Phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Quy trình thực hiện như sau: Cân một khối lượng chính xác mẫu tươi sau đó nghiền nhỏ trong hỗn hợp dung môi gồm $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ (25/60/5/10, v/v) theo tỉ lệ 1 mL dung môi cho 0,1 g mẫu. Sau đó hỗn hợp được chiết ở -30°C trong 2 - 4 giờ (Mẫu được chia làm 2 phần, một phần giữ nguyên mẫu và 1 phần bổ sung nội chuẩn có nồng độ xác định). Lấy hỗn hợp mẫu ly tâm lạnh ở 4°C , thu phần phía trên. Phần còn lại được chiết tiếp với 4 mL MeOH ở -4°C trong 1 giờ, lặp lại 2 lần. Toàn bộ dung dịch thu được chiết qua cột chiết pha rắn SPE-C18. Cột chiết SPE được rửa giải với dung môi MeOH. Dung dịch thu được đem cô quay ở áp suất chân không, nhiệt độ 50°C để loại dung môi và hoàn nguyên với 1 - 2 mL nước có pH = 2 (điều chỉnh bằng axit formic). Lọc qua màng lọc 0,45 μm , rồi bơm vào hệ thống HPLC.

Hệ thống máy HPLC Thermo-Ultimate 3000, cột C18 (dài 25 cm, đường kính hạt 0,5 μm), đầu dò UV ở bước sóng 280 nm. Hệ dung môi pha động: (A): ACN, (B):

H₂O chứa 0,5% HCOOH với chế độ chạy gradient như sau: từ 0-10 phút A/B = 75/25, từ 11-17 phút A/B= 50/50, từ 18 – 25 phút A/B= 75/25.

Hàm lượng GA₃, ABA và Melatonin của chồi được xác định bằng phương pháp HPLC sau 60 ngày nuôi cấy. Mẫu chồi nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản được sử dụng làm đối chứng. Các phân tích được tiến hành tại Viện Công nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại Học Tây Nguyên.

2.3.2.3. Định lượng Ethylene

Phương pháp sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa được sử dụng để định lượng khí ETH tích lũy trong bình sau 60 ngày nuôi cấy đối với các NT ra hoa có bổ sung AgNPs và CoNPs. Hàm lượng khí ETH trong bình nuôi cấy mẫu chồi trong môi trường MS cơ bản được sử dụng làm đối chứng. Đối với các thí nghiệm có định lượng khí ethylene, miệng của bình nuôi cấy được bịt kín với nhiều lớp paraffin để tránh không khí thoát ra bên ngoài. Quy trình tổng quát như sau: Dùng bơm tiêm thu nhận 1 cm³ khí từ bình nuôi cấy. Lượng khí thu nhận được đưa vào hệ thống sắc ký khí GC-CP 3380. Cột thép không gỉ (3 m × 1,5 mm) chứa đầy chất hấp phụ (Porapak R) có kích thước hạt 80 - 100 Mesh được sử dụng. Khí nitơ được sử dụng làm khí mang (55 cm³/phút) [139]. Mẫu chồi nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản được sử dụng làm đối chứng. Các phân tích được tiến hành tại Viện Cây ăn quả miền Nam.

2.3.2.4. Quan sát hình thái giải phẫu

Những biến đổi tế bào học trong quá trình tạo chồi và tạo hoa *in vitro* được theo dõi bằng phương pháp giải phẫu. Các lát mỏng (40 - 50 μm) của mẫu cấy được tẩy trắng trong dung dịch natri hypoclorit (15%) trong 5 phút. Tiếp theo, mẫu được ngâm trong dung dịch axit acetic (10%) trong 10 phút. Mô được nhuộm bằng màu đỏ carmine hoặc tím violet trong vòng 5 phút. Cuối cùng, chúng được tráng lại bằng nước cất, đặt trên lam kính và phủ lamén. Việc quan sát mẫu được tiến hành trên kính hiển vi quang học với thị kính 10×, và vật kính 10× và 40× [134].

2.3.2.5. Phân tích và xử lý số liệu

Các NT được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD - Completely Randomized Design), mỗi NT được lặp lại 3 lần. Số liệu trung bình được phân tích bằng phần mềm thống kê SPSS 26.0 với các phép thử phù hợp với từng thí nghiệm ở

mức ý nghĩa $p < 0,05$. Sử dụng phần mềm Microsoft excel 2019 để vẽ đồ thị và biểu diễn các kết quả thống kê. Các biểu đồ thể hiện số liệu của các trung bình và thanh sai số được vẽ dựa trên độ lệch chuẩn của các từng nghiệm thức.

2.3.3. Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được tiến hành ở phòng nuôi cấy tại phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng - Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên. Phòng nuôi cấy với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 55 - 60%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày (dùng đèn huỳnh quang cường độ $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) được sử dụng cho tất cả các giai đoạn nuôi cấy.

2.3.4. Địa điểm và thời gian thực hiện luận án

Các thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (116, Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường 7, Thành phố Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng).

Thời gian thực hiện luận án từ 2020 - 2024.

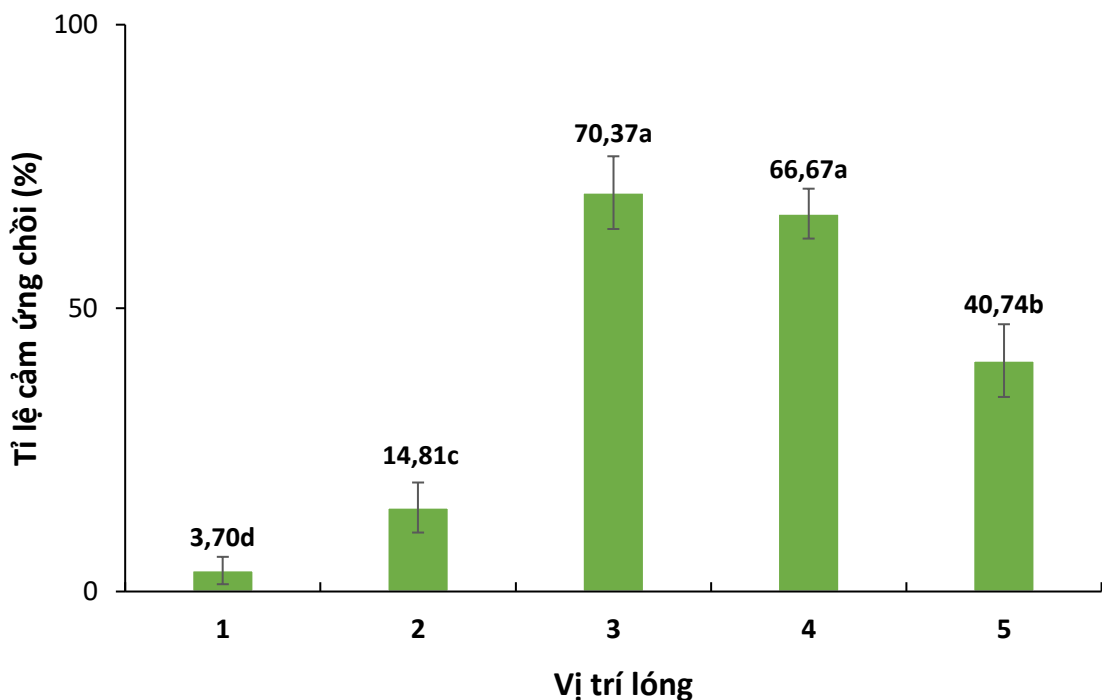
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nội dung 1: Nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây *in vitro* cây chanh dây tím

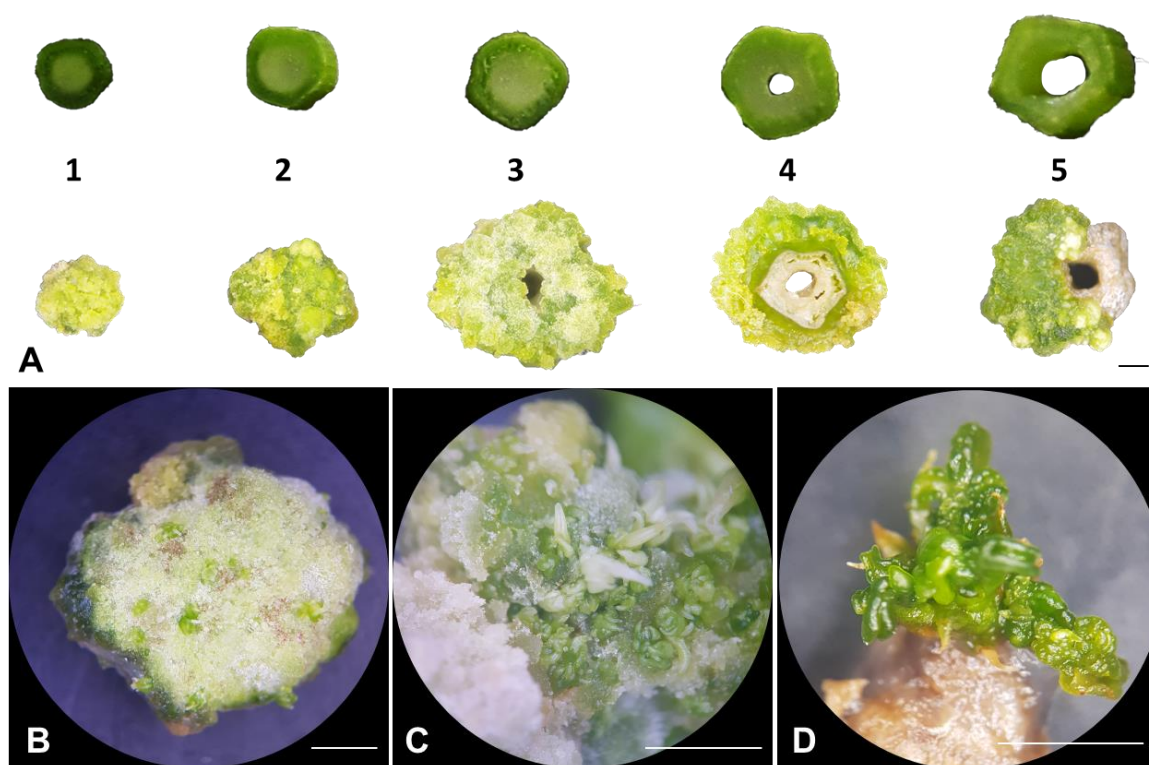
3.1.1. Nghiên cứu tái sinh chồi từ các mẫu cây TCL lóng thân *ex vitro*

3.1.1.1. Ảnh hưởng của vị trí lóng thân đến sự cảm ứng chồi từ mẫu cây tTCL

Kết quả cho thấy rằng, các vị trí lóng khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến sự phát sinh chồi của các mẫu cây tTCL (Hình 3.1 và 3.2). Sau 30 ngày nuôi cấy, hầu hết các mẫu cây tTCL đều ghi nhận sự hình thành của mô sẹo. Tuy nhiên, sự cảm ứng mô sẹo bị hạn chế ở vùng lõi của mẫu cây tại vị trí lóng thân thứ 4 và 5 đã được ghi nhận (Hình 3.2A). Sau 60 ngày nuôi cấy, tỉ lệ cảm ứng chồi cao nhất (70,37% và 66,67%) được ghi nhận lần lượt tại các mẫu cây tại vị trí lóng thứ 3 và thứ 4. Các chồi của mẫu cây ở vị trí lóng thứ 5 hình thành rõ ràng hơn ở vị trí 3; tuy nhiên, tỉ lệ cảm ứng chồi được ghi nhận thấp hơn đáng kể (40,74%) (Hình 3.1 và 3.2B-D).



Hình 3.1. Tỉ lệ cảm ứng chồi của mẫu cây tTCL từ các lóng thân *ex vitro* tại vị trí từ 1 đến 5 tính từ ngọn sau 60 ngày nuôi cấy.



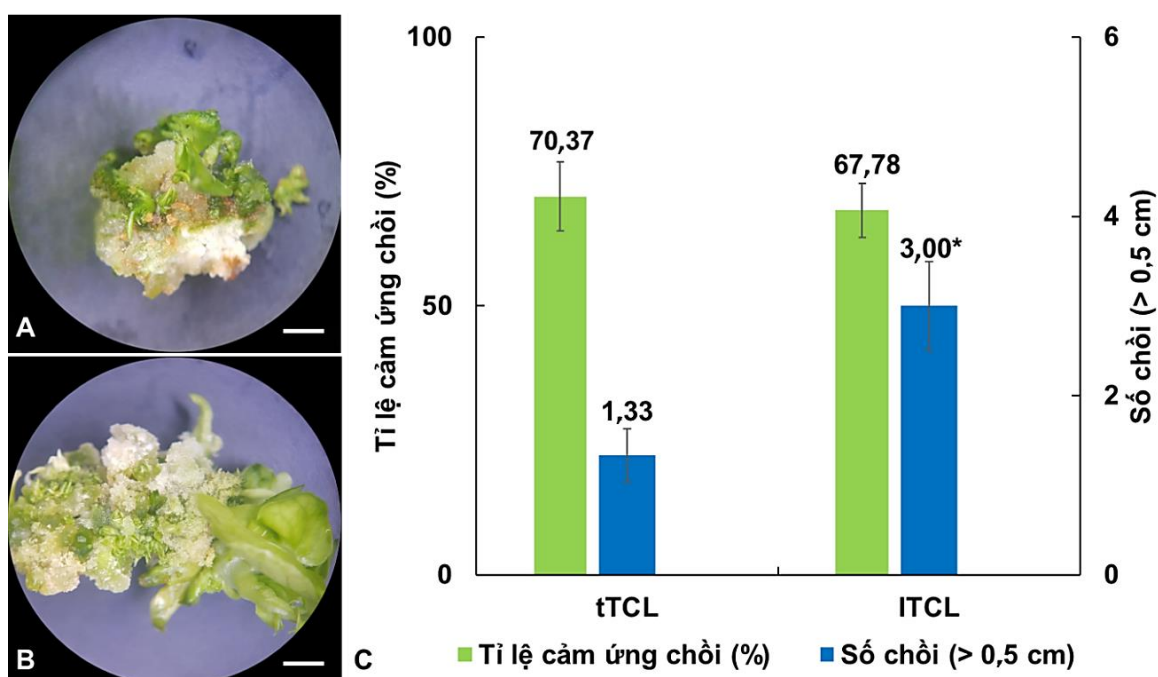
Hình 3.2. Sự cảm ứng chồi của mẫu cây tTCL từ các lóng thân *ex vitro*. **A.** Mẫu cây tTCL tại các vị trí lóng từ 1 đến 5 sau 30 ngày nuôi cấy. **B, C, D.** Chồi hình thành từ mẫu cây tTCL tại vị trí 2, 3 và 5 sau 60 ngày nuôi cấy. (Thước: 1 mm).

Vị trí của mẫu cây có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tái sinh chồi trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Điều này có thể liên quan đến sự khác biệt về độ trưởng thành của tế bào và hàm lượng hormone nội sinh của các lóng, dẫn đến sự đáp ứng khác nhau với môi trường cảm ứng của mẫu cây. Trên cây *Sesamum indicum*, các tác giả cũng chỉ ra rằng những mẫu cây tTCL từ vị trí các lóng gần ngọn và gần gốc cho hiệu quả tái sinh chồi thấp hơn các vị trí khác [140]. Trên cây chanh dây vàng, mẫu cây ITCL lóng thân *in vitro* từ vị trí đốt thứ 3 cũng được ghi nhận cho hiệu quả tái sinh chồi cao nhất [134]. Đối với mẫu cây ITCL đoạn thân *in vitro* ở chanh dây tím, hiệu quả phát sinh chồi tối ưu cũng được thu nhận ở vị trí đốt thứ 3 [92].

Tương tự với các nghiên cứu trước, các kết quả trong thí nghiệm hiện tại chỉ ra rằng mẫu cây ở vị trí lóng thứ 3 thích hợp cho quá trình phát sinh chồi hơn so với các vị trí khác từ nguồn mẫu *ex vitro* ở chanh dây tím. Vì vậy, các lóng thân ở vị trí này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.1.2. Sự cảm ứng chồi của mẫu cây tTCL và ITCL từ lóng thân

Sau khi xác định được mẫu cây ở vị trí lóng thứ 3 thích hợp cho quá trình phát sinh chồi, hiệu quả phát sinh chồi từ hai loại mẫu cây tTCL và ITCL từ vị trí lóng thân này được khảo sát trong cùng một điều kiện nuôi cấy. Kết quả cho thấy rằng, tỉ lệ cảm ứng chồi ở hai loại mẫu cây tTCL và ITCL khác biệt không đáng kể (70,37% và 67,78%, tương ứng). Tuy nhiên, số chồi trung bình hình thành ở mẫu cây ITCL (3,00 chồi/mẫu) cao hơn đáng kể so với mẫu cây tTCL (1,33 chồi/mẫu) sau 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.3).



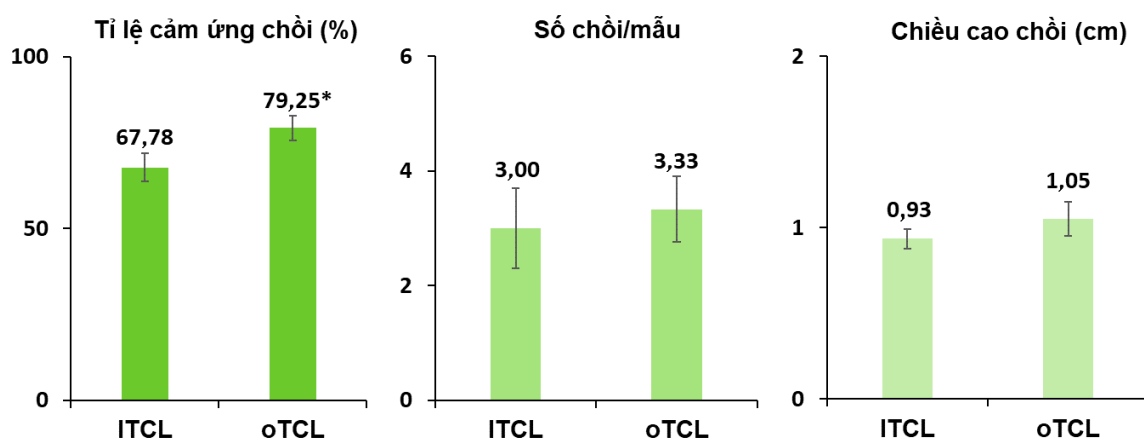
Hình 3.3. Sự cảm ứng chồi của các mẫu cây TCL từ lóng thân *ex vitro* sau 60 ngày nuôi cấy. **A, B.** Chồi hình thành từ mẫu cây tTCL và ITCL (Thước: 1 mm). **C.** So sánh tỉ lệ cảm ứng chồi và số chồi giữa mẫu cây tTCL và ITCL. (*Thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$).

Quá trình tái sinh chồi là một quá trình phức tạp, chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau. Trong đó, loại mẫu cây (bao gồm cả độ tuổi, kích thước và hình dạng của mẫu cây) là một trong những yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến quá trình này. Trong thí nghiệm hiện tại, mẫu cây ITCL cho số lượng chồi tái sinh cao hơn so với mẫu cây tTCL ở cây chanh dây tím. Hieu và cộng sự (2021) cũng đã báo cáo rằng các mẫu cây tTCL (dày 1 mm) từ đoạn thân *in vitro* của cây *Passiflora edulis* 'Monte Alegre' không đáp ứng lại với môi trường và hóa nâu sau 60 ngày nuôi cấy; trong khi

mẫu cây ITCL cho cảm ứng tái sinh chồi cao [138]. Sự khác biệt trên có thể là do sự đáp ứng khác nhau của các lớp tế bào với môi trường cảm ứng. Mẫu cây ITCL chỉ chứa một hoặc một vài loại mô, trong khi mẫu cây tTCL bao gồm nhiều tế bào từ các loại mô khác nhau. Ngoài ra, sự khác biệt về kích thước, hình dạng và diện tích bề mặt vết cắt cũng có thể ảnh hưởng đến hiệu quả phát sinh chồi giữa hai loại mẫu cây [141].

3.1.1.3. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi từ mẫu cây ITCL và oTCL lóng thân

Kết quả ở thí nghiệm trước chỉ ra rằng mẫu cây ITCL thích hợp cho quá trình phát sinh chồi. Tuy nhiên, vùng mô phần lõi của các mẫu cây thường không cảm ứng tái sinh, điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu quả tái sinh chồi. Do đó, trong thí nghiệm này, các mẫu cây oTCL (được thiết lập từ việc loại bỏ phần mô ở lõi của các mẫu cây ITCL) được khảo sát sự tái sinh chồi. Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy rằng trung bình số chồi trên mẫu và chiều cao chồi khác biệt không đáng kể giữa hai loại mẫu cây này, trong khi đó, tỉ lệ cảm ứng chồi của các mẫu cây oTCL (79,25%) cao hơn đáng kể đối với ITCL (67,78%) (Hình 3.4). Điều này chỉ ra rằng việc loại bỏ vùng mô lõi đã mang lại hiệu quả tích cực đối với khả năng cảm ứng chồi của mẫu cây.



Hình 3.4. So sánh hiệu quả tái sinh chồi giữa mẫu cây ITCL và oTCL từ các lóng thân ở vị trí thứ 3 sau 60 ngày nuôi cấy. (*Thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê).

Mặt khác, nhằm mục đích tăng cường hiệu quả tái sinh chồi, hai loại mẫu này được khảo sát sự phát sinh chồi trong môi trường nuôi cấy bổ sung các nồng độ AgNPs khác nhau. Kết quả cho thấy rằng hiệu quả tái sinh chồi từ mẫu cây ITCL và

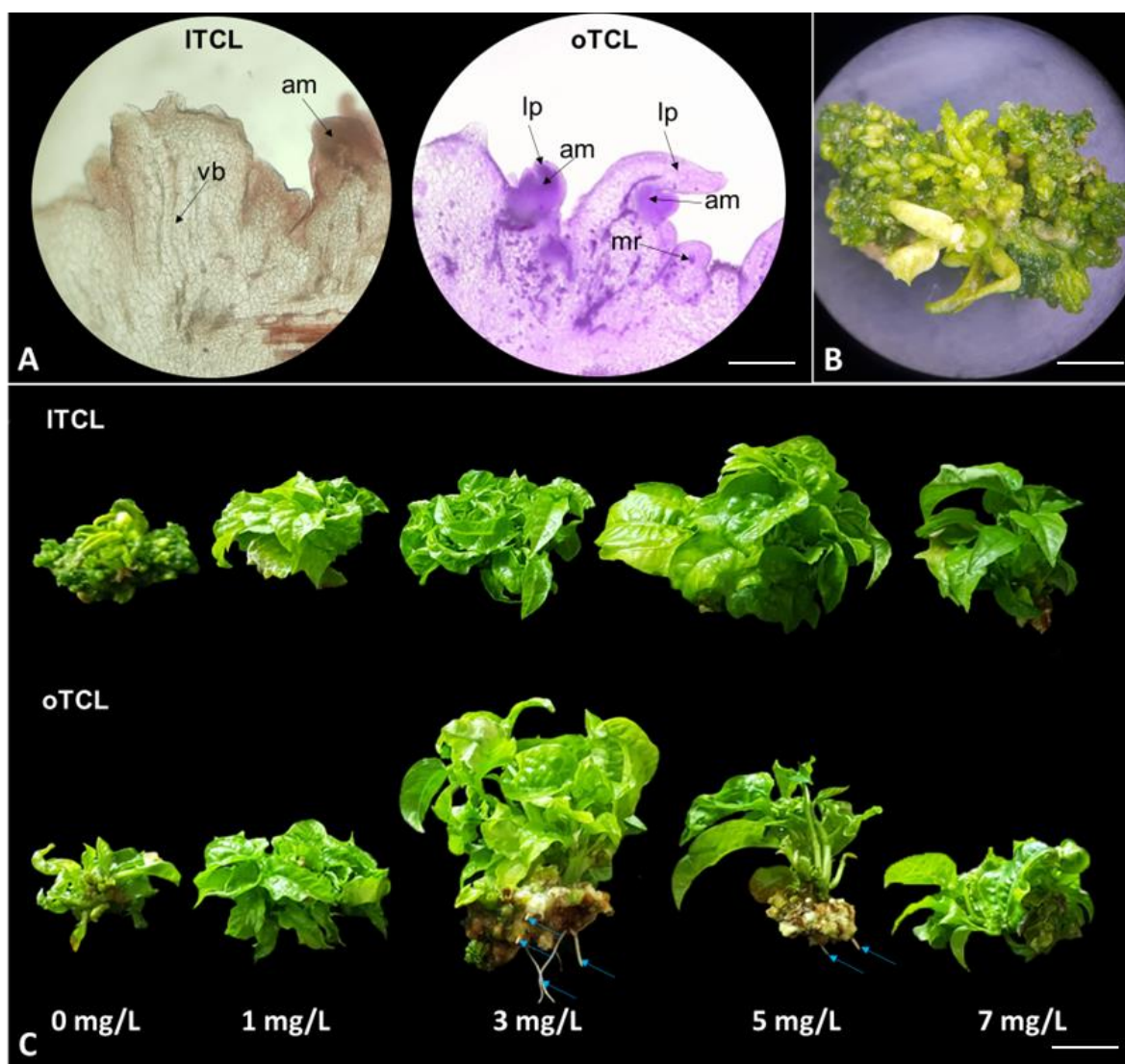
oTCL có thể được tăng cường đáng kể trong môi trường bổ sung các nồng độ AgNPs thích hợp (Bảng 3.1, Hình 3.5).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi từ mẫu cây ITCL và oTCL sau 60 ngày nuôi cấy.

| AgNPs (mg/L) | Tỉ lệ cảm ứng chồi (%) | | Số chồi /mẫu | | Chiều cao chồi (cm) | |
|-----------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | ITCL | oTCL | ITCL | oTCL | ITCL | oTCL |
| 0 | 67,78 ^{c*} | 79,25 ^c | 3,00 ^c | 3,33 ^d | 0,93 ^b | 1,05 ^c |
| 1,0 | 70,00 ^c | 87,51 ^b | 5,00 ^{bc} | 10,67 ^b | 1,23 ^b | 1,54 ^b |
| 3,0 | 72,72 ^{bc} | 100^a | 7,33 ^b | 15,33^a | 1,37 ^b | 2,61^a |
| 5,0 | 87,78^a | 87,87 ^b | 11,33^a | 7,33 ^c | 2,53^a | 2,50 ^a |
| 7,0 | 79,25 ^b | 82,03 ^c | 7,67 ^b | 7,00 ^c | 2,50 ^a | 1,47 ^b |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b, ...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).

Đối với các mẫu cây ITCL, việc bổ sung 5,0 mg/L AgNPs cho tỉ lệ tái tạo chồi cao nhất (87,78%). Hơn nữa, số lượng chồi (11,33 chồi/mẫu) và chiều cao chồi (2,53 cm) cao nhất cũng được ghi nhận ở NT 5,0 mg/L AgNPs (Bảng 3.1, Hình 3.5C). Đối với các mẫu cây oTCL, tỉ lệ tái sinh chồi (100%), số chồi (15,33 chồi/mẫu) và chiều cao chồi (2,61 cm) cao nhất được ghi nhận trong NT bổ sung 3,0 mg/L AgNPs. Kết quả quan sát cũng cho thấy các mẫu cây cảm ứng chồi sau 9 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, chồi được tái sinh từ các mẫu cây oTCL cho thấy sự hình thành sơ khởi lá rõ ràng hơn so với các mẫu cây ITCL (Hình 3.5A). Đồng thời, các chồi tái sinh có thể được quan sát rõ ràng trên bề mặt mẫu cây oTCL sau 30 ngày nuôi cấy (Hình 3.5B). Ngoài ra, các rễ bất định cũng được quan sát thấy ở các mẫu cây oTCL trong môi trường bổ sung 5 hoặc 7 mg/L AgNPs (Hình 3.5C).



Hình 3.5. Chồi tái sinh từ mẫu cây ITCL và oTCL trong môi trường bổ sung AgNPs. **A.** Tái sinh chồi từ mẫu ITCL và oTCL sau 9 ngày nuôi cấy (Thước: 40 μ m). **B.** Chồi hình thành từ bề mặt mẫu cây oTCL sau 30 ngày nuôi cấy (Thước: 1 cm). **C.** Sự tái sinh chồi từ mẫu cây ITCL và oTCL trong môi trường chứa AgNPs ở các nồng độ khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy (Thước: 1 cm). Các mũi tên màu xanh chỉ vị trí của rễ bất định được hình thành từ mẫu cấy. Mô phân sinh ngọn (am - apical meristem), vùng mô phân sinh (mr - meristematic region), sơ khởi lá (lp - leaf primordia), mạch dẫn (vb - vascular bundle).

Hieu và cộng sự (2022) cũng đã ghi nhận tỉ lệ tái sinh chồi cao (71,67%) của mẫu cây ITCL đoạn thân *in vitro* của cây chanh dây vàng [138]. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ tái sinh chồi cao (87,67%) cũng được quan sát thấy ở mẫu cây ITCL từ lóng thân *ex vitro*. Hơn nữa, tỉ lệ tái sinh chồi (100%) được ghi nhận ở các mẫu cây oTCL

cao hơn so với các mẫu cây ITCL. Điều này có thể là do việc loại bỏ các vùng phân chia chậm và sự tiếp xúc trực tiếp của các vùng phân chia mạnh với môi trường nuôi cấy của các mẫu cây oTCL. Các mẫu cây oTCL được loại bỏ các tế bào ở vùng lõi và giữ lại chủ yếu các tế bào vùng nhu mô và tầng. Do đó, khả năng tái sinh chồi của mẫu cây oTCL cao hơn mẫu ITCL có thể là do khả năng tái sinh các vùng tế bào này. Các phản ứng khác nhau của các vùng tế bào và các mô hình cắt mẫu cây đối với các quá trình tái sinh thực vật cũng đã được báo cáo và phần nào được làm rõ trong một số nghiên cứu trước đây [96, 100, 106, 142]. Mặt khác, kết quả cũng cho thấy hiệu quả tái sinh chồi từ mẫu cây ITCL và oTCL có thể được tăng cường đáng kể trong môi trường bổ sung các nồng độ AgNPs. Kết quả này tương tự với các báo cáo trước đó về khả năng tăng cường sự tái sinh chồi của AgNPs trong môi trường nuôi cấy của *Swertia chirata* [143] và *Lavandula angustifolia* [144].

Nhìn chung, đối với các mẫu cây TCL từ lóng thân *ex vitro*, sự cảm ứng chồi tối ưu (70,37%) được quan sát tại các mẫu cây tại vị trí lóng thân thứ 3. Tỷ lệ cảm ứng chồi của mẫu cây tTCL và ITCL tại vị trí lóng thân thứ 3 khác biệt không đáng kể; tuy nhiên, số chồi ở mẫu cây ITCL cao hơn đáng kể so với mẫu cây tTCL. Các mẫu cây oTCL cho tỷ lệ tái sinh chồi cao hơn so với mẫu cây ITCL. Việc bổ sung AgNPs ở nồng độ thích hợp trong môi trường nuôi cấy cũng cải thiện đáng kể khả năng tái sinh chồi của cả mẫu cây ITCL (5,0 mg/L AgNPs) và oTCL (3,0 mg/L AgNPs).

3.1.2. Nghiên cứu phát sinh phôi soma từ mẫu cây lá *ex vitro*

3.1.2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và NAA đến sự phát sinh SE

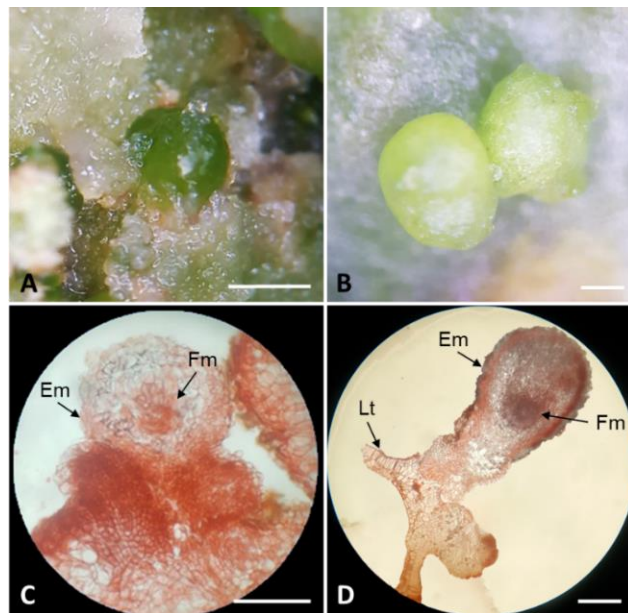
Kết quả cho thấy sự phát sinh SE từ mẫu cây lá bị ảnh hưởng đáng kể bởi loại và nồng độ auxin bổ sung trong môi trường sau 60 ngày nuôi cấy (Bảng 3.2, Hình 3.6). Các SE gián tiếp thông qua mô sẹo được ghi nhận ở nồng độ từ 1,0 đến 2,0 mg/L 2,4-D. Trong đó, bổ sung 2,0 mg/L 2,4-D cho tỷ lệ phát sinh SE (25,93%) và số phôi trên mẫu cây (8,00 phôi/mẫu) đạt cao nhất. Tuy nhiên, mẫu lá chỉ tạo ra mô sẹo khi tăng nồng độ 2,4-D trong môi trường nuôi cấy lên 3,0 và 4,0 mg/L. Mặt khác, việc bổ sung 1,0 - 3,0 mg/L NAA vào môi trường nuôi cấy đã thúc đẩy cảm ứng hình thành phôi trực tiếp trên bề mặt của mẫu cây lá. Các mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,0 mg/L NAA cho tỷ lệ phát sinh SE trực tiếp (33,33%) và số phôi trên một mẫu (8,33 phôi) cao hơn so với các nồng độ thí nghiệm khác. Kết quả cũng

cho thấy khi tăng nồng độ NAA lên 4,0 mg/L, chỉ có sự hình thành mô sẹo được ghi nhận.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D hoặc NAA lên sự phát sinh SE từ mẫu cây lá sau 60 ngày nuôi cấy.

| 2,4-D (mg/L) | NAA (mg/L) | Tỉ lệ cảm ứng SE (%) | Số phôi /mẫu | Mô tả |
|--------------|------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0,0 | 0,0 | 0,00 ^{d*} | 0,00 ^d | Không cảm ứng |
| 1,0 | 0,0 | 14,81 ^c | 4,67 ^b | Cảm ứng mô sẹo sinh phôi |
| 2,0 | 0,0 | 25,93^b | 8,00^a | Cảm ứng mô sẹo sinh phôi |
| 3,0 | 0,0 | 0,00 ^d | 0,00 ^d | Chỉ cảm ứng mô sẹo |
| 4,0 | 0,0 | 0,00 ^d | 0,00 ^d | Chỉ cảm ứng mô sẹo |
| 0,0 | 1,0 | 18,52 ^c | 1,67 ^c | Cảm ứng phôi trực tiếp |
| 0,0 | 2,0 | 33,33^a | 8,33^a | Cảm ứng phôi trực tiếp |
| 0,0 | 3,0 | 14,81 ^c | 4,33 ^b | Cảm ứng phôi trực tiếp |
| 0,0 | 4,0 | 0,00 ^d | 0,00 ^d | Chỉ cảm ứng mô sẹo |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b,...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).



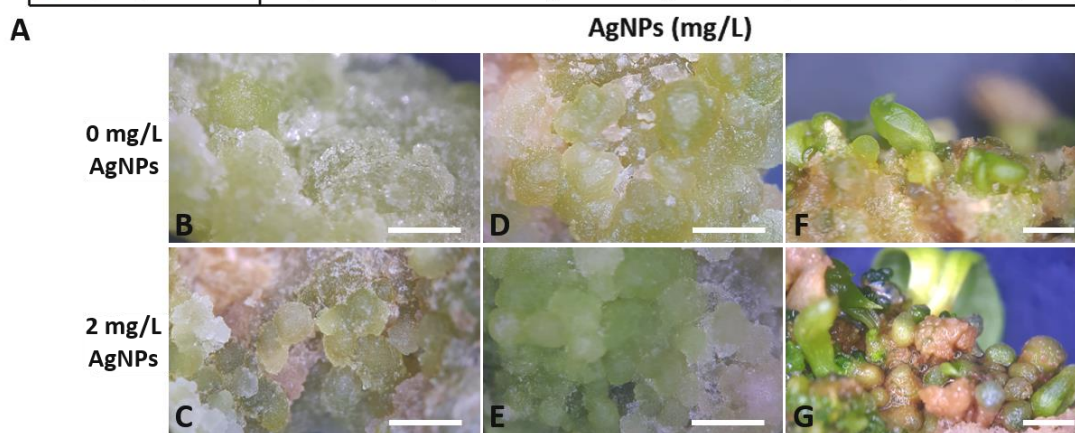
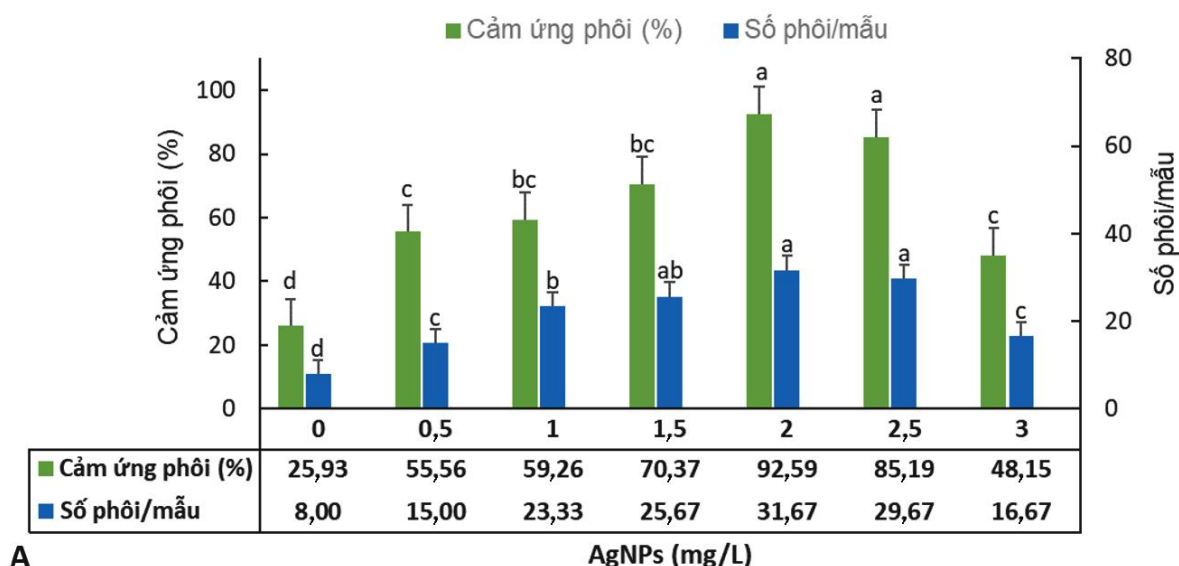
Hình 3.6. Cảm ứng SE từ mẫu cây lá sau 60 ngày nuôi cấy. **A.** và **C.** Phôi hình thành gián tiếp. **B.** và **D.** Phôi hình thành trực tiếp. (Em) SE, (Fm) Vùng mô phân sinh, (Lt) Mô lá. (A, B: Thước 0,5 mm; C, D: Thước 40 μm).

Auxin đã được chứng minh là đóng vai trò thiết yếu trong quá trình phát sinh SE của nhiều loài thực vật. Chúng cần thiết cho sự phát triển phôi sớm trong các mô sinh dưỡng, sự biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình tạo phôi và liên quan đến sự phân cực trong các tế bào hình thành SE [121]. Trong nghiên cứu hiện tại, SE từ mẫu lá của cây chanh dây tím bị ảnh hưởng đáng kể bởi loại và nồng độ auxin (2,4-D và NAA). Sự phát sinh tối ưu của SE gián tiếp được ghi nhận tại 2,0 mg/L 2,4-D, trong khi việc bổ sung 2,0 mg/L NAA cho phát sinh SE trực tiếp. Vì vậy, có thể thấy rằng sự phát sinh SE ở mẫu lá chanh dây tím có thể hình thành theo hai con đường khác nhau và phụ thuộc đáng kể vào loại và nồng độ của auxin.

3.1.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs đối với quá trình phát sinh SE gián tiếp từ mẫu lá

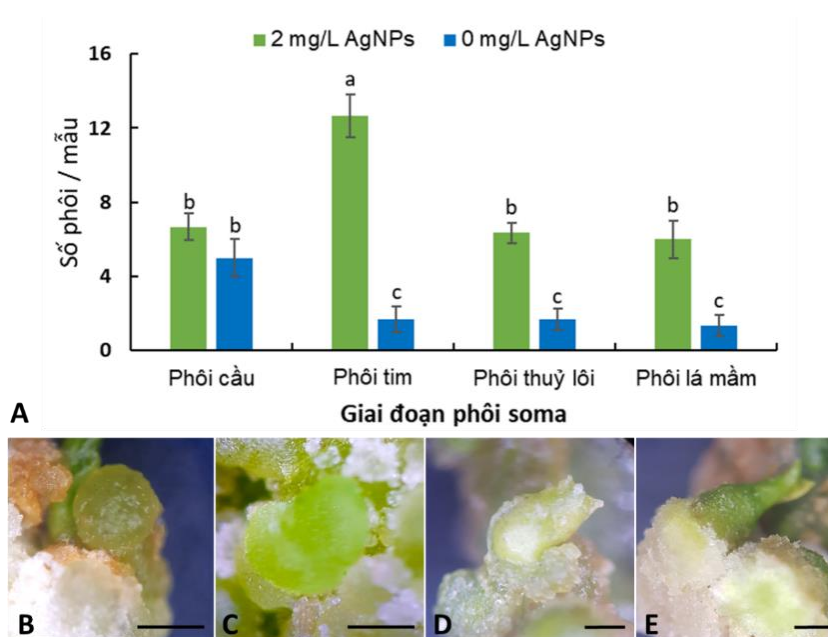
Các kết quả thí nghiệm trên chỉ ra rằng 2,0 mg/L 2,4-D cho thấy tác động thúc đẩy việc hình thành mô sẹo sinh phôi. Trong thí nghiệm này, các nồng độ khác nhau của AgNPs được bổ sung vào môi trường nuôi cấy có chứa 2,4-D nhằm tăng cường sự phát sinh SE gián tiếp từ các mẫu lá. Các kết quả ban đầu cho thấy sự phát sinh SE gián tiếp thông qua mô sẹo được tăng cường đáng kể trong môi trường bổ sung AgNPs sau 75 ngày nuôi cấy (Hình 3.7).

Việc bổ sung AgNPs ở tất cả các nồng độ thí nghiệm cho tỉ lệ phát sinh SE và số lượng phôi trên mẫu cấy cao hơn so với đối chứng. Trong đó, môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp 2,0 mg/L 2,4-D và 2,0 mg/L AgNPs cho tỉ lệ cảm ứng SE (92,59%) và số phôi trên mẫu (31,67 phôi) tối ưu. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ AgNPs lên 3,0 mg/L, cả tỉ lệ cảm ứng SE và số lượng phôi trên mẫu cấy đều giảm đáng kể (Hình 3.7A). Ngoài ra, sự hình thành mô sẹo sinh phôi và SE được quan sát thấy trên môi trường bổ sung AgNPs rõ ràng hơn so với môi trường đối chứng sau 15 ngày (Hình 3.7B, C), 30 ngày (Hình 3.7D, E), và 75 ngày (Hình 3.7F, G).

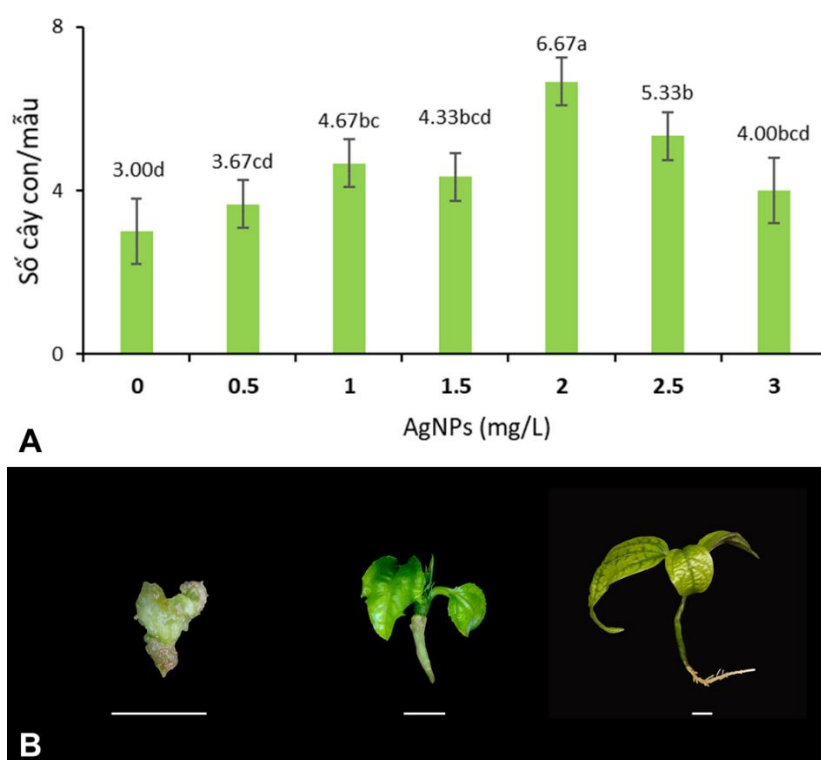


Hình 3.7. Ảnh hưởng của AgNPs đối với sự phát sinh SE gián tiếp từ mẫu lá. **A.** Sự cảm ứng SE và số lượng SE trên mỗi mẫu cây trong môi trường được bổ sung các nồng độ AgNPs khác nhau sau 75 ngày nuôi cấy. Sự phát sinh SE từ mẫu lá trên môi trường không bổ sung và bổ sung 2,0 mg/L AgNPs sau 15 ngày (**B** và **C**), 30 ngày (**D** và **E**) và 75 ngày (**F** và **G**) nuôi cấy (Thước: 1 mm). ($p < 0,05$, Duncan).

Kết quả cũng cho thấy, các SE gián tiếp qua mô sẹo có các giai đoạn phát triển đầy đủ bao gồm phôi hình cầu, hình tim, hình ngư lôi và phôi có lá mầm. Hơn nữa, sự trưởng thành và chuyển đổi của SE được cải thiện đáng kể trên môi trường bổ sung AgNPs sau 75 ngày nuôi cấy. Khi xử lý với 2,0 mg/L AgNPs, số lượng phôi ở các giai đoạn tim, ngư lôi và lá mầm được cải thiện đáng kể. Ngược lại, số lượng phôi ở giai đoạn hình cầu cao hơn so với các giai đoạn khác đối với NT không bổ sung AgNPs (Hình 3.8).



Hình 3.8. Sự phát sinh SE gián tiếp từ mẫu cây lá trên môi trường bổ sung 2,0 mg/L AgNPs sau 75 ngày nuôi cấy. **A.** Số lượng SE trung bình ở các giai đoạn phát triển khác nhau. **B.** Giai đoạn hình cầu. **C.** Giai đoạn hình tim. **D.** Giai đoạn hình ngư lôi. **E.** Giai đoạn lá mầm. (Thước: 0,5 mm). ($p < 0,05$; Duncan).



Hình 3.9. Sự hình thành cây con từ SE có nguồn gốc từ mẫu cây lá trong môi trường bổ sung AgNPs sau 120 ngày nuôi cấy. **A.** Tỷ lệ tạo cây con hoàn chỉnh từ SE trong môi trường bổ sung các nồng độ AgNPs khác nhau. **B.** Sự phát triển của cây con từ SE (Thước: 1 mm). ($p < 0,05$, Duncan).

Ngoài ra, các NT đều cho thấy khả năng hình thành cây con sau 120 ngày nuôi cấy. Việc bổ sung 2,0 mg/L 2,4-D kết hợp với các nồng độ của AgNPs đều cho số cây con hình thành từ phôi cao hơn đáng kể so với việc bổ sung đơn lẻ 2,4-D. Trong đó, bổ sung 2,0 mg/L 2,4-D kết hợp với 2,0 mg/L AgNPs cho số lượng cây con hình thành cao nhất (6,67 cây/mẫu) (Hình 3.9).

Trong nuôi cấy mô thực vật, tác dụng tích cực của AgNPs đã được báo cáo ở nhiều khía cạnh khác nhau như khử trùng mẫu cấy, tăng cường nhân chồi, tăng sinh phôi, tăng trưởng cây con và kích thích sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp [56-58, 145]. Các cơ chế cơ bản của những tiềm năng này chủ yếu dựa trên các hạt kích thước nano của chúng, có thể dễ dàng vận chuyển và thâm nhập vào tế bào thực vật [56]. Ngoài ra, tác dụng của AgNPs đối với sự phát triển của thực vật được cho là có liên quan đến khả năng ức chế hoạt động ETH và sự tăng lên của các chất chống oxy hóa thường ghi nhận ở các cây được xử lý với AgNPs [146-148].

Trong các hệ thống tái sinh *in vitro*, ETH được tạo ra và ức chế sự hình thành mô sẹo và sự phát sinh SE ở nhiều loài thực vật như *Linum usitatissimum* [149], *Leucosium aestivum* [150], và *Coffea canephora* [151]. Do đó, tác dụng ức chế ETH của AgNPs có thể thuận lợi để thúc đẩy tái tạo mô sẹo và sự phát sinh SE. Xu hướng tương tự cũng được quan sát thấy ở nhiều loài thực vật. Ví dụ, việc bổ sung 5,0 mg/L AgNPs trong môi trường nuôi cấy đã thúc đẩy tần suất tạo mô sẹo và mô sẹo sinh phôi từ hạt trưởng thành của *Oryza sativa* [152]. Cường và cộng sự (2021) cũng báo cáo tác động tích cực của 1,6 mg/L AgNPs đối với sự phát sinh SE từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lá của *Panax vietnamensis* [58]. Trong nghiên cứu hiện tại ở cây chanh dây tím, các tác động tích cực của AgNPs đối với sự phát sinh SE có nguồn gốc từ mô sẹo từ các mẫu lá đã được ghi nhận. Cụ thể, việc bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy đã thúc đẩy đáng kể việc cảm ứng mô sẹo phát sinh phôi, tỉ lệ phát sinh và số lượng SE trên mẫu cấy.

Ngoài ra, kết quả cũng chỉ ra rằng sự trưởng thành tốt hơn của SE đã được quan sát thấy trong môi trường có chứa AgNPs. Kết quả thí nghiệm trên cho thấy 2,4-D là auxin thể hiện hiệu quả trong việc hình thành mô sẹo sinh phôi từ các mẫu lá của chanh dây tím. Tuy nhiên, sự tích lũy quá mức 2,4-D xảy ra bên trong phôi hình cầu đã được báo cáo là cản trở sự phân cực của tế bào và sự trưởng thành của phôi ở một

số thực vật [123]. Do đó, ảnh hưởng của AgNPs trong việc thúc đẩy sự trưởng thành của phôi trong nghiên cứu này đã mở ra một hướng nghiên cứu tiềm năng để tăng hiệu quả của sự phát sinh SE đối với chanh dây tím. Tác động này có thể liên quan đến sự thay đổi hàm lượng PGR và ETH trong mô thực vật dưới ảnh hưởng của AgNPs đã được quan sát thấy trong các báo cáo trước đây [152]. Hơn nữa, việc ngăn chặn các thụ thể liên quan đến sinh tổng hợp ETH bởi AgNPs đã thúc đẩy quá trình tổng hợp PA thông qua sự sẵn có của S-Adenosylmethionine [153, 154]. Do đó, sự trưởng thành của SE trong môi trường chứa AgNPs có thể liên quan đến sự gia tăng hàm lượng PA nội sinh, một yếu tố quan trọng trong sự trưởng thành của SE [95]. Ngược lại, sự tích lũy AgNPs quá mức cũng đã được báo cáo là gây ra một số tác động ức chế đối với sự sinh trưởng ở một số loài thực vật [155]. Sự xâm nhập quá mức của AgNPs vào mô thực vật có thể tạo ra các rào cản trong thành tế bào và các tác động bất lợi khác nhau do tăng sản xuất các oxygen phản ứng (ROS - Reactive Oxygen Species) [148]. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung AgNPs ở nồng độ cao cũng làm giảm đáng kể tỉ lệ sự phát sinh SE ở chanh dây tím.

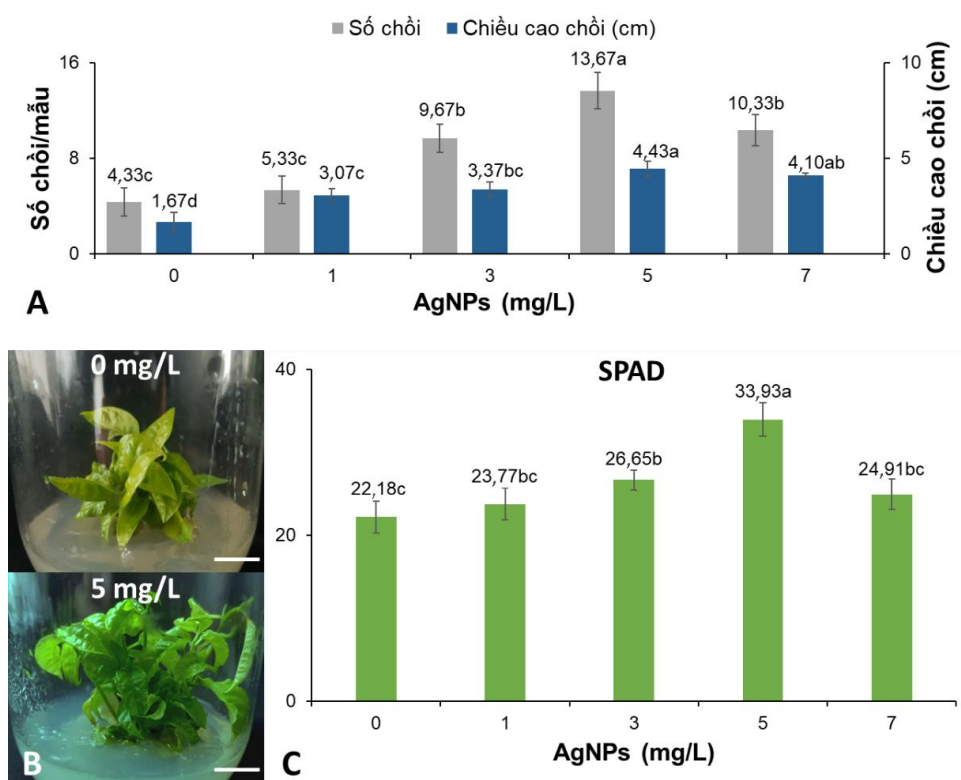
Nhìn chung, sự phát sinh SE từ mẫu cây lá cây chanh dây tím bị ảnh hưởng đáng kể bởi loại và nồng độ auxin. Sự phát sinh SE gián tiếp được ghi nhận tại 2,0 mg/L 2,4-D, trong khi việc bổ sung 2,0 mg/L NAA cho phát sinh SE trực tiếp. Mặt khác, việc bổ sung AgNPs ở tất cả các nồng độ thí nghiệm cho tỉ lệ phát sinh SE cao hơn và số lượng phôi trên mẫu cây cao hơn so với đối chứng. Trong đó, môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp 2,0 mg/L 2,4-D và 2,0 mg/L AgNPs cho tỉ lệ cảm ứng SE (92,59%), số phôi trên mỗi mẫu (31,67 phôi) và số lượng cây con hình thành (56,67 cây/mẫu) đạt tối ưu.

Như đã trình bày ở phần tổng quan, tái sinh chồi từ TCL và phát sinh SE là hai phương pháp tiềm năng để tái sinh thực vật trên cây chanh dây tím. Do đó, một số khảo sát hiện tại đối với hai quá trình này được thực hiện nhằm mục đích tạo ra nguồn mẫu cây số lượng lớn cho các thí nghiệm ra hoa và bước đầu tạo quả *in vitro*. Trong nghiên cứu này, dựa trên hiệu quả tái sinh thực vật có thể thấy rằng sự tái sinh chồi từ các mẫu cây oTCL cho hiệu quả cao hơn so với sự phát sinh SE về số lượng mẫu tạo thành cũng như thời gian trung bình của quá trình nuôi cấy. Đối với mẫu cây oTCL, số chồi tái sinh trung bình sau 60 ngày nuôi cấy là 15,33 chồi/mẫu; trong khi

số phi hình thành từ mẫu mảnh lá là trung bình 6,67 cây con từ phi được tạo thành sau 120 ngày nuôi cấy. Vì vậy, các phi tái sinh từ mẫu cấy oTCL được lựa chọn làm nguồn mẫu cấy khởi đầu cho các thí nghiệm sau.

3.1.3. Ảnh hưởng của AgNPs đến quá trình nhân nhanh phi

Kết quả của các thí nghiệm trước cho thấy mẫu cấy oTCL cho hiệu quả tái sinh cao trong môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA; 1,0 mg/L NAA và 3,0 mg/L AgNPs. Trong thí nghiệm này, các phi tái sinh từ môi trường này được thu nhận và tiếp tục được nhân nhanh nhằm mục đích tạo ra số phi đủ lớn cho các thí nghiệm tiếp theo. Chen và cộng sự (2020) đã báo cáo rằng việc bổ sung 1,0 mg/L mT vào môi trường nuôi cấy cải thiện đáng kể chất lượng phi trong quá trình vi nhân giống cây chanh dây “Tainung No.1” (*Passiflora edulis* Sims.). Trong nghiên cứu hiện tại, sự kết hợp giữa 1,0 mg/L mT và AgNPs ở nồng độ thích hợp cho thấy sự cải thiện đáng kể về sự nhân phi của chanh dây tím (Hình 3.10).



Hình 3.10. Ảnh hưởng của AgNPs đến hiệu quả nhân phi trong môi trường bổ sung cố định 1,0 mg/L mT sau 60 ngày nuôi cấy. **A.** Ảnh hưởng của AgNPs đến số phi trên mẫu và chiều cao phi. **B.** Phi trong môi trường không bổ sung AgNPs và bổ sung 5,0 mg/L AgNPs (Thước: 1 cm). **C.** Ảnh hưởng của AgNPs đến chỉ số SPAD ở lá.

Cụ thể, các chồi *in vitro* được tái sinh từ các mẫu cây oTCL đã được thu nhận và nuôi cấy trong môi trường bổ sung cố định 1,0 mg/L mT và AgNPs ở các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy việc bổ sung AgNPs trong môi trường nuôi cấy đã tăng cường đáng kể hiệu quả nhân chồi. NT bổ sung 5,0 mg/L AgNPs cho số lượng chồi (13,67 chồi/mẫu) và chiều cao chồi (4,43 cm) cao nhất (Hình 3.10A, B). Hơn nữa, việc bổ sung AgNPs trong môi trường nuôi cấy cũng làm tăng đáng kể chỉ số SPAD ở lá (33,93) so với đối chứng (22,18) (Hình 3.10C).

Nhiều nghiên cứu cũng đã nhấn mạnh những tác động tích cực của AgNPs đối với sự phát triển của thực vật *in vitro* [56]. Một số báo cáo cho thấy các enzyme chống oxy hóa được kích hoạt khi các mẫu cây được tiếp xúc với AgNPs, điều này có ảnh hưởng đến sự tăng sinh chồi, dẫn đến cải thiện việc sản xuất số lượng chồi trên mẫu cây [143, 147]. Việc bổ sung AgNPs trong môi trường nuôi cấy cũng làm tăng sự hình thành chồi và trọng lượng tươi của chồi ở *Lavandula angustifolia* [144]. Ngan và cộng sự (2020) đã báo cáo rằng các chồi *Rosa hybrida* khi được nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung AgNPs (2,0 mg/L) cho thấy hàm lượng diệp lục và chiều cao chồi tăng đáng kể. Tuy nhiên, việc bổ sung AgNPs không hoàn toàn có lợi cho sự nhân chồi ở thực vật. Ví dụ, sự tăng trưởng chồi ở *Phalaenopsis amabilis* đã giảm đáng kể khi sử dụng AgNPs ở nồng độ cao [155]. Một xu hướng tương tự đã được quan sát thấy trong thí nghiệm hiện tại, việc bổ sung 7,0 mg/L AgNPs trong môi trường nuôi cấy đã làm giảm số lượng chồi trên mẫu và chỉ số SPAD ở lá.

Nhìn chung, trong thí nghiệm này, các tác động tích cực của AgNPs một lần nữa được chứng minh đối với quá trình nhân nhanh chồi của cây chanh dây tím nuôi cấy *in vitro*. Như vậy, các kết quả chỉ ra rằng sự nhân nhanh của các chồi tái sinh từ mẫu cây oTCL có nguồn gốc từ lóng thân *ex vitro* được cải thiện đáng kể. Do đó, môi trường MS bổ sung 1 mg/L mT và 5,0 mg/L AgNPs được sử dụng cho quá trình nhân nhanh chồi để tạo ra số lượng lớn các chồi cho các thí nghiệm ra hoa và tạo quả.

3.2. Nội dung 2: Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Dựa vào các kết quả ở Nội dung 1, các chồi tái sinh từ các mẫu cấy oTCL được nhân nhanh trong môi trường nhân nhanh chồi thích hợp (môi trường MS bổ sung 1 mg/L mT và 5 mg/L AgNPs). Sau đó, các chồi tái sinh (1 cm) được chuyển sang nuôi cấy trong cảm ứng ra rễ (môi trường MS chứa 2,5 mg/L IBA) trong vòng 60 ngày để tạo cây hoàn chỉnh. Tiếp theo, các ngọn chồi được thu nhận từ các chồi này với độ dài khoảng 1,5 cm (bao gồm 1 đỉnh chồi và 3 lá) được sử dụng để làm nguồn mẫu cây cho các thí nghiệm ra hoa và tạo quả *in vitro*.

3.2.1. Ảnh hưởng của một số PGR ngoại sinh đến quá trình ra hoa *in vitro*

3.2.1.1. Ảnh hưởng của GA₃ đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

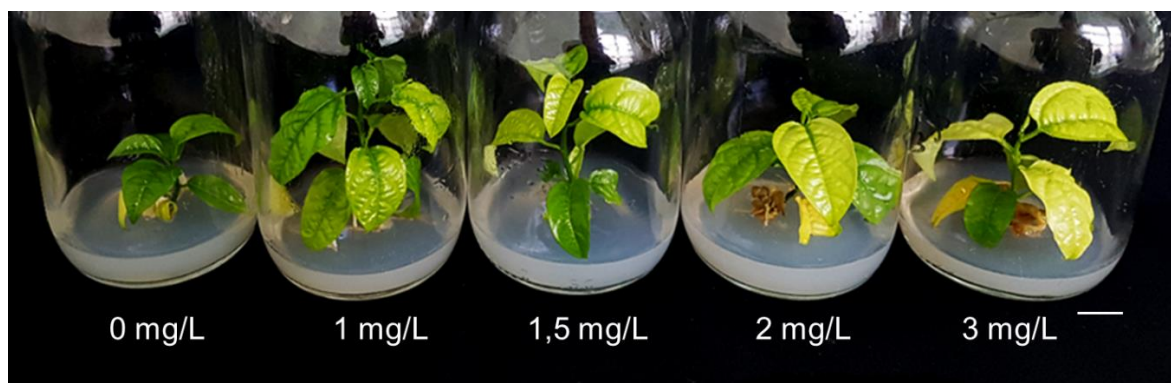
Trong môi trường bổ sung GA₃, sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím được tăng cường đáng kể tại nồng độ thích hợp (Bảng 3.3, Hình 3.11). Chiều cao của các chồi nuôi cấy trong môi trường bổ sung GA₃ ở nồng độ 1,0 mg/L và 1,5 mg/L (6,33 cm và 7,10 cm, tương ứng) cao hơn đáng kể so với đối chứng (2,07 cm). Ngoài ra, số lá trên chồi đạt cao nhất trong môi trường bổ sung 1,0 mg/L GA₃ (10,33 lá/chồi). Chỉ số SPAD ở lá giảm đáng kể trong môi trường bổ sung 2,0 và 3,0 mg/L GA₃ (24,38 và 24,04) so với đối chứng (27,12). Mặt khác, các nồng độ GA₃ bổ sung không kích thích sự ra hoa *in vitro* ở cây chanh dây tím.

Bảng 3.3 Ảnh hưởng của GA₃ đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây sau 60 ngày nuôi cấy.

| GA ₃ (mg/L) | Chiều cao chồi (cm) | Số lá /chồi | SPAD |
|---------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 2,07 ^{c*} | 6,67 ^c | 27,12 ^a |
| 1,0 | 6,33 ^a | 10,33 ^a | 26,85 ^a |
| 1,5 | 7,10 ^a | 8,33 ^b | 26,93 ^a |
| 2,0 | 3,90 ^b | 7,00 ^{bc} | 24,38 ^b |
| 3,0 | 4,07 ^b | 7,67 ^{bc} | 24,04 ^b |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b,...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).

Nhìn chung, kết quả ban đầu cho thấy, việc bổ sung GA₃ trong môi trường nuôi cấy đã cải thiện đáng kể chiều cao chồi và số lá trên chồi nhưng không gây ra sự ra hoa *in vitro* đối với cây chanh dây tím trong giới hạn của thí nghiệm. Gibberellin (GAs) được coi là tín hiệu gây ra sự kéo dài thân, rút ngắn thời gian của giai đoạn non và ra hoa ở thực vật. GAs đóng một vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy ra hoa ở nhiều loài thực vật ngoài tự nhiên như *Arabidopsis thaliana*, *Henckelia humboldtianus*, *Helleborus niger*, *Lolium temulentum* và *Iris nigricans* [156]. GAs thúc đẩy sự ra hoa và hình thành hoa ở cây ngày dài và cây hai năm trong điều kiện không thích hợp để ra hoa (như điều kiện ngày ngắn hoặc cây cần trải qua thọ hàn). Ngược lại, GAs thường được ghi nhận đã ức chế sự ra hoa đối với một số cây lâu năm [157]. Điều này cho thấy rằng ảnh hưởng của GAs lên sự ra hoa ở các loài thực vật khác nhau là không giống nhau.



Hình 3.11. Chồi chanh dây tím nuôi cấy trên các môi trường bổ sung GA₃ ở các nồng độ khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy (Thước: 1 cm).

Trong điều kiện *in vitro*, các ảnh hưởng khác nhau của GAs đến sự ra hoa *in vitro* ở các loài thực vật đã được ghi nhận. Các ngọn chồi từ cây con *in vitro* 2 tháng tuổi của cây *Ocimum basilicum* L. được chuyển sang môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L GA₃ đều ghi nhận sự ra hoa *in vitro* [9]. Cây *Lavandula heterophylla* ra hoa trong môi trường nuôi cấy bổ sung GA₃ ở điều kiện nhiệt độ thấp nhưng bị ngăn chặn ở điều kiện nhiệt độ cao [156]. Sự gia tăng hàm lượng GAs, đi kèm với sự hình thành mầm hoa trong cây *Bryophyllum daigremontianum* khi được chuyển từ điều kiện ngày dài sang điều kiện ngày ngắn [156]. Qua đó, có thể thấy rằng tác động của GA₃ đối với ra hoa *in vitro* còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như liều lượng bổ sung, loài thực vật và điều kiện nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung GA₃ ở nồng độ thích hợp trong môi trường nuôi cấy đã làm tăng chiều cao, số lá của chồi chanh dây

tím. Tuy nhiên, kết quả ban đầu cho thấy sự cảm ứng ra hoa *in vitro* ở cây chanh dây tím không được ghi nhận trong môi trường bổ sung GA₃ đơn lẻ trong giới hạn của thí nghiệm (Hình 3.11). Do đó, tác động của GA₃ đối với sự ra hoa của cây chanh dây tím cần được khảo sát ở nhiều khía cạnh khác trong những nghiên cứu tiếp theo.

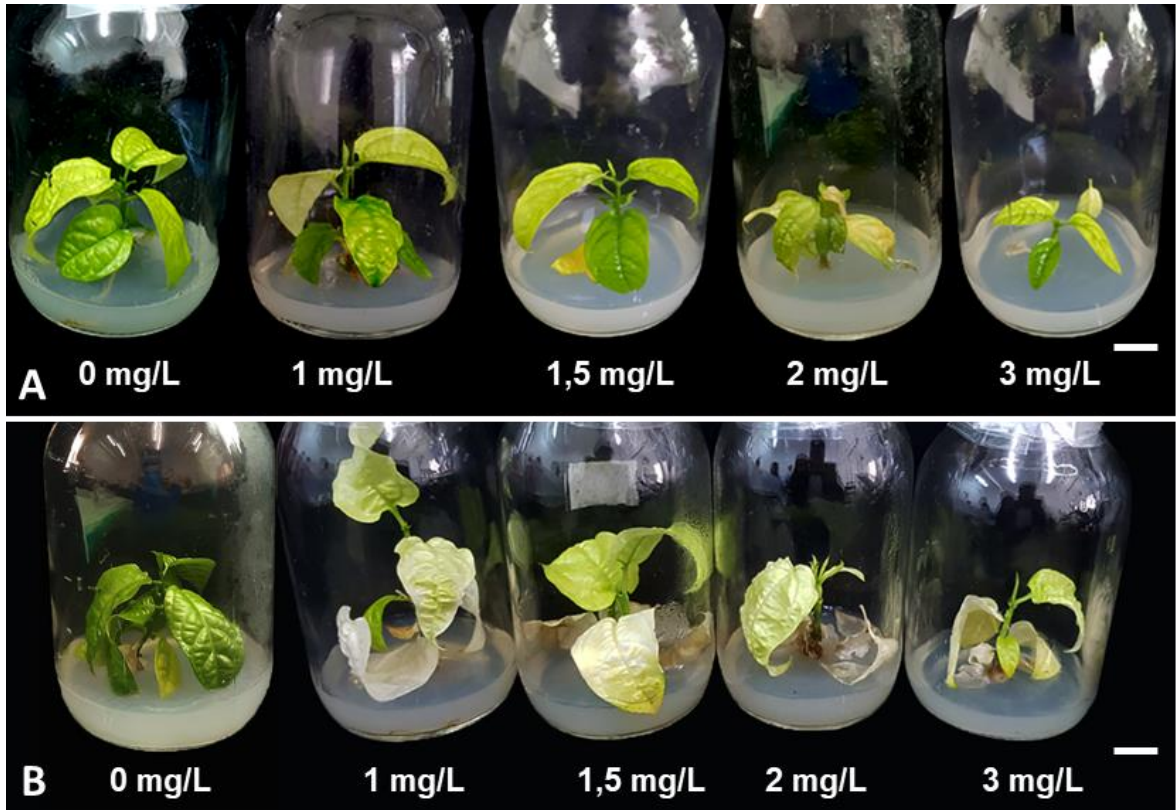
3.2.1.2. Ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

Kết quả ghi nhận ở Bảng 3.4 cho thấy sự sinh trưởng của các chồi bị suy giảm trong môi trường bổ sung ABA. Chiều cao của các chồi nuôi cấy trong môi trường bổ sung ABA ở nồng độ 2,0 mg/L (1,80 cm) và 3,0 mg/L (1,73 cm) thấp hơn đáng kể so với đối chứng (2,07 cm). Số lá trên chồi giảm đáng kể trong môi trường bổ sung 1,5 - 3,0 mg/L ABA, trong đó, số lá trên chồi giảm một nửa trong môi trường bổ sung 3,0 mg/L ABA (3,33 lá/chồi) so với đối chứng (6,67 lá/chồi). Kết quả cũng cho thấy chỉ số SPAD ở lá cũng giảm đáng kể trong môi trường bổ sung 1,5 - 3,0 mg/L ABA so với đối chứng. Tại nồng độ thí nghiệm cao nhất là 3,0 mg/L ABA, chỉ số SPAD được ghi nhận thấp nhất (23,21) và thấp hơn đáng kể so với đối chứng (27,12). Đồng thời, tất cả các NT bổ sung ABA đều ghi nhận hiện tượng rụng lá sau 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.12A). Mặt khác, các chồi trong môi trường bổ sung ABA không ghi nhận sự ra hoa *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy và các lá có hiện tượng giảm diện tích và rụng sau 90 ngày nuôi cấy (Hình 3.12B).

Bảng 3.4 Ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím sau 60 ngày nuôi cấy.

| ABA (mg/L) | Chiều cao chồi (cm) | Số lá /chồi | SPAD |
|---------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 2,07 ^{a*} | 6,67 ^a | 27,12 ^a |
| 1,0 | 2,10 ^a | 6,00 ^{ab} | 27,42 ^a |
| 1,5 | 1,97 ^{ab} | 4,67 ^{bc} | 25,29 ^b |
| 2,0 | 1,80 ^b | 4,00 ^c | 25,40 ^b |
| 3,0 | 1,73 ^b | 3,33 ^c | 23,21 ^c |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b, ...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 3.12. Chồi chanh dây nuôi cấy trên các môi trường bổ sung ABA ở các nồng độ khác nhau. **A.** Sau 60 ngày nuôi cấy. **B.** Sau 90 ngày nuôi cấy. (Thước: 1 cm).

ABA là một trong những hormone thực vật quan trọng, chủ yếu gây ra trạng thái ngủ của hạt và chồi, làm chậm quá trình nảy mầm của hạt, kìm hãm sự phát triển của cây con và tăng cường khả năng chống chịu stress phi sinh học của thực vật. ABA và GAs có vai trò đối lập trong điều hòa một số quá trình sinh học, bao gồm cả việc kiểm soát thời gian ra hoa [41]. Tác động tích cực và tiêu cực của ABA đối với quá trình phân hoá mầm hoa đã được báo cáo ở nhiều loài thực vật. Chẳng hạn, ở cây *Arabidopsis*, ABA được chứng minh đã tham gia vào việc kiểm soát quá trình chuyển đổi hình thành mầm hoa. Trong lá, tín hiệu ABA ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các gen tham gia vào quá trình điều hoà sự ra hoa, chẳng hạn gen *FT* ở đỉnh chồi. Ngược lại, nồng độ ABA quá cao làm tăng biểu hiện của gen *FLC* gây ra hoa muộn trong điều kiện ngày ngắn [42].

Sự ra hoa *in vitro* ở cây *Lycopersicon esculentum* được ghi nhận ở chồi tái sinh từ mô sẹo của mẫu lá trong môi trường nuôi cấy bổ sung 1,0 mg/L ABA [73]. Ở cây *Vigna aconitifolia*, bổ sung ABA và proline riêng lẻ hoặc kết hợp đều ảnh hưởng đến số ngày ra hoa, số hoa trên cây, số quả trên cây và hạt trên quả; trong đó, tần suất cây

ra hoa đạt 100% ở 1,0 và 3,0 μM ABA và 800 μM proline [158]. Trong nghiên cứu này, kết quả ban đầu cho thấy sự cảm ứng ra hoa *in vitro* ở cây chanh dây tím không được ghi nhận trong môi trường bổ sung ABA đơn lẻ trong khuôn khổ của thí nghiệm. Vì vậy, có thể thấy rằng sự ra hoa *in vitro* dưới tác động của ABA phụ thuộc đáng kể vào loài thực vật cũng như nồng độ bổ sung.

Nhìn chung, việc bổ sung ABA hoặc GA_3 trong môi trường nuôi cấy tác động đáng kể đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím thông qua các chỉ tiêu về chiều cao cây, số lá và chỉ số SPAD ở lá. Tuy nhiên, sự ra hoa *in vitro* không được ghi nhận trong môi trường bổ sung đơn lẻ ABA hoặc GA_3 tại các nồng độ bổ sung (1,0 – 3,0 mg/L) trong phạm vi của thí nghiệm.

Các PGR khác như nhóm auxin, cytokinin, GA_3 , ABA thường được sử dụng để kích thích sự ra hoa trên nhiều loài thực vật *in vitro*. Đối với chanh dây tím, các nhóm auxin và cytokinin ở nhiều loại và nồng độ khác nhau đã được sử dụng trong quá trình nuôi cấy các chồi nhằm mục đích tạo chồi và trong giai đoạn ra rễ *in vitro* [134]. Tuy nhiên, chưa có báo cáo nào về sự ra hoa *in vitro* được ghi nhận khi sử dụng các nhóm chất này. Trong thí nghiệm hiện tại, dựa vào các kết quả có thể thấy rằng việc bổ sung hai PGR khác là GA_3 và ABA đơn lẻ cũng không kích thích sự ra hoa *in vitro* ở cây chanh dây tím.

Trong quá trình ra hoa, một số PGR đóng vai trò quan trọng và tương tác với nhau ảnh hưởng đến thời gian và sự điều hòa của quá trình ra hoa. Sự tương tác giữa các hormone này rất phức tạp và thường tạo thành mạng lưới phức tạp. Sự cân bằng và tương tác giữa các hormone này rất quan trọng đối với việc xác định thời điểm ra hoa và sự phát triển của hoa. Một loại hormone có thể điều chỉnh tích cực sự ra hoa, trong khi một loại hormone khác có thể ức chế nó. Kết quả được xác định bởi sự cân bằng và tương tác của các tín hiệu này. Chẳng hạn, GAs gây ra sự phân hủy các protein ức chế auxin, thúc đẩy sự ra hoa. Auxin cũng có thể điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp và vận chuyển GAs. Cytokinin có thể đối kháng GAs bằng cách kích hoạt các protein ức chế và ức chế đường truyền tín hiệu GAs. ABA có thể ức chế quá trình sinh tổng hợp và truyền tín hiệu GAs, từ đó tác động đến quá trình ra hoa. Tương tác chéo không chỉ giới hạn ở các tương tác theo cặp mà có thể bởi nhiều PGR được kết nối với nhau để điều chỉnh các tín hiệu chung [159]. Vì vậy, bước đầu có thể thấy

rằng việc bổ sung GA₃ và ABA đơn lẻ tại các nồng độ thí nghiệm chưa đạt sự cân bằng để kích thích sự ra hoa ở chồi cây chanh dây tím *in vitro*.

3.2.2. Ảnh hưởng của bạc và coban đến quá trình ra hoa và tạo quả *in vitro*

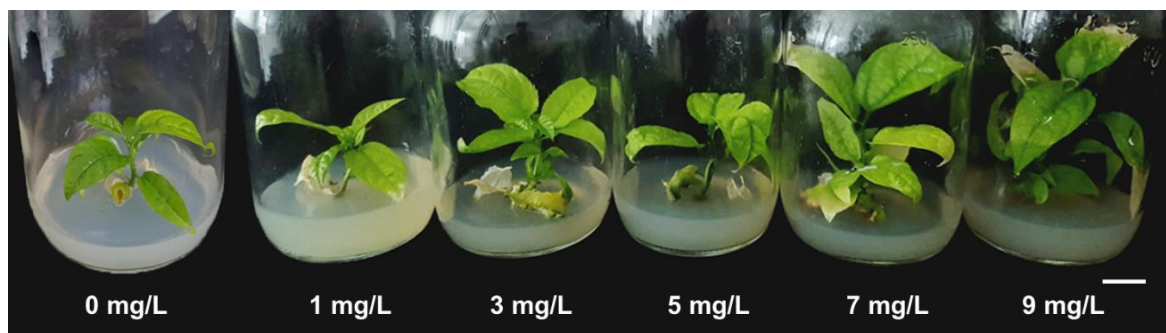
3.2.2.1. Ảnh hưởng của AgNO₃ đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

Kết quả ghi nhận ở Bảng 3.5 và Hình 3.13 cho thấy rằng, sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím được tăng cường trong môi trường bổ sung AgNO₃ tại nồng độ thích hợp sau 60 ngày nuôi cấy. Trong đó, bổ sung AgNO₃ ở nồng độ từ 7,0 và 9,0 mg/L cho chiều cao chồi (7,73 và 7,07 cm) và số lá trên chồi (11,67 và 15,33 lá/chồi) cao hơn đáng kể so với NT đối chứng (2,07 cm và 6,67 lá/chồi, tương ứng). Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy chỉ số SPAD được cải thiện trong môi trường bổ sung 3,0 - 7,0 mg/L AgNO₃. Tuy nhiên, kết quả ban đầu cho thấy, sự ra hoa *in vitro* không được ghi nhận đối với chồi chanh dây tím trong ở các nồng độ AgNO₃ đơn lẻ trong giới hạn của thí nghiệm.

Bảng 3.5 Ảnh hưởng của AgNO₃ đến sự sinh trưởng của chồi sau 60 ngày nuôi cấy.

| AgNO ₃ (mg/L) | Chiều cao chồi (cm) | Số lá/chồi | SPAD |
|-----------------------------|------------------------|--------------------|---------------------|
| 0 | 2,07 ^{d*} | 6,67 ^{cd} | 27,12 ^b |
| 1,0 | 3,53 ^c | 6,33 ^d | 26,91 ^b |
| 3,0 | 5,90 ^b | 8,33 ^c | 29,40 ^a |
| 5,0 | 5,63 ^b | 7,67 ^{cd} | 30,01 ^a |
| 7,0 | 7,73 ^a | 11,67 ^b | 29,57 ^a |
| 9,0 | 7,07 ^a | 15,33 ^a | 28,45 ^{ab} |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b, ...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 3.13. Chồi chanh dây phát triển trong môi trường bổ sung AgNO₃ ở các nồng độ khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy. (Thước: 1 cm).

Các ion bạc, chẳng hạn như AgNO₃, đóng vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến quá trình phát sinh SE, phát sinh chồi và sự hình thành rễ ở một số loài cây trồng [160]. AgNO₃ cũng được cho là có ảnh hưởng đến quá trình ra hoa *in vitro* ở một số loài thực vật. Việc bổ sung AgNO₃ ngoại sinh trong môi trường MS đã ảnh hưởng tích cực đến sự ra hoa *in vitro* trên cây *Capsicum frutescens*. Các hoa *in vitro* được ghi nhận sau 25 ngày trong môi trường bổ sung AgNO₃ ở nồng độ 40 μM [50]. Tuổi thọ hoa *in vitro* của *Dianthus chinensis* cũng được cải thiện trong môi trường bổ sung AgNO₃ [11]. Việc bổ sung AgNO₃ kết hợp với thay đổi chu kỳ sáng đã thúc đẩy sự ra hoa *in vitro* với tần số cao ở *Oldenlandia herbacea* (L.) Roxb. [161].

Bạc ở dạng ion được biết đến là chất ức chế hiệu quả hoạt động của ETH và tham gia vào các phản ứng tạo hoa [50, 146, 162]. ETH có thể liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến quá trình ra hoa ở những loài thực vật nhạy cảm với ETH. Ngoài ra, việc ngăn chặn các thụ thể liên quan đến sinh tổng hợp ETH có thể dẫn đến tổng hợp PA (một yếu tố quan trọng trong việc ra hoa ở nhiều loài thực vật) do sự sẵn có của S-adenosyl methionine [153]. Do đó, việc bổ sung ion bạc có thể tác động đến hàm lượng ETH và PA, từ đó tác động đến quá trình ra hoa ở thực vật [11, 154]. Mặt khác, thực vật phản ứng khác nhau với AgNO₃ trong quá trình cảm ứng ra hoa. Chẳng hạn, cây *Rosa indica* ra hoa *in vitro* ở nồng độ 50 mg/L AgNO₃; trong khi ở cây *Rosa × hybrida*, sự ra hoa *in vitro* được ghi nhận ở nồng độ thấp hơn đáng kể (2 mg/L) [163]. Bên cạnh đó, giai đoạn ra hoa và phát triển hoa có những yêu cầu khác nhau, nguyên nhân là do sự biểu hiện gen khác biệt giữa các loài thực vật. Trong nghiên cứu hiện tại, có thể thấy rằng việc bổ sung AgNO₃ trong giới hạn của thí nghiệm không kích thích sự ra hoa từ chồi *in vitro* của cây chanh dây tím.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

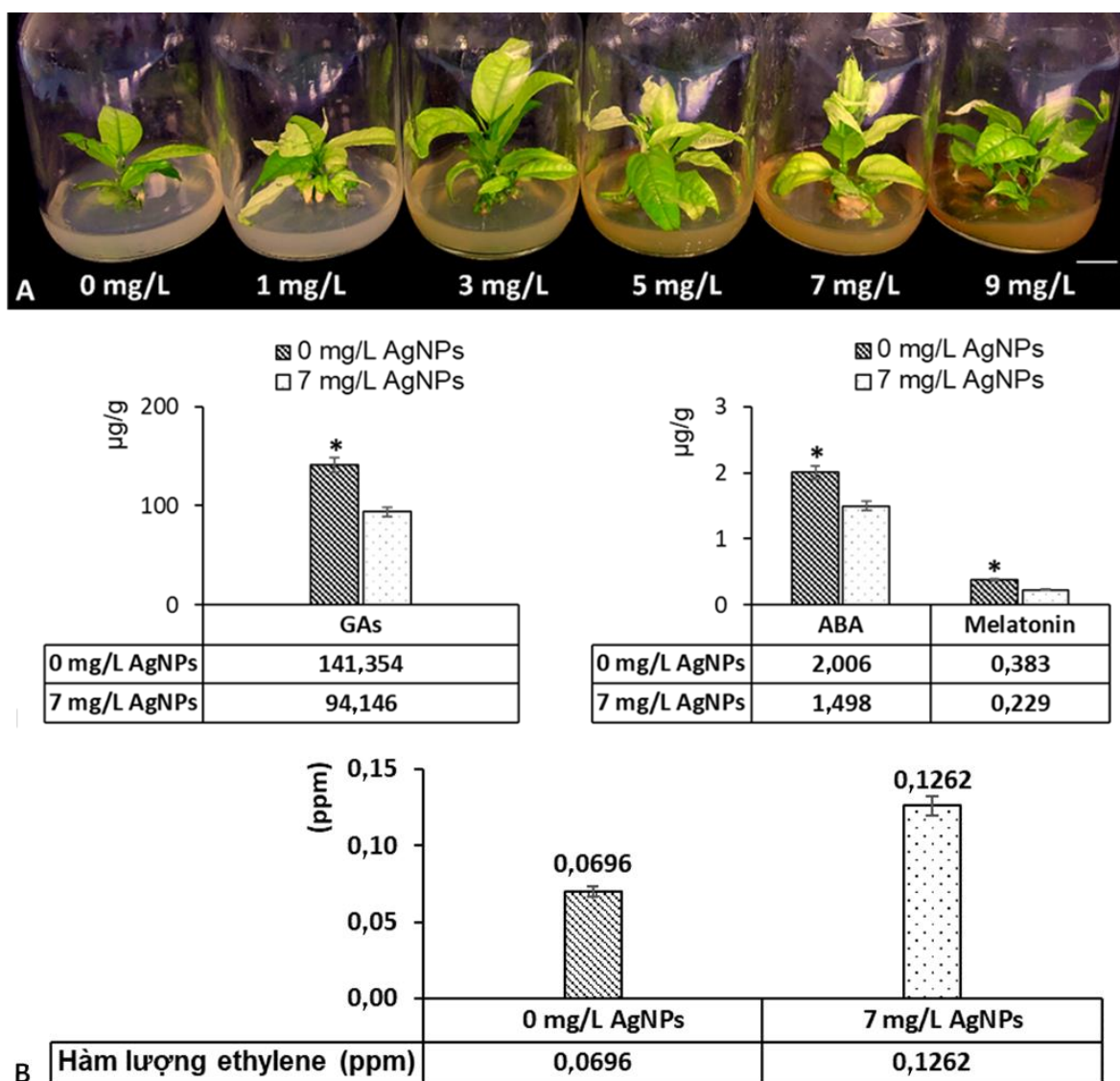
Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy sự sinh trưởng của các chồi chanh dây tím được tăng cường đáng kể trong môi trường nuôi cấy bổ sung AgNPs tại nồng độ thích hợp. Chiều cao chồi cao nhất (7,50 cm) được ghi nhận ở nồng độ 7,0 mg/L AgNPs và cao hơn đáng kể so với đối chứng (2,07 cm). NT bổ sung 3,0 mg/L AgNPs làm tăng đáng kể số lá (13,33 lá/chồi) và chỉ số SPAD (30,12) so với đối chứng (6,67 lá/chồi và 27,12; tương ứng). Tuy nhiên, chỉ số SPAD giảm đáng kể khi tăng nồng độ AgNPs bổ sung lên 7,0 và 9,0 mg/L so với đối chứng (Bảng 3.6).

Bảng 3.6 Ảnh hưởng của AgNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro* của chồi sau 60 ngày nuôi cấy.

| AgNPs (mg/L) | Chiều cao chồi (cm) | Số lá /chồi | SPAD | Tỉ lệ ra hoa (%) | Số nụ hoa /chồi |
|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|
| 0 | 2,07 ^{e*} | 6,67 ^d | 27,12 ^{bc} | 0,00 ^e | - |
| 1,0 | 3,50 ^d | 10,67 ^c | 28,40 ^{ab} | 0,00 ^e | - |
| 3,0 | 7,23 ^a | 13,33 ^{ab} | 30,12 ^a | 11,58 ^d | 0,67 ^c |
| 5,0 | 6,27 ^c | 10,67 ^c | 25,68 ^{cd} | 23,60 ^c | 1,00 ^b |
| 7,0 | 7,50 ^a | 12,00 ^{bc} | 24,73 ^d | 51,72^a | 2,33^a |
| 9,0 | 6,77 ^b | 14,67 ^a | 24,00 ^d | 38,20 ^b | 1,33 ^b |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b,...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).

Mặt khác, sự ra hoa *in vitro* đã được quan sát thấy ở các chồi được nuôi cấy trong môi trường bổ sung từ 3,0 đến 9,0 mg/L AgNPs với tỉ lệ ra hoa dao động từ 11,58% đến 51,72% sau 60 ngày nuôi cấy (Bảng 3.6, Hình 3.14A). Trong đó, các chồi được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs cho tỉ lệ ra hoa (51,72%) và số hoa (2,33 hoa/chồi) cao nhất. Tỉ lệ ra hoa và số hoa giảm đáng kể khi tăng nồng độ AgNPs bổ sung trong môi trường nuôi cấy lên 9,0 mg/L (38,20% và 1,33 hoa/chồi, tương ứng).



Hình 3.14. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự ra hoa *in vitro*, sự thay đổi hormone nội sinh của chồi và sự tích lũy ETH sau 60 ngày nuôi cấy. **A.** Sự ra hoa *in vitro* trong môi trường bổ sung AgNPs ở các nồng độ khác nhau (Thuốc: 1 cm). **B.** Hàm lượng GAs, ABA, melatonin tích lũy trong chồi và hàm lượng ETH tích lũy trong bình nuôi cấy ở nghiệm thức bổ sung 7,0 mg/L AgNPs và đối chứng.

Kết quả phân tích cho thấy rằng các chồi trong môi trường chứa 7,0 mg/L AgNPs cho thấy hàm lượng GAs (94,146 µg/g) và ABA (1,498 µg/g) nội sinh thấp hơn đáng kể so với đối chứng (141,354 µg/g và 2,006 µg/g, tương ứng) sau 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.14B). Tương tự, Yan và cộng sự (2019) cũng đã báo cáo rằng hàm lượng GAs và ABA của cây ra hoa giảm đáng kể so với các cây không ra hoa ở cây *Glycyrrhiza uralensis*; ngoài ra, hàm lượng cao của GAs và ABA cũng được đề xuất là tỉ lệ thuận với tốc độ rụng hoa và quả ở cây này [159].

Kết quả cũng cho thấy hàm lượng melatonin trong các chồi được nuôi cấy trong NT bổ sung 7,0 mg/L AgNPs (0,229 $\mu\text{g/g}$) cũng thấp hơn đáng kể so với đối chứng (0,383 $\mu\text{g/g}$) (Hình 3.14B). Ở nhiều loài thực vật, melatonin chủ yếu tham gia vào quá trình đáp ứng các stress, nhưng nó cũng liên quan đến sự nảy mầm, tăng trưởng thực vật, hình thành rễ và là một tác nhân bảo vệ giúp cải thiện các chức năng quan trọng ở thực vật [164]. Hàm lượng melatonin cũng đã được báo cáo ảnh hưởng đến các giai đoạn phát triển khác nhau của hoa [164, 165]. Đối với giai đoạn cảm ứng ra hoa, hàm lượng melatonin cao cũng được báo cáo đã ức chế sự ra hoa ở *Chenopodium rubrum* [166] và *Arabidopsis thaliana* [164].

Ngoài ra, hàm lượng ETH tích lũy trong bình nuôi cấy tại NT bổ sung 7,0 mg/L AgNPs (0,1262 ppm) được ghi nhận cao hơn so với NT không bổ sung AgNPs (0,0696 ppm) (Hình 3.14B). Điều này trái ngược với khả năng ngăn chặn ETR trong bình nuôi cấy của AgNPs đã được báo cáo. Tuy nhiên, sự tích tụ ETH cao hơn có thể là do nồng độ cao của AgNPs bổ sung và giai đoạn sinh lý của thực vật. Ngan và cộng sự (2019) cũng đã báo cáo về sự gia tăng khí ETH trong bình nuôi cấy các cây con *Rosa hybrida* khi bổ sung AgNPs ở nồng độ cao (7,0 mg/L). Tương tự, Cuong và cộng sự (2021) cũng báo cáo về sự gia tăng đáng kể của khí ETH tích tụ trong bình nuôi cấy cây con *Panax vietnamensis* khi bổ sung AgNPs ở nồng độ từ 1,6 - 2,0 mg/L [58]. Do đó, hiệu quả ngăn chặn ETH còn tùy thuộc vào nồng độ NPs bổ sung và loài thực vật.

Mặt khác, sự phản ứng với ETH ở mỗi loài thực vật là khác nhau và phụ thuộc lớn vào nồng độ. Chẳng hạn, nghiên cứu của Prameswara và cộng sự (2009) cho thấy rằng sự tiếp xúc của cây con *Ptilotus nobilis* với khí ETH ở mức 100 mg/L làm tăng đáng kể số chồi và chiều cao cây nhưng điều này không xảy ra đối với cây con của *Ptilotus spicatus* [167]. Ở một số loài, ETH có vai trò kích thích sự ra hoa; còn trên đa số các loài thực vật khác, ETH lại gây ức chế sự ra hoa [2]. Hơn nữa, sự khác biệt ETH có thể một phần là do sự khác biệt giai đoạn giữa các chồi có hoa và không hoa, do đó, trong nghiên cứu này khó có thể khẳng định hàm lượng ETH tăng lên là do tác động của AgNPs và lượng ETH này có ảnh hưởng đến quá trình cảm ứng ra hoa. Vì vậy, sự tích tụ ETH và tác động của chúng đối với sự ra hoa *in vitro* của cây chanh dây tím cần được khảo sát làm rõ trong những nghiên cứu tiếp theo.

Trong nghiên cứu hiện tại, sự ra hoa *in vitro* của cây chanh dây tím lần đầu tiên được ghi nhận từ các mẫu cây chồi trong môi trường bổ sung AgNPs. Trong nuôi cấy mô thực vật, bạc thường được sử dụng dưới dạng AgNO₃ hoặc Ag₂O₃S₂; nhưng Ag₂O₃S₂ được báo cáo có tính di động cao hơn so với AgNO₃ [168]. Ở *Capsicum*, Ag₂O₃S₂ tỏ ra hiệu quả hơn AgNO₃ trong việc tăng cường ra hoa *in vitro* [2]. Mặt khác, AgNPs có kích thước từ 1 đến 100 nm với tính di động cao và thể hiện các đặc tính vật lý, hóa học và sinh học độc đáo [56] được kỳ vọng có tiềm năng lớn trong sự phát triển của cây trồng cũng như quá trình ra hoa của thực vật [160]. Ngan và cộng sự (2019) cũng đã báo cáo về sự ra hoa *in vitro* từ các chồi 1,5 cm của cây *Rosa hybrida* được nuôi cấy trên môi trường ½ MS bổ sung 5 mg/L AgNPs sau 4 tuần nuôi cấy [169]. Ở cây *Dendrocalamus strictus*, việc bổ sung AgNPs ở nồng độ 6,0 mg/L đã kích thích đáng kể sự ra hoa trong điều kiện *in vitro* [61]. Kết quả nghiên cứu hiện tại cũng cho thấy môi trường nuôi cấy bổ sung AgNPs ảnh hưởng tích cực đến sự ra hoa *in vitro* ở cây chanh dây tím.

Tương tự với AgNO₃, các tác động tương tự đối với thực vật cũng được báo cáo đối với bạc ở dạng các hạt nano. AgNPs được báo cáo là có ảnh hưởng đến hoạt động ETH trên nhiều loài thực vật. Hơn nữa, sự tổng hợp PA, một yếu tố liên quan đến nhiều giai đoạn của quá trình ra hoa ở thực vật, có thể được tăng cường dựa trên ảnh hưởng của AgNPs [153]. Cả ETH và PA đều đã được báo cáo là có tác động đáng kể đến sự ra hoa ở thực vật. Mặt khác, AgNPs cũng có thể ảnh hưởng đến thực vật thông qua các quá trình khác nhau. Một số tác động phổ biến dựa trên việc sản xuất ROS và can thiệp vào cơ chế oxy hóa đã được báo cáo ở một số loài thực vật tiếp xúc với AgNPs [170]. Dưới tác động của ROS, cơ chế chống oxy hóa bao gồm sản xuất các phân tử enzyme và coenzyme được kích hoạt. Việc sản xuất các phân tử chống oxy hóa ảnh hưởng đáng kể đến sự sinh trưởng và phát triển của thực vật [171]. Cơ chế sản xuất ROS và chống oxy hóa có liên quan chặt chẽ đến phản ứng stress và làm thay đổi đáng kể quá trình ra hoa ở thực vật. AgNPs cũng có thể điều chỉnh nồng độ và đường truyền tín hiệu của các chất điều hòa sinh trưởng, từ đó thúc đẩy sự ra hoa *in vitro* [61]. Ngoài ra, sự tương tác giữa ROS và tín hiệu hormone nội sinh tham gia vào quá trình phối hợp các phản ứng thích nghi của thực vật [172]. Những thay đổi về hàm lượng các hormone nội sinh như auxin, cytokinin, GAs và ABA đã được ghi

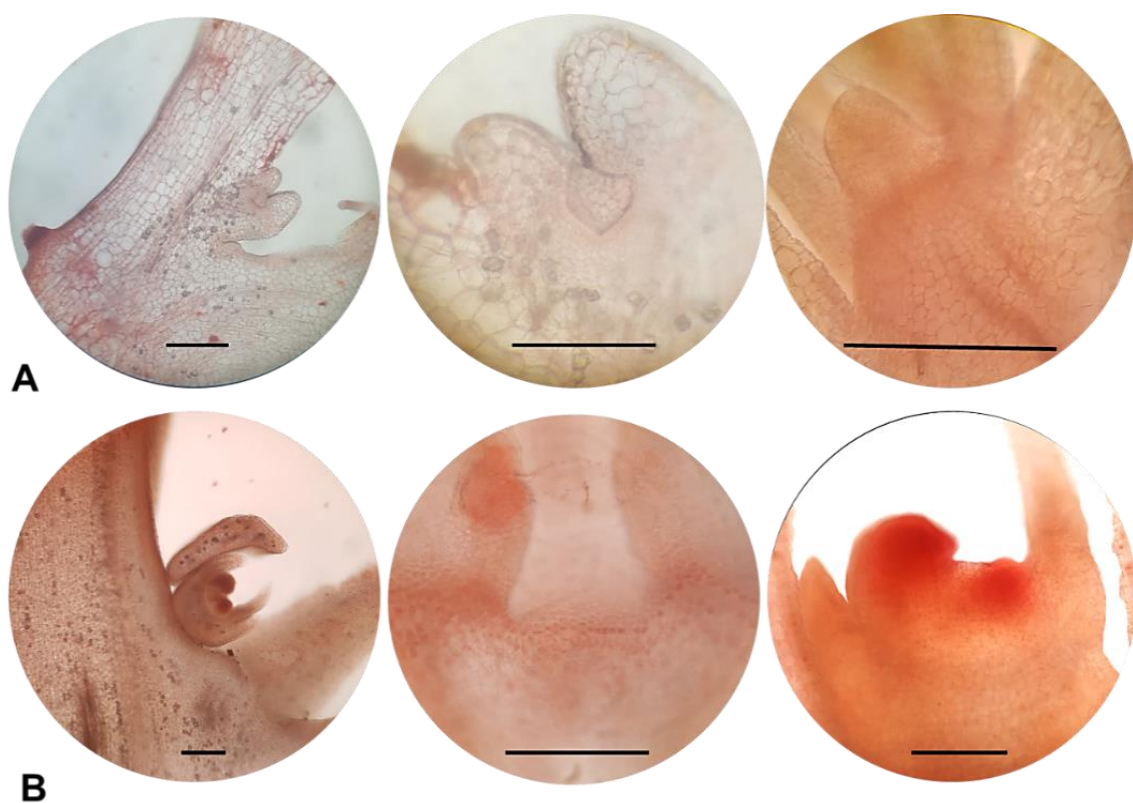
nhận ở một số loài thực vật tiếp xúc với AgNPs [152, 173]. Điều này cho thấy AgNPs có thể ảnh hưởng đến sự cân bằng hormone nội sinh, từ đó có thể ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và ra hoa ở thực vật. Ngoài ra, Salachna và cộng sự (2019) đã báo cáo rằng AgNPs có liên quan đến điều chỉnh việc kích hoạt các gen thiết yếu tham gia vào quá trình cảm ứng ra hoa, đẩy nhanh quá trình chuyển đổi từ giai đoạn sinh dưỡng sang giai đoạn sinh sản ở thực vật *in vitro* [60]. Vì vậy, có thể thấy rằng AgNPs có thể tác động đến quá trình ra hoa *in vitro* thông qua tương tác với nhiều yếu tố. Tuy nhiên, cơ chế chính xác của sự ra hoa *in vitro* của cây chanh dây tím dưới tác động của AgNPs cần được nghiên cứu để làm rõ trong các nghiên cứu sâu hơn.

Sự hình thành chồi hoa in vitro trong môi trường bổ sung AgNPs



Hình 3.15. Sự hình thành và phát triển của chồi hoa *in vitro* trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs. **A.** Vị trí hình thành các chồi hoa *in vitro*. **B.** Chồi sinh dưỡng phát triển khi chồi hoa không hình thành. **C.** Sự hình thành chồi hoa ở ngọn chồi sau 45 ngày nuôi cấy. **D.** và **E.** Sự hình thành chồi hoa ở đốt thân sau 45 ngày nuôi cấy (1 - vị trí thân, 2 - vị trí vảy, 3 - vị trí lá, 4 - vị trí chồi sinh dưỡng, 5 - vị trí chồi hoa). (Thước 1 cm). (Mũi tên đỏ chỉ vị trí của chồi hoa).

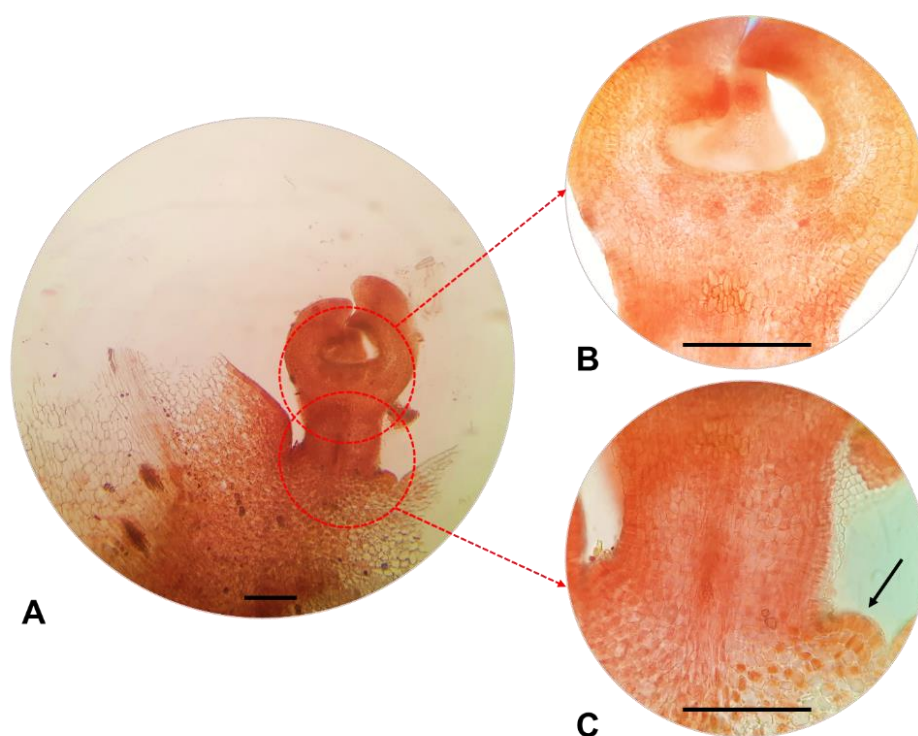
Một số ghi nhận ở nghiên cứu này cũng tiết lộ một số đặc điểm của quá trình hình thành chồi hoa dưới tác động của AgNPs. Kết quả quan sát cho thấy các chồi hoa được cảm ứng tại vị trí dưới nách lá ở các đốt gần với ngọn chồi. Ở chồi không cảm ứng ra hoa, các chồi sinh dưỡng thường được hình thành phát triển ở các đốt thân (Hình 3.15). Tại thời điểm sau 40 - 45 ngày nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*, kết quả giải phẫu cho thấy sự chuyển đổi rõ rệt từ chồi sinh dưỡng sang chồi hoa trong môi trường nuôi cấy bổ sung 7,0 mg/L AgNPs. Các chồi hoa có đỉnh sinh trưởng mở rộng, phình to lên theo dạng hình vòm và hình thành sơ khởi hoa (Hình 3.16 và 3.17).



Hình 3.16. Sự chuyển đổi từ chồi sinh dưỡng sang chồi sinh sản sau 40 - 45 ngày nuôi cấy. **A.** Chồi sinh dưỡng. **B.** Chồi hoa. (Thước: 40 μ m).

Trong giai đoạn sinh dưỡng, SAM thúc đẩy sự hình thành liên tục của lá và thân (bao gồm các đốt và lóng), với sự phát triển của lá là dấu hiệu đặc trưng của giai đoạn này. Sự điều hòa của sự phân hóa lá và hình thái lá phức tạp tiếp theo sẽ hình thành nên hình dạng của cây trong giai đoạn sinh dưỡng. Khi bắt đầu giai đoạn chuyển đổi từ sinh dưỡng sang sinh sản, SAM thay đổi bản sắc sinh dưỡng hiện tại để cam kết hình thành mô phân sinh hoa và bắt đầu hình thành sơ khởi hoa. Quá trình chuyển đổi giai đoạn phát triển tác động đáng kể đến gần như tất cả các thông số phát triển

của SAM. Khi bắt đầu quá trình chuyển đổi phát triển, hình dạng của SAM là sự thay đổi hình thái rõ ràng nhất được quan sát thấy. Trong quá trình chuyển đổi này, SAM mở rộng và có hình dạng giống như mái vòm tròn trịa hơn. Các vùng mô riêng biệt với các hoạt động phân bào đa dạng đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy những thay đổi hình thái này trong SAM. Quá trình ra hoa này thể hiện bước đầu tiên trong quá trình sinh sản của thực vật và được điều chỉnh chặt chẽ bởi các tín hiệu môi trường và giai đoạn phát triển của cây [174].

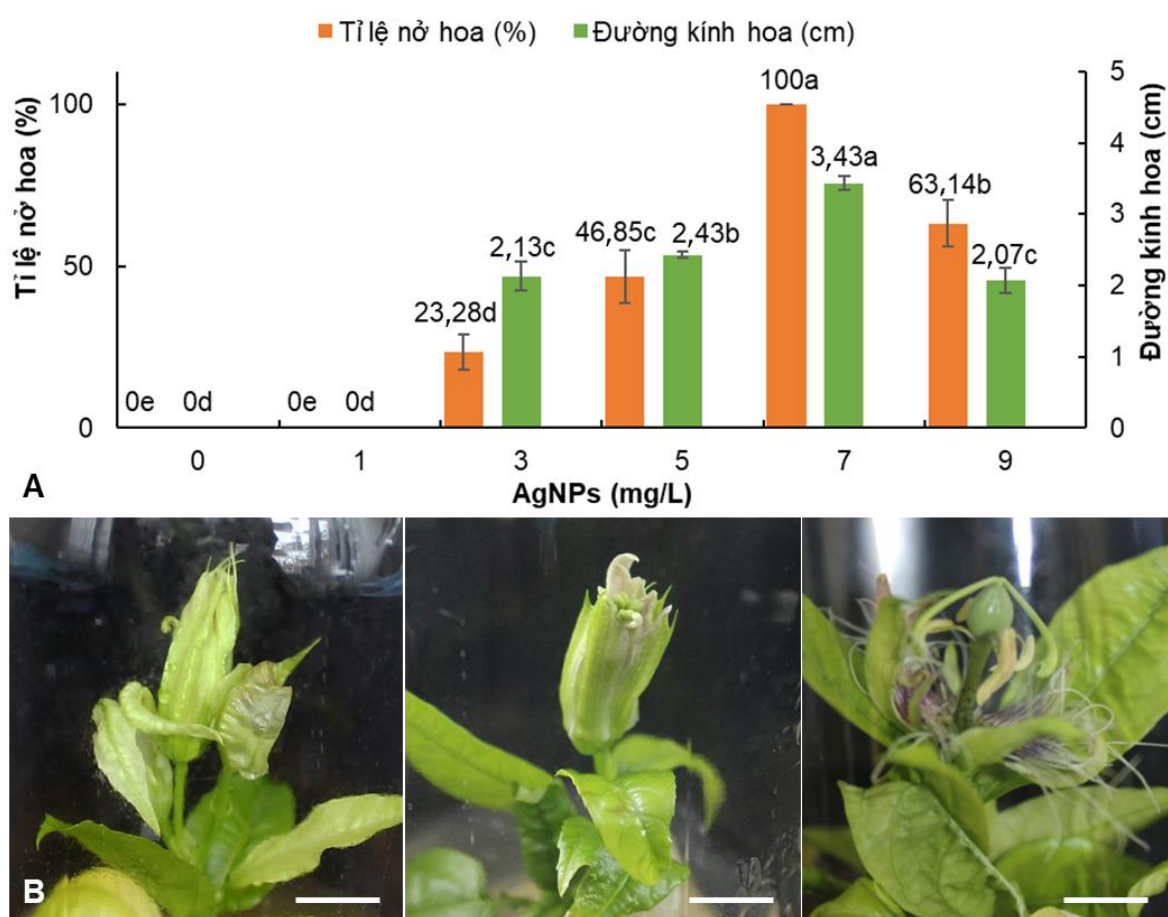


Hình 3.17. Giải phẫu chồi hoa từ chồi *in vitro* nuôi cấy trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs sau 45 ngày nuôi cấy. **A.** Chồi hoa. **B.** Vùng mô phân sinh mở rộng của sơ khởi hoa. **C.** Vùng mô hình thành tua cuốn (*vị trí mũi tên*) (Thước: 40 μ m).

Ngoài điều kiện tự nhiên, các chồi hoa chanh dây tím hình thành dưới các nách lá tại các vị trí đốt. Mỗi đốt bao gồm một bông hoa duy nhất, bên cạnh một tua cuốn; đây dường như là cấu tạo phổ biến được thiết lập ở loài này [129]. Trong nghiên cứu hiện tại dưới ảnh hưởng của AgNPs, kết quả phân tích giải phẫu cho thấy rằng, các sơ khởi hoa được hình thành bên cạnh mô phân sinh của tua cuốn (Hình 3.17C), tuy nhiên, các vùng mô này không tiếp tục phát triển để hình thành tua cuốn trong điều kiện *in vitro*.

Ảnh hưởng của AgNPs đến sự nở hoa *in vitro* của cây chanh dây tím

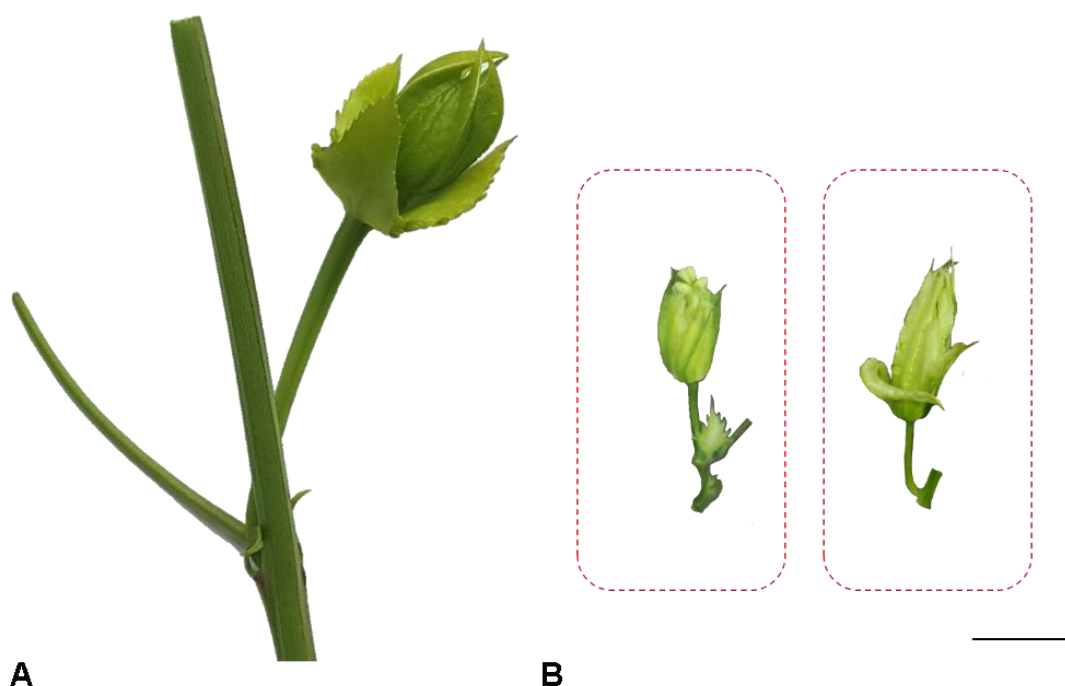
Sự nở hoa *in vitro* là một quá trình phức tạp và chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau. Trong nghiên cứu hiện tại, sự nở hoa của cây chanh dây tím đã được ghi nhận trong điều kiện *in vitro* với tỉ lệ khác nhau. Sau 70 ngày nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy tỉ lệ nở hoa (23,28 - 100%) được ghi nhận đối với các NT bổ sung AgNPs. Tỉ lệ nở hoa cao nhất (100%) được ghi nhận ở NT bổ sung 7,0 mg/L AgNPs; tuy nhiên, khi nồng độ AgNPs tăng lên 9,0 mg/L, tỉ lệ nở hoa giảm mạnh (63,14%). Ngoài ra, những hoa *in vitro* có đường kính lớn nhất (3,43 cm) cũng được quan sát thấy trong NT bổ sung 7,0 mg/L AgNPs (Hình 3.18).



Hình 3.18. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự nở hoa *in vitro* sau 70 ngày nuôi cấy. **A.** Tỉ lệ nở hoa và đường kính hoa trong môi trường nuôi cấy bổ sung các nồng độ AgNPs khác nhau. **B.** Sự nở hoa trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs (thước: 1 cm).

Một số đặc điểm khác biệt của hoa in vitro và hoa ngoài tự nhiên

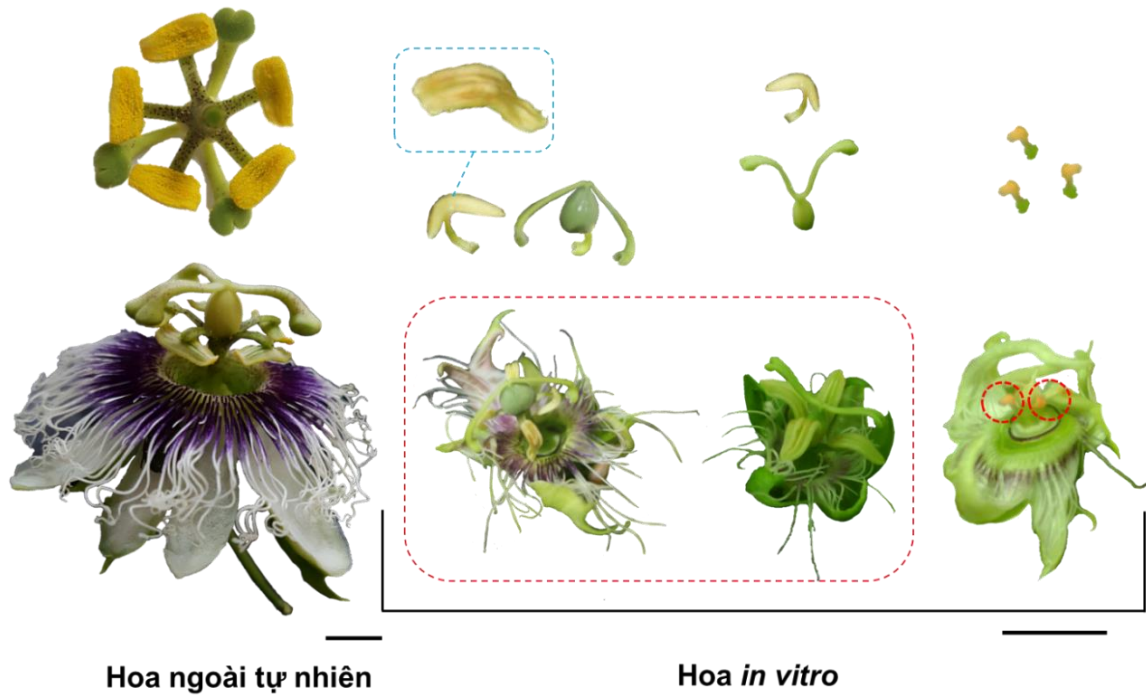
Mặt khác, khi so sánh với nụ hoa ngoài tự nhiên từ cây 2 năm tuổi cho thấy rằng, nụ hoa *in vitro* có kích thước nhỏ, các lá đài bao quanh mỏng hơn. Ngoài ra, đa số hoa *in vitro* thường khuyết thiếu các lá bắc, vị trí lá bắc sai lệch hoặc các lá bắc rụng trong quá trình phát triển của nụ hoa (Hình 3.19). Một số chương trình phát triển ở thực vật được quy nghiêm ngặt có thể bị tác động bởi các đột biến hoặc do tín hiệu môi trường. Ví dụ như sự tiêu biến các lá bắc của hoa ở các thực vật hạt kín khác nhau như một số loài cỏ và *Arabidopsis thaliana* [175]. Sự sai khác vị trí lá bắc cũng có thể do sự bất thường trong quá trình kéo dài của cuống hoa, dẫn tới vị trí các lá bắc cách xa các lá đài và nụ hoa. Tuy nhiên, hiện tượng ghi nhận trên đây cần được tiếp tục làm rõ ở các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.19. Đặc điểm của nụ hoa ngoài tự nhiên và nụ hoa *in vitro*. **A.** Nụ hoa ngoài tự nhiên từ cây 2 năm tuổi. **B.** Nụ hoa *in vitro* từ chồi ngọn sau 60 ngày nuôi cấy trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs. (Thước: 1 cm).

Ngoài ra, khi so sánh các hoa *in vitro* và hoa ngoài tự nhiên cho thấy nhiều đặc điểm khác biệt. Các hoa *in vitro* có kích thước nhỏ hơn, đồng thời một số hoa *in vitro* có những đặc điểm bất thường so với hoa ngoài tự nhiên. Ở điều kiện bình thường, hoa chanh dây tím ngoài tự nhiên bao gồm năm nhị hoa với bao phấn lớn chứa phấn hoa. Một nhụy có ba vòi nhụy kéo dài từ bầu nhụy, mỗi nhánh kết thúc bằng một đầu

nhụy (Hình 3.20). Đối với hoa *in vitro*, một số đặc điểm sai khác điển hình như sự ít đi của các hạt phấn, sự tiêu biến của cánh hoa, sự thiếu đi một vòi nhụy hoặc chỉ nhị, hoặc sự kém phát triển của các bao phấn đã được ghi nhận (Hình 3.20).



Hình 3.20. Một số đặc điểm của hoa chanh dây ngoài tự nhiên từ cây 2 năm tuổi và hoa từ chồi *in vitro* (Thước: 2 cm).

Hiện tại, các nghiên cứu về sự phát triển của hoa dưới tác động của AgNPs còn rất hạn chế. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã ghi nhận về việc hình thành các hoa bất thường dưới tác động của AgNO_3 . Các chồi hoa hồng *in vitro* hình thành hoa bất thường với tần số tăng lên khi nồng độ AgNO_3 tăng. Ngoài ra, số lượng cánh hoa thu được giảm và màu sắc cánh hoa thay đổi so với hoa ngoài tự nhiên [163].

ETH cũng có tác động đáng kể đối với sự phát triển của hoa. ETH có liên quan đến sự phát triển của tế bào cánh hoa và các nghiên cứu gần đây cho thấy ETH là chất điều hòa các gen liên quan đến sự phát triển của hoa [43]. Những nhận định này trùng khớp với kết quả của nghiên cứu này, những bất thường về cánh hoa không phát triển hoặc cánh hoa bị khuyết đã được quan sát. Do đó, các thay đổi ở hoa *in vitro* trên cây chanh dây tím có thể liên quan đến sự thay đổi ETH dưới tác động của AgNPs.

Hoa phát triển từ các vùng tế bào chưa biệt hóa hình thành ở hai bên sườn của mô phân sinh tiền hoa; những tế bào này biệt hóa thành các cơ quan hoa khác nhau. Nhiều mô hình để giải thích các sự bất thường của cơ quan hoa gắn liền với sự biểu hiện của các nhóm gen liên quan. Những đặc điểm bất thường về cánh hoa, nhị và nhụy ở hoa chanh dây tím *in vitro* có thể liên quan đến sự biểu hiện của các gen xác định cơ quan hoa như *AGAMOUS*, *APETALA*, *PISTILLATA*, *SEPALLATA* [30, 31]. Mặt khác, những biến đổi DNA/RNA/protein ở thực vật cũng được báo cáo khi tiếp xúc với AgNPs [176]. Mặc dù các báo cáo hiện tại về tác động của AgNPs đối với sự biểu hiện của các gene xác định cơ quan hoa rất hạn chế, nhưng tác động của AgNPs đối với sự biểu hiện gene đã được báo cáo gợi lên khả năng có thể có sự biến đổi đối với nhóm gene này. Mặt khác, AgNPs được chứng minh là kích hoạt các gen liên quan đến cả phản ứng stress oxy hóa và điều hòa các gen liên quan đến phản ứng truyền tín hiệu và hormone [176]. AgNPs có thể ảnh hưởng đến các gen này, từ đó tác động gián tiếp đến sự phát triển của hoa. Tuy nhiên, những giả thuyết này yêu cầu nhiều bằng chứng hơn để có thể xác định. Do đó, để có thể hiểu rõ được cơ chế đối với sự bất thường của các hoa chanh dây tím *in vitro*, các nghiên cứu liên quan biểu hiện gen cần được thực hiện trong những nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2.3. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tạo quả *in vitro*

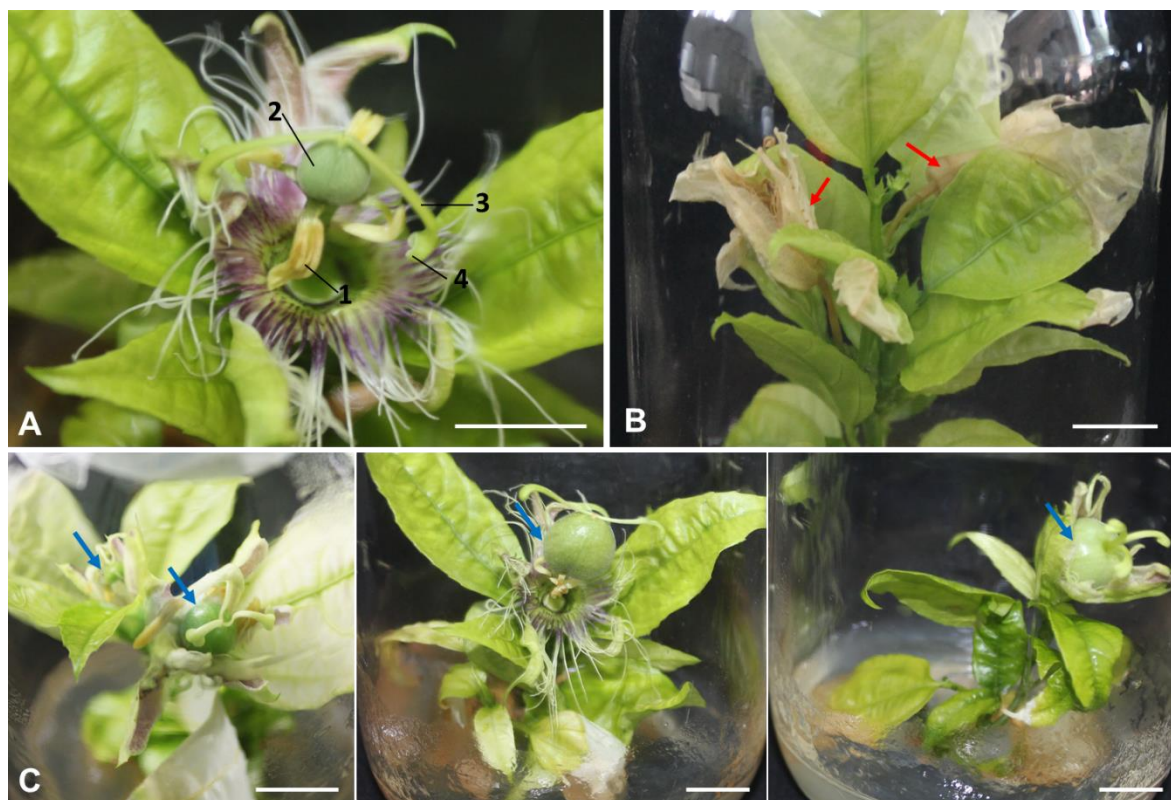
Kết quả ghi nhận sau 90 ngày nuôi cấy cho thấy rằng hầu hết các hoa *in vitro* có các cơ quan sinh sản như bầu nhụy, vòi nhụy và bao phấn có khả năng hình thành quả non (Hình 3.21). Những hoa có những bất thường về nhị thường không có khả năng tạo quả *in vitro*. Đồng thời, những hoa không tạo quả có dấu hiệu héo và rụng sau khi nở hoa (Hình 3.21B). Tỷ lệ tạo quả ở NT sử dụng AgNPs ở nồng độ thích hợp cao hơn đáng kể so với đối chứng. Trong đó, NT sử dụng 7,0 mg/L AgNPs cho tỷ lệ tạo quả (56,79%), số quả (1,67 quả/chồi) và đường kính quả (1,13 cm) cao nhất. Tuy nhiên, khi nồng độ AgNPs tăng lên 9 mg/L thì tỷ lệ tạo quả có xu hướng giảm (33,53%) (Bảng 3.7).

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của AgNPs đến quá trình tạo quả *in vitro* sau 90 ngày nuôi cấy.

| AgNPs (mg/L) | Tỉ lệ tạo quả (%) | Số quả /chồi | Đường kính quả (cm) |
|-----------------|----------------------|-------------------|------------------------|
| 0 | 0,00 ^{d*} | 0,00 ^c | 0,00 ^d |
| 1,0 | 0,00 ^d | 0,00 ^c | 0,00 ^d |
| 3,0 | 20,09 ^c | 1,00 ^b | 0,07 ^c |
| 5,0 | 35,82 ^b | 1,00 ^b | 0,77 ^b |
| 7,0 | 56,79 ^a | 1,67 ^a | 1,13 ^a |
| 9,0 | 33,53 ^b | 1,00 ^b | 0,83 ^b |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b,...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).

Các kết quả hiện tại cho thấy lần đầu tiên quả non trong điều kiện *in vitro* của cây chanh dây tím được hình thành. Tương tự, sự tạo quả cũng đã được quan sát thấy trong quá trình nuôi cấy *in vitro* ở một số loài thực vật khác như *Phyllanthus niruri* [65], *Cleome viscosa* [7], *Scrophularia takesimensis* [69], *Withania somnifera* [8], *Capsicum* spp. [2], *Solanum* spp. [10]. Một số báo cáo đã chỉ ra rằng sự tích tụ AgNPs trong thực vật có ảnh hưởng lâu dài đến một số giai đoạn phát triển tiếp theo của chúng. Chẳng hạn, Cuong và cộng sự (2021) đã báo cáo rằng việc bổ sung AgNPs không chỉ làm tăng sự hình thành thân rễ *in vitro* mà còn cải thiện tỉ lệ sống của cây con và hàm lượng saponin trong sâm Ngọc Linh [58]. Sự tích lũy AgNPs trong giai đoạn nhân chồi cũng ảnh hưởng tích cực đến giai đoạn ra rễ của cây dâu tây [57]. Kết quả hiện tại cũng chỉ ra rằng AgNPs được bổ sung vào môi trường nuôi cấy không chỉ thúc đẩy giai đoạn ra hoa mà còn ảnh hưởng tích cực đến quá trình tạo quả *in vitro* của chanh dây tím.

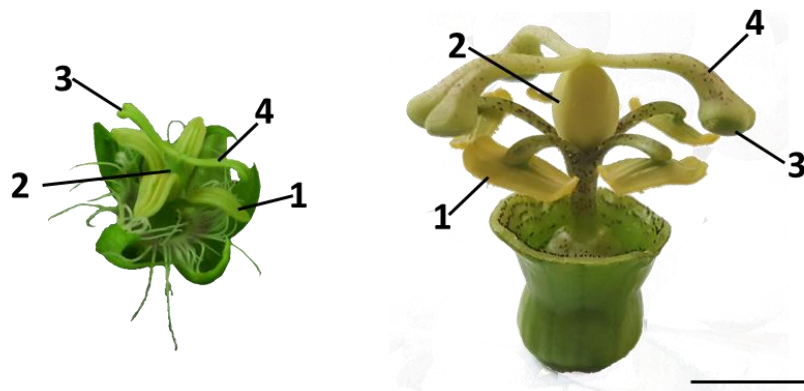


Hình 3.21. Sự nở hoa và tạo quả *in vitro* trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs. **A.** Hoa *in vitro* có đầy đủ nhị và nhụy (1- bao phấn, 2- bầu nhụy, 3- vòi nhụy, 4- đầu nhụy). **B.** Sự tàn héo của hoa không tạo quả được ghi nhận sau khi nở 10 ngày. **C.** Quả non hình thành được ghi nhận sau 20 ngày hoa nở. (Thước: 1 cm). (Mũi tên đỏ chỉ vị trí của hoa, mũi tên xanh chỉ vị trí của quả).

Sự tạo quả *in vitro* ở thực vật có thể chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố tác động. Chẳng hạn, sự thụ phấn và tạo quả ở nhiều loài thực vật phụ thuộc nhiều vào tuổi thọ của hoa [62]. Tuy nhiên, tuổi thọ của hoa phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là hàm lượng ETH [146]. Ion bạc được cho là có ảnh hưởng đến hoạt động của ETH, do đó tác động đến quá trình ra hoa *in vitro* ở những loài thực vật nhạy cảm với ETH [2]. Sreelekshmi và Siril (2021) đã báo cáo sự gia tăng tuổi thọ của hoa *in vitro* ở *Dianthus chinensis* được nuôi cấy trong môi trường bổ sung AgNO_3 [11]. Hợp lực giữa $\text{Ag}_2\text{O}_3\text{S}_2$ và BA cũng được báo cáo để cải thiện khả năng tạo quả *in vitro* ở *Solanum americanum* và *Solanum villosum* [10]. Mặt khác, AgNPs được ghi nhận đã ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng ETH trong quá trình vi nhân giống của nhiều loài thực vật [58, 143, 145, 177]. Vì vậy, việc bổ sung AgNPs trong môi trường nuôi cấy có thể ảnh hưởng đến quá trình này, từ đó tác động đến khả năng ra hoa và tạo quả *in vitro*.

Mặt khác, sự tạo quả *in vitro* thành công ở thực vật phụ thuộc đáng kể vào khả năng thụ phấn của hoa. Chẳng hạn, ở một số loài thực vật như *Ipomoea quamoclit* [178], quá trình tự thụ phấn *in vitro* bị ức chế do thiếu tác nhân thụ phấn; Ngược lại, sự tạo quả *in vitro* có thể xảy ra mà không cần các tác nhân thụ phấn ở *Withania* [179]. Chanh dây tím là loài tự thụ phấn, tuy nhiên sự có mặt của tác nhân thụ phấn ngoài tự nhiên sẽ tăng đáng kể tỉ lệ đậu quả (trung bình hơn 80%). Do đó, trong điều kiện *in vitro*, sự tạo quả có thể sụt giảm do thiếu tác nhân thụ phấn.

Đặc điểm của cấu trúc hoa là một trong những yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến khả năng thụ phấn ở thực vật. Vì vậy, các hoa chanh dây tím *in vitro* với một số đặc điểm khác biệt được ghi nhận trong nghiên cứu này có thể ảnh hưởng đến quá trình này. Chẳng hạn, các đặc điểm bất thường của hoa *in vitro* như sự kém phát triển của bao phấn có thể gây bất lợi đối với quá trình thụ phấn (Hình 3.20). Ngược lại, đối với hoa ngoài tự nhiên, bề mặt bao phấn có xu hướng úp xuống, điều này gây cản trở đối với quá trình thụ phấn. Trong khi đó, bề mặt bao phấn của các hoa *in vitro* có xu hướng ngửa, điều này có thể thuận lợi cho sự tiếp xúc giữa đầu nhụy và hạt phấn (Hình 3.22). Bên cạnh đó, một số đặc điểm của hạt phấn, độ cong của vòi nhụy cũng được chứng minh là có ảnh hưởng đến sự thụ phấn của hoa. Mặt khác, độ ẩm cao trong bình nuôi cấy có thể ảnh hưởng đến quá trình tiếp xúc giữa hạt phấn và đầu nhụy. Do đó, ảnh hưởng của cấu trúc hoa trong điều kiện *in vitro* đối với hiệu quả thụ phấn của chanh dây tím cần được nghiên cứu thêm trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.22. Mặt bao phấn hướng lên ở hoa *in vitro* (trái) và hướng xuống ở hoa ngoài tự nhiên (phải) (1- bao phấn, 2- bầu nhụy, 3- vòi nhụy, 4- đầu nhụy). (Thước: 1 cm).

Ngoài ra, cơ chế di truyền phổ biến ở chanh dây (tính bất hợp - *self-incompatibility*) có thể ngăn cản quá trình tạo quả trong điều kiện *in vitro* [132]. Nhiều giống chanh dây được biết là có tính tự bất hợp, có nghĩa là hoa không thể kết trái nếu nó được thụ phấn bởi phấn hoa của chính nó [180]. Tuy nhiên, một số cá thể của loài tự bất hợp lại biểu hiện tính tự không tương thích một phần (*partial self-incompatibility*), nghĩa là chúng vẫn có khả năng tự thụ phấn nhưng số lượng hạt tạo ra khác nhau. Cơ chế tự bất hợp thường được điều khiển bởi hệ thống di truyền liên quan đến nhiều alen ở locus S. Mức độ tự bất hợp ở các loài chanh dây khác nhau giữa các giống và chúng có thể thay đổi bởi các yếu tố như nhiệt độ, tuổi cây. Nhiều loại chanh dây màu vàng không đậu quả trừ khi hoa của chúng được thụ phấn từ một cây khác có gen tương thích. Ở chanh dây tím, mức độ bất hợp diễn ra không hoàn toàn, do đó, hoa có khả năng tự thụ trong điều kiện *in vitro*. Mặt khác, AgNPs được thêm vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cao được báo cáo đã ảnh hưởng đến các sự kiện sinh hóa và gây ra các biến đổi di truyền đáng kể ở thực vật được nhân giống *in vitro* [181]. Phản ứng của thực vật đối với các AgNPs được báo cáo có liên quan đến quá trình phiên mã, thoái hóa protein, tổn thương DNA/RNA/protein và sự phân chia tế bào. AgNPs được chứng minh là kích hoạt các gen liên quan đến cả phản ứng stress kim loại và oxy hóa, tạo ra sự biểu hiện của các gen liên quan đến con đường truyền tín hiệu abscisic acid (ABA). Bên cạnh đó, nó còn ức chế sự điều hòa lên của các gen phản ứng hormone tăng trưởng trong quá trình phát triển rễ bên và điều hòa quá mức các gen liên quan đến phản ứng truyền tín hiệu và hormone, và giảm bớt hiện tượng im lặng gen phiên mã [176]. Những ghi nhận này cho thấy rằng phản ứng của thực vật với AgNPs có thể liên quan đến việc gây ra các tác động đến biểu hiện gen và cơ chế di truyền. Do đó, không loại trừ khả năng AgNPs có thể tác động đến các đặc điểm di truyền đối với sự sinh trưởng, ra hoa, tạo quả của các chồi *in vitro* của chanh dây tím.

Trong nghiên cứu này, sự hình thành quả non *in vitro* ở chồi chanh dây tím đã được ghi nhận. Tuy nhiên, để xác định một cách chính xác quá trình tạo quả thành công, các nghiên cứu để xác định khả năng và mức độ thụ phấn, thụ tinh và tạo hạt cần được nghiên cứu sâu hơn để làm rõ. Mặc dù vậy, thí nghiệm hiện tại bước đầu đã chứng minh về khả năng ra hoa và bước đầu tạo quả trong điều kiện *in vitro* ở loài

thực vật này. Các kết quả này cũng gợi ra một tiềm năng mới cho nghiên cứu trong tương lai để cải thiện khả năng tạo quả *in vitro* thông qua các biện pháp can thiệp nhân tạo, chẳng hạn như thụ phấn bằng tay hoặc nuôi cấy ra hoa *in vitro* giữa các loài mà không có rào cản đối với sự thụ phấn và thụ tinh.

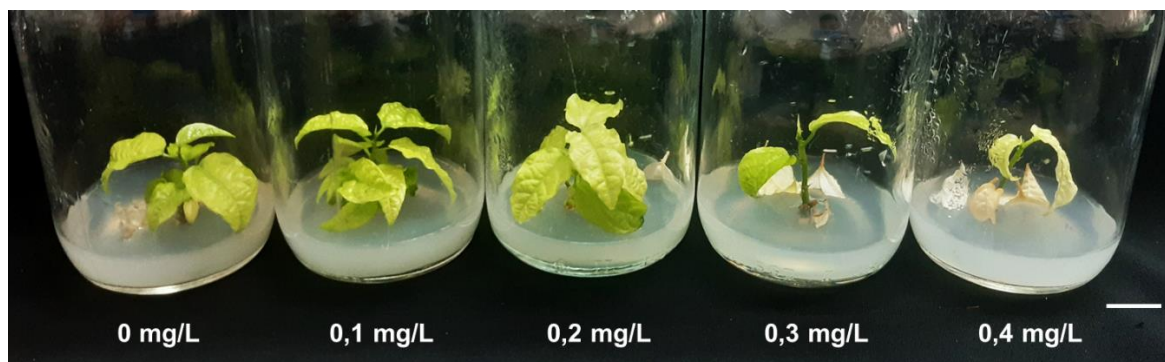
3.2.2.4. Ảnh hưởng của CoNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

Kết quả ghi nhận ở Bảng 3.8 và Hình 3.23 cho thấy rằng, việc bổ sung CoNPs tại các nồng độ thí nghiệm trong môi trường MS cơ bản ảnh hưởng đáng kể đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím sau 60 ngày nuôi cấy. Trong đó, số lá trên chồi cao nhất (8,67 lá/chồi) được ghi nhận trong môi trường bổ sung 0,1 mg/L CoNPs. Tuy nhiên, số lá trên chồi và chỉ số SPAD giảm đáng kể khi tăng nồng độ bổ sung lên 0,3 và 0,4 mg/L (22,85 và 19,82; tương ứng) so với đối chứng (27,12). Mặt khác, chiều cao cây thay đổi không đáng kể trong môi trường bổ sung các nồng độ CoNPs.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của CoNPs trong môi trường MS đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím sau 60 ngày nuôi cấy.

| CoNPs (mg/L) | Chiều cao chồi (cm) | Số lá/chồi | SPAD |
|-----------------|------------------------|-------------------|---------------------|
| 0 | 2,07 ^{a*} | 6,67 ^b | 27,12 ^a |
| 0,1 | 2,52 ^a | 8,67 ^a | 28,31 ^a |
| 0,2 | 2,34 ^a | 7,33 ^b | 25,37 ^{ab} |
| 0,3 | 2,28 ^a | 5,33 ^c | 22,85 ^b |
| 0,4 | 2,11 ^a | 4,33 ^c | 19,82 ^c |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b,...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 3.23. Ảnh hưởng của CoNPs đến sự sinh trưởng của chồi sau 60 ngày nuôi cấy (Thước: 1 cm).

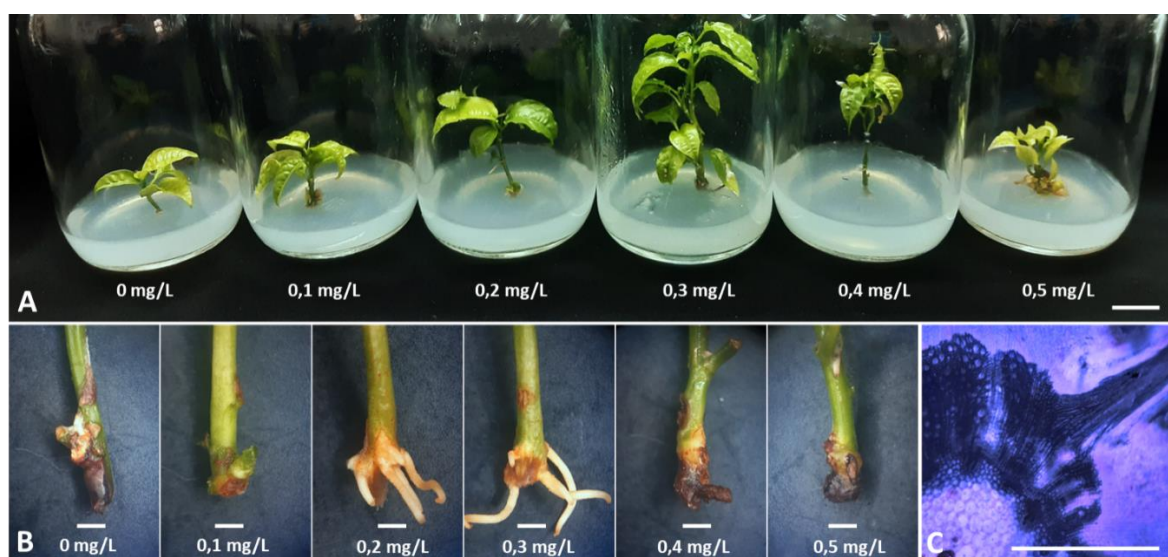
Coban là nguyên tố vi lượng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của thực vật và nó là một trong những nguyên tố vi lượng được sử dụng phổ biến trong môi trường nuôi cấy mô thực vật. Coban là thành phần quan trọng cần thiết cho một số hoạt động của enzyme và coenzyme. Các tác động tích cực khác bao gồm sự phát triển của thân, kéo dài lá mầm, hình thành chồi, tăng cường sự phát triển của thực vật khi áp dụng ngoại sinh. Tuy nhiên, hàm lượng coban cao cũng dẫn đến sự vàng lá, hoại tử và ức chế sự hình thành rễ, cản trở quá trình vận chuyển chất dinh dưỡng và hấp thu nước [182]. Sự suy giảm sinh trưởng của chồi chanh dây tím trong thí nghiệm này có thể do hàm lượng muối CoCl_2 có sẵn trong môi trường MS và việc bổ sung CoNPs ở nồng độ cao dẫn đến các tác động tiêu cực đối với sự sinh trưởng của chồi do ảnh hưởng của sự dư thừa coban.

Mặt khác, trong môi trường MS loại bỏ muối CoCl_2 , kết quả ghi nhận ở Bảng 3.9 và Hình 3.24A cho thấy rằng, chiều cao của các chồi nuôi cấy trong môi trường bổ sung CoNPs ở nồng độ từ 0,2 mg/L đến 0,4 mg/L cao hơn đáng kể so với đối chứng. Trong đó, bổ sung 0,3 mg/L cho chiều cao chồi cao nhất (8,87 cm). Ngoài ra, số lá trên chồi cao nhất (11,67 lá/chồi) cũng được ghi nhận trong môi trường bổ sung 0,3 mg/L CoNPs. Chỉ số SPAD ở lá được cải thiện đáng kể trong môi trường bổ sung 0,3 và 0,4 mg/L CoNPs (30,37 và 29,33; tương ứng) so với đối chứng (25,53). Tuy nhiên, chỉ số SPAD giảm đáng kể trong môi trường bổ sung 0,5 mg/L CoNPs (24,82). Ngoài ra, sau 60 ngày nuôi cấy, sự cảm ứng rễ cũng được ghi nhận ở NT bổ sung 0,2 - 0,4 mg/L CoNPs; các rễ của chồi hình thành trực tiếp và không có sự hiện diện của mô sẹo ở phần gốc. Tuy nhiên, các rễ ở NT bổ sung 0,4 mg/L CoNPs có xu hướng hoá nâu (Hình 3.24B, C).

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của CoNPs trong môi trường MS không bổ sung CoCl_2 đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím sau 60 ngày nuôi cấy.

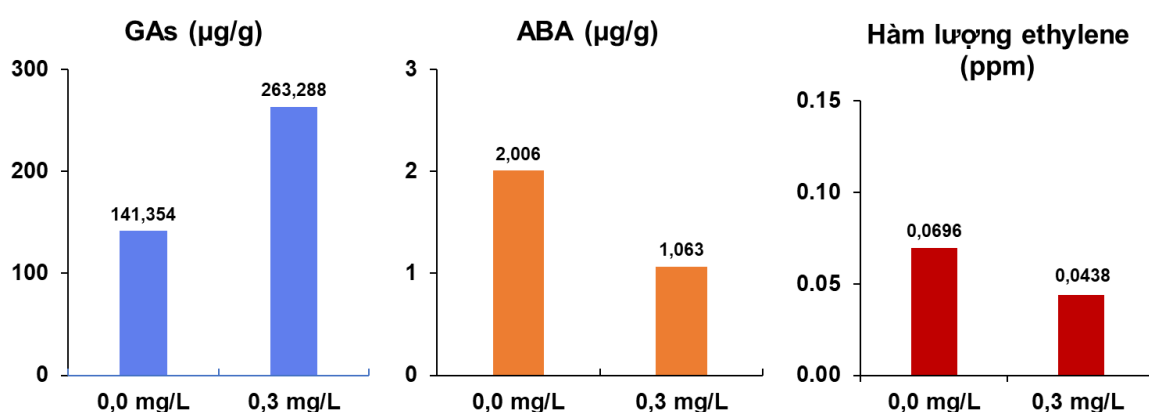
| CoNPs (mg/L) | Chiều cao chồi (cm) | Số lá/chồi | SPAD |
|--------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| 0 | 1,97 ^{c*} | 4,67 ^c | 25,53 ^c |
| 0,1 | 2,12 ^c | 7,33 ^{bc} | 27,66 ^b |
| 0,2 | 6,53 ^b | 7,00 ^{bc} | 28,11 ^{ab} |
| 0,3 | 8,87 ^a | 11,67 ^a | 30,37 ^a |
| 0,4 | 7,27 ^b | 8,67 ^b | 29,33 ^a |
| 0,5 | 2,03 ^c | 8,00 ^{bc} | 24,82 ^c |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b, ...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 3.24. Ảnh hưởng của CoNPs trong môi trường không bổ sung CoCl_2 đến sự sinh trưởng của chồi sau 60 ngày nuôi cấy. **A.** Chồi *in vitro* trong môi trường bổ sung các nồng độ CoNPs khác nhau (Thước: 1 cm). **B.** Sự hình thành rễ trong môi trường bổ sung các nồng độ CoNPs khác nhau (Thước: 1 mm). **C.** Hình ảnh giải phẫu sự hình thành rễ trong môi trường bổ CoNPs (Thước: 100 μm).

Kết quả phân tích cũng cho thấy CoNPs cũng ảnh hưởng tới hàm lượng của một số hormone nội sinh tích lũy trong chồi. Các chồi được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 0,3 mg/L CoNPs cho thấy hàm lượng GAs nội sinh (263,288 $\mu\text{g/g}$) cao hơn đối chứng (141,354 $\mu\text{g/g}$) và hàm lượng ABA nội sinh (1,063 $\mu\text{g/g}$) thấp hơn so với đối chứng (2,006 $\mu\text{g/g}$) sau 60 ngày nuôi cấy. Ngoài ra, hàm lượng ETH tích lũy trong bình nuôi cấy tại NT bổ sung 0,3 mg/L CoNPs (0,0438 ppm) cũng thấp hơn so với NT không bổ sung CoNPs (0,0696 ppm) (Hình 3.25).



Hình 3.25. Hàm lượng GAs, ABA của chồi và hàm lượng ETH tích lũy trong bình nuôi cấy ở nghiệm thức bổ sung 0,3 mg/L CoNPs và đối chứng.

Tuy nhiên, các chồi trong môi trường MS cơ bản hoặc MS loại bỏ CoCl_2 được bổ sung CoNPs tại các nồng độ thí nghiệm đều không ghi nhận sự ra hoa *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.23 và 3.24A). Tương tự như bạc, coban cũng gây ảnh hưởng đến hoạt động của ETH. Trong khi bạc dễ gây rối loạn hoạt tính của protein thụ thể của ETH thì coban ức chế quá trình tổng hợp ETH [48]. ETH được báo cáo có vai trò kích thích hoặc gây ức chế sự ra hoa tùy thuộc vào loài thực vật [2]. Việc bổ sung coban ngoại sinh trong môi trường MS đã làm tăng sự ra hoa *in vitro* trên cây ớt (*Capsicum frutescens*) sau 25 ngày nuôi cấy [50]. Trong nghiên cứu này, các chồi chanh dây tím không ra hoa *in vitro* trong môi trường bổ sung CoNPs tại các nồng độ thí nghiệm, mặc dù sự ra hoa được quan sát trên môi trường chứa AgNPs. Điều này gợi ý rằng hai loại nano kim loại này tác động đến sự ra hoa theo cách thức khác nhau và phụ thuộc vào loài thực vật và nồng độ bổ sung.

Ngoài ra, hàm lượng GAs ở chồi trong môi trường bổ sung CoNPs cao hơn so với đối chứng; trong khi hàm lượng GAs ở chồi ra hoa trong môi trường bổ sung

AgNPs thấp hơn so với đối chứng. Điều này gợi lên rằng hàm lượng GAs tăng trong chồi có thể cản trở đến sự ra hoa *in vitro* ở cây chanh dây tím. Điều này cũng đồng thuận với các thí nghiệm phía trên, khi chồi được bổ sung GA₃ ngoại sinh ở tất cả các nồng độ đều không ghi nhận sự ra hoa *in vitro*. Tuy nhiên, để có thể hiểu được chính xác các ảnh hưởng của GAs đến quá trình này, các yếu tố liên quan đến hàm lượng GAs qua từng giai đoạn phát triển của chồi và từng nồng độ của các hạt nano bổ sung cần được đánh giá trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của Spermidine đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

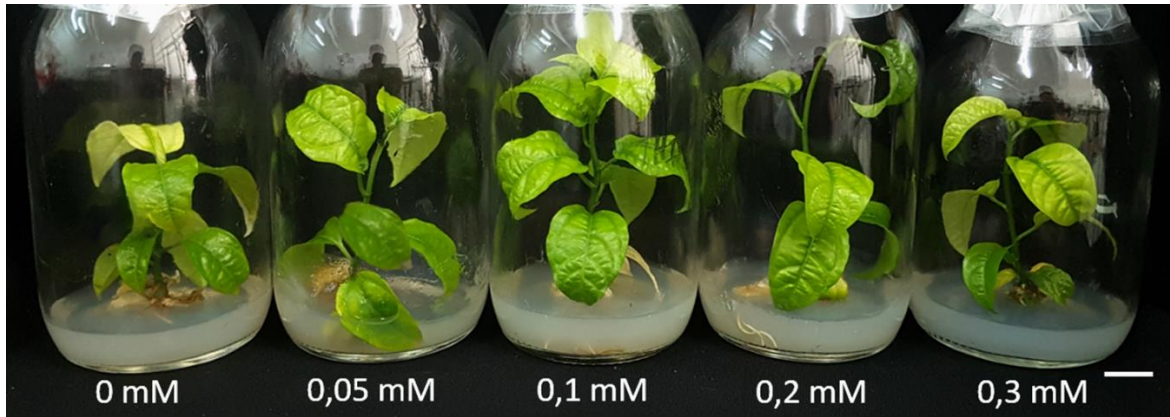
3.2.3.1. Ảnh hưởng của Spd đơn lẻ đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

Kết quả ghi nhận cho thấy rằng, chiều cao chồi được cải thiện đáng kể trong môi trường bổ sung Spd sau 90 ngày nuôi cấy. Cụ thể, bổ sung Spd ở nồng độ từ 0,05 - 0,2 mM cho chiều cao chồi (5,77 - 8,87 cm) cao hơn đáng kể so với NT đối chứng (5,13 cm). Số lá trên chồi cao nhất (10,33 lá/chồi) được ghi nhận trong môi trường bổ sung 0,1 mM Spd. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy chỉ số SPAD tăng đáng kể trong môi trường bổ sung 0,1 mM và 0,2 mM Spd (33,75 và 32,94; tương ứng). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ Spd lên 0,3 mM, kết quả ghi nhận một sự sụt giảm đáng kể cả về chiều cao của chồi và chỉ số SPAD ở lá (Bảng 3.10 và Hình 3.26).

Bảng 3.10 Ảnh hưởng của Spd đến sự sinh trưởng của chồi sau 90 ngày nuôi cấy.

| Spd (mM) | Chiều cao chồi (cm) | Số lá/chồi | SPAD |
|----------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 0,0 | 5,13 ^{c*} | 8,67 ^b | 26,40 ^c |
| 0,05 | 5,77 ^b | 8,33 ^b | 29,98 ^b |
| 0,1 | 8,50 ^a | 10,33 ^a | 33,75 ^a |
| 0,2 | 8,87 ^a | 8,00 ^b | 32,94 ^a |
| 0,3 | 5,57 ^{bc} | 8,33 ^b | 29,21 ^b |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b,...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 3.26. Chồi *in vitro* trong môi trường bổ sung các nồng độ Spd khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy (Thước: 1 cm).

Các PA phổ biến nhất ở thực vật bậc cao bao gồm Put, Spm, Spd. Các PA này được nghiên cứu và xem như là PGR. Chúng đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật bao gồm phân chia tế bào, phát sinh hình thái, sinh trưởng và sự lão hóa [46]. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung Spd tại nồng độ thích hợp cho thấy một số tác động tích cực trong việc tăng cường chiều cao, số lá và chỉ số SPAD ở chồi chanh dây tím sau 90 ngày nuôi cấy.

Mặt khác, Spd cũng được báo cáo có tác động đáng kể đối với quá trình sinh trưởng và ra hoa ở nhiều loài thực vật. Chẳng hạn, sự kéo dài chồi, tăng hình thành chồi và sự ra hoa *in vitro* (57,14%) được báo cáo trên cây *Aerva javanica* nuôi cấy trong môi trường bổ sung 0,5 mg/L Spd [183]. Việc bổ sung Spd qua rễ trong giai đoạn ra hoa sẽ dẫn đến sự ra hoa chậm ở cây *Arabidopsis* [184]. Một số nghiên cứu khác cho rằng việc bổ sung PA kết hợp với các tác nhân khác sẽ làm tăng hiệu quả của chúng. Chẳng hạn, sự khởi đầu của mầm hoa được tăng cường từ các mẫu cây biểu bì cây *Nicotiana tabacum* được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 5 μ M Spd, nhưng Spd chỉ cho thấy tác dụng của nó khi có 10 μ M kinetin được bổ sung trong môi trường nuôi cấy [185]. Qin và cộng sự (2019) đã báo cáo rằng Spd đã tăng mức Spd nội sinh trong chồi trong giai đoạn cuối của quá trình cảm ứng ra hoa ở *Malus domestica*; tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể nào trong quá trình cảm ứng ra hoa và thậm chí còn có xu hướng giảm đáng kể [45]. Ngược lại, sự ra hoa sớm ở cây *Polianthes tuberosa* được cho là có liên quan đến sự gia tăng Spd nội sinh [186].

Trong nghiên cứu hiện tại, việc bổ sung Spd đơn lẻ trong giới hạn của thí nghiệm không phải là yếu tố kích thích sự cảm ứng ra hoa *in vitro* đối với cây chanh

dây tím sau 90 ngày nuôi cấy. Những kết quả trái ngược này cho thấy tác động của Spd đối với sự ra hoa khác nhau và phụ thuộc đáng kể vào nồng độ bổ sung, kiểu gen thực vật, giai đoạn của quá trình sinh lý và các yếu tố cần thiết cho sự ra hoa ở từng loài thực vật.

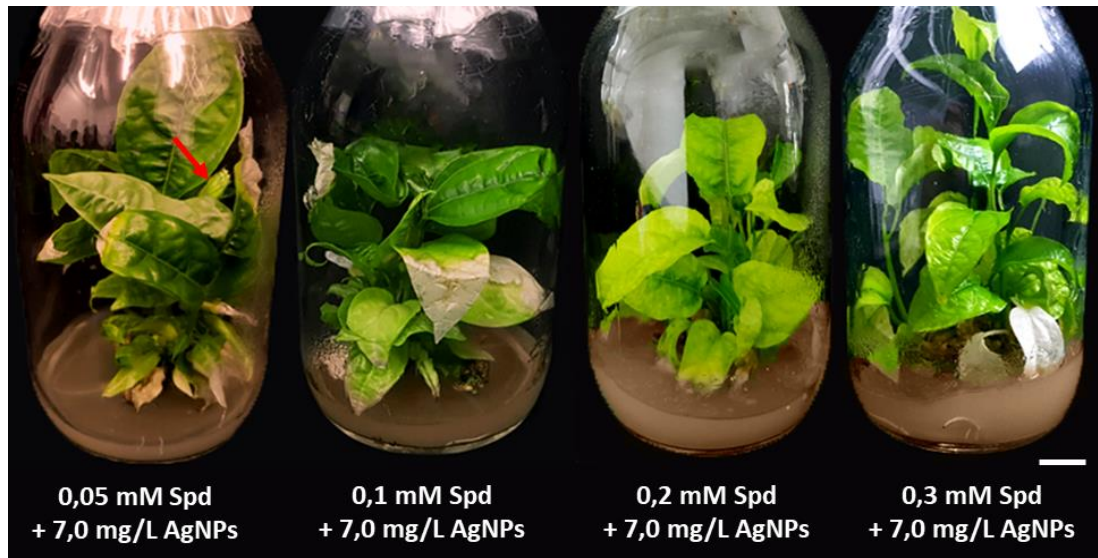
3.2.3.1. Ảnh hưởng của Spd kết hợp với AgNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa và tạo quả *in vitro*

Trong các thí nghiệm trước, sự ra hoa *in vitro* ở chanh dây tím được ghi nhận tối ưu trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs. Trong thí nghiệm này, các nồng độ Spd khác nhau sẽ được bổ sung kết hợp với 7,0 mg/L AgNPs để khảo sát sự ra hoa *in vitro*. Kết quả cho thấy rằng, môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp Spd và AgNPs tác động đáng kể đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro* ở cây chanh dây tím. Sau 90 ngày nuôi cấy, chiều cao chồi được tăng cường đáng kể trong môi trường bổ sung Spd tại các nồng độ khác nhau. Chiều cao chồi cao nhất (9,17 cm) được ghi nhận tại NT bổ sung 0,3 mM Spd. Các NT bổ sung 0,05 và 0,1 mM cho số lá trên chồi cao (13,67 và 14,33 lá/chồi, tương ứng). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ Spd lên 0,2 và 0,3 mM, số lá trên chồi giảm đáng kể (8,00 và 8,33 chồi/mẫu, tương ứng). Mặt khác, sự ra hoa *in vitro* chỉ được ghi nhận đối với các chồi trong môi trường bổ sung kết hợp 0,05 mM Spd và 7,0 mg/L AgNPs sau 90 ngày nuôi cấy (với 17,78% số chồi ra hoa và 1,33 nụ hoa trên chồi). Các NT bổ sung kết hợp với nồng độ Spd từ 0,1 - 0,3 mM không ghi nhận sự ra hoa trong thời gian khảo sát (Bảng 3.11 và Hình 3.27).

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của Spd trong môi trường bổ sung AgNPs đến sự ra hoa *in vitro* sau 90 ngày nuôi cấy.

| AgNPs (mg/L) | Spd (mM) | Chiều cao chồi (cm) | Số lá /chồi | Tỉ lệ ra hoa (%) | Số nụ hoa /chồi |
|--------------|----------|---------------------|--------------------|------------------|-----------------|
| 7,0 | 0,05 | 8,03 ^{b*} | 13,67 ^a | 17,78 | 1,33 |
| | 0,1 | 7,90 ^b | 14,33 ^a | 0,00 | - |
| | 0,2 | 7,77 ^b | 8,00 ^b | 0,00 | - |
| | 0,3 | 9,17 ^a | 8,33 ^b | 0,00 | - |

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một ký tự (a, b,...) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test). (Tukey's test). (-) Không ghi nhận.

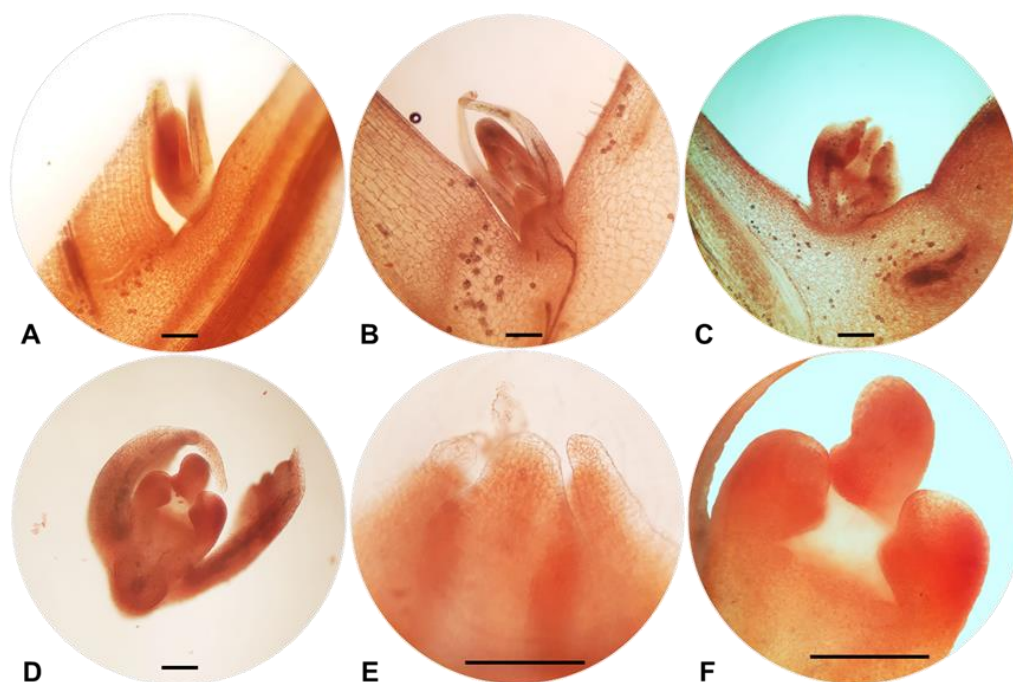


Hình 3.27. Sự sinh trưởng và ra hoa của chòi trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs kết hợp với các nồng độ Spd khác nhau sau 90 ngày nuôi cây (Thước: 1 cm).
Mũi tên chỉ vị trí của nụ hoa.



Hình 3.28. Một số đặc điểm của ngọn chòi và đốt thân của chòi chanh dây trong môi trường bổ sung 0,05 mM Spd và 7,0 mg/L AgNPs sau 60 ngày nuôi cây. **A.** Thân chòi *in vitro* (Thước: 1 cm). **B.** Đặc điểm các ngọn chòi (Thước: 1 mm). **C.** Đặc điểm các đốt thân (Thước: 1 mm). Các mũi tên chỉ vị trí của tua cuốn.

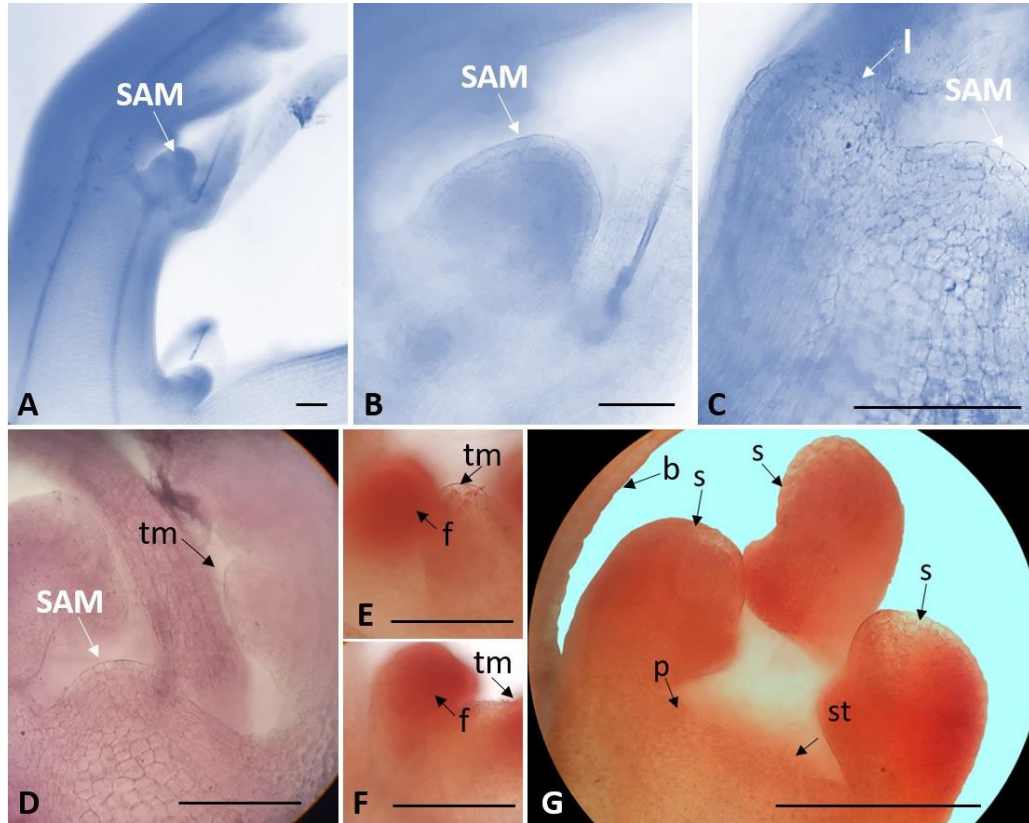
Mặt khác, quan sát một số chồi trong môi trường bổ sung 0,05 mM Spd và 7,0 mg/L AgNPs cho thấy có sự xuất hiện của các tua cuốn sau 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.28). Đây cũng là vị trí xuất hiện liền kề của các chồi hoa *in vitro* (Hình 3.29, 3.30). Ngoài điều kiện tự nhiên, các chồi hoa chanh dây tím hình thành dưới các nách lá tại các vị trí đốt. Mỗi đốt bao gồm một bông hoa duy nhất, bên cạnh một tua cuốn; đây dường như là cấu tạo phổ biến được thiết lập ở loài này [129]. Trong thí nghiệm hiện tại, sự xuất hiện của các tua cuốn của cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro* cho thấy sự sinh trưởng và phát triển gần với cấu trúc ngoài điều kiện tự nhiên. Sự xuất hiện tua cuốn này được ghi nhận trong môi trường bổ sung kết hợp AgNPs và Spd, hiện tượng này không được ghi nhận trong môi trường bổ sung AgNPs đơn lẻ ở các thí nghiệm trước. Do đó, điều này có khả năng liên quan đến những ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp của Spd đến quá trình này. Tuy nhiên, cơ chế chính xác của hiện tượng này cần được làm rõ trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.29. Hình ảnh giải phẫu của sơ khởi hoa cảm ứng từ chồi *in vitro* sau 65 ngày nuôi cấy. **A** và **B**. Chồi sinh dưỡng. **C - F**. Sơ khởi hoa. (Thước: 40 μ m).

Các kết quả giải phẫu sau 65 ngày nuôi cấy cho thấy đã có sự hình thành các sơ khởi hoa ở vị trí các đốt gần ngọn (Hình 3.29). Các sơ khởi hoa này tiếp tục phát triển để hình thành các nụ hoa hoàn chỉnh. Trong điều kiện *in vitro*, kết quả quan sát cho thấy rằng tại vị trí đốt thân chứa cụm hoa thông thường bao gồm một chồi hoa

và một chồi sinh dưỡng hoặc một chồi hoa và một tua cuốn; trong khi đối với cây ngoài tự nhiên, cấu trúc hoàn chỉnh bao gồm một chồi hoa, một tua cuốn và một chồi sinh dưỡng (Hình 3.30, 3.31).



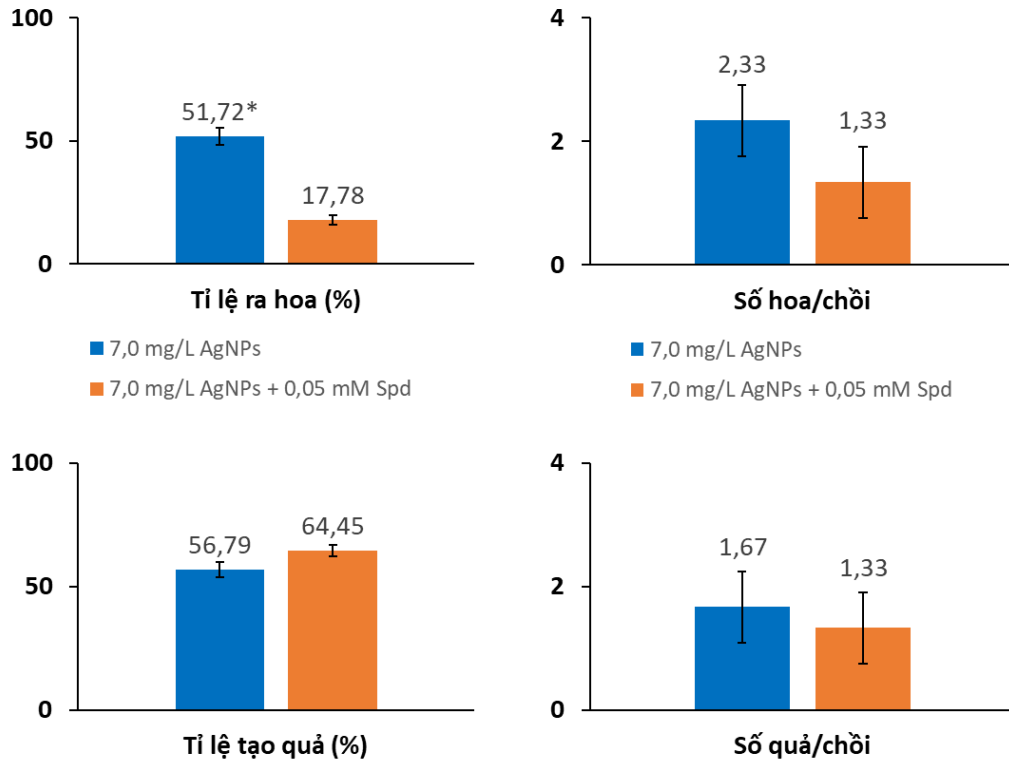
Hình 3.30. Sự chuyển đổi từ giai đoạn sinh trưởng ra giai đoạn ra hoa của chồi *in vitro*. **A, B.** Mô phân sinh đỉnh chồi (SAM). **C.** Sự phân chia tạo mô lá ở SAM. **D.** Sự hình thành mô phân sinh tua cuốn ở vùng đáy sườn của SAM. **E, F.** Sự hình thành sơ khởi hoa ở cạnh đáy sườn mô tua cuốn. **G.** Sự hình thành các mô cơ quan của hoa. *l* - lá, *tm* - tua cuốn, *f* - sơ khởi hoa, *b* - lá bắc, *s* - lá đài, *p* - cánh hoa, *st* - nhị hoa. (Thước: 40 μ m).

Đối với chồi *in vitro*, phân tích giải phẫu cho thấy SAM thúc đẩy sự hình thành liên tục của các sơ khởi lá (Hình 3.30 A-C). Tại một số đỉnh chồi, có sự xuất hiện của vùng mô phân sinh của tua cuốn tại vùng đáy sườn của SAM (Hình 3.30D), các mô phân sinh này tiếp tục phát triển tạo thành các tua cuốn *in vitro* (Hình 3.31F). Sơ khởi hoa hình thành dưới đáy sườn của mô phân sinh tua cuốn (Hình 3.30E, F). Sơ khởi hoa tiếp tục phát triển, phân hoá và hình thành các cơ quan của hoa như lá bắc, lá đài, cánh hoa, etc (Hình 3.30G).

Các nghiên cứu về sự phát triển, nguồn gốc và sự điều hòa phân tử của các tua cuốn ở thực vật còn rất hạn chế. Các nghiên cứu trên cơ sở phân tử cơ bản của sự phát triển gân cho thấy sự điều hòa phân tử của chúng rất phức tạp vì ngay cả các tua cuốn có cùng nguồn gốc sinh học cũng được kiểm soát bởi các mạng lưới gen khác nhau. Tua cuốn có thể có nguồn gốc từ lá, các nhánh bên, hoặc cụm hoa [187]. Đối với cây chanh dây, việc chuyển sang giai đoạn trưởng thành xảy ra khi mô phân sinh ở nách, ngoài mô phân sinh sinh dưỡng, còn tạo ra một tua. Mô phân sinh hoa cuối cùng phát triển sau khi bắt đầu phát triển tua cuốn, từ cùng một nhóm tế bào mô phân sinh ban đầu ở mô phân sinh nách. Điều này cho thấy các tua cuốn là một phần của cụm hoa *Passiflora* [188]. Điều này có ý nghĩa lớn đến việc phân tích các gen liên quan đến nguồn gốc của các tua ở các họ thực vật khác nhau.



Hình 3.31. Sự hình thành chồi hoa của cây chanh dây tím ở điều kiện tự nhiên và *in vitro*. Ngọn (A) và đốt thân (B, C) chứa chồi hoa của cây ngoài tự nhiên. Ngọn (D) và đốt thân (E, F) chứa chồi hoa của cây *in vitro*. (Thước: 1 mm). Mũi tên màu trắng chỉ vị trí của các tua cuốn, mũi tên màu đỏ chỉ vị trí của các chồi hoa, mũi tên màu đen chỉ vị trí các chồi sinh dưỡng.



Hình 3.32. So sánh sự ra hoa và tạo quả *in vitro* của chồi chanh dây tím trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs riêng lẻ và kết hợp với 0,05 mM Spd.

Đối với sự tạo quả *in vitro*, kết quả ghi nhận cho thấy rằng hầu hết các cơ quan sinh sản như bầu nhụy, vòi nhụy và bao phấn có khả năng hình thành quả non (Hình 3.32 và 3.33). Các hoa hình thành có khả năng tạo quả *in vitro* (64,45%) và đạt trung bình 1,33 quả/chồi sau 120 ngày nuôi cấy. Khi so sánh với việc bổ sung 7,0 mg/L AgNPs đơn lẻ, việc bổ sung Spd kết hợp với AgNPs cho thấy sự sinh trưởng chồi tốt hơn so với bổ sung riêng lẻ AgNPs (Hình 3.33). Tuy nhiên, kết quả quan sát cho thấy việc bổ sung kết hợp với Spd làm chậm quá trình ra hoa so với bổ sung AgNPs riêng lẻ (*Phụ lục 1.2*).

Các vai trò của PA trong cảm ứng ra hoa, sự hình thành sơ khởi hoa và các cơ quan hoa đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu. Trong đó, Spd là một hợp chất PA đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh lý khác nhau ở thực vật, bao gồm cả sự ra hoa. Chẳng hạn, ở cây *Polianthes tuberosa*, Spd là một trong những tín hiệu giúp phân hóa mầm hoa. Các thí nghiệm trên cây *Cucurbita pepo* và *Ginkgo biloba* cũng cho thấy rằng Spd chiếm ưu thế trong quá trình phân hóa nụ hoa. Ở một ngưỡng Spd nhất định, nó có thể thúc đẩy sự khởi đầu của các gen ra hoa, từ đó kích hoạt quá trình tổng hợp protein chuyên biệt và sự hình thành của mầm hoa [45].



Hình 3.33. Sự ra hoa và tạo quả *in vitro* từ chồi nuôi cấy trong môi trường bổ sung AgNPs riêng lẻ và kết hợp với Spd. **A.** Nụ hoa của chồi chanh dây tím trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs đơn lẻ và kết hợp với 0,05 mM Spd. **B.** Nụ của chồi chanh dây tím trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs kết hợp với 0,05 mM Spd. **C - E.** Sự nở hoa và tạo quả trong môi trường bổ sung kết hợp 7,0 mg/L AgNPs và 0,05 mM Spd trong giai đoạn 90 - 120 ngày nuôi cấy. (Thước: 1 cm).

Mối liên hệ chặt chẽ giữa PA với sự phát triển hoa và tạo quả ở thực vật cũng đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu. Sự tái sinh của cây thuốc lá từ một dòng tế bào bị suy yếu trong chuyển hóa PA đã tạo ra hoa với hàng cánh hoa thứ hai thay cho bao phấn, trong khi dòng tế bào thuốc lá chuyển hoá PA cao cũng biểu hiện kiểu hình hoa bất thường, tạo ra các hoa có bao phấn thay cho noãn [189]. S-adenosyl methionine decarboxylase (SAMdc) là một loại enzyme quan trọng trong con đường

sinh tổng hợp PA. Sự ức chế SAMdc dẫn đến sự ra hoa kém, điều này đã bị đảo ngược khi bổ sung Spd ở *Spirodela punctata* [190]. Tương tự như vậy, việc ức chế các enzyme sinh tổng hợp PA bằng cách sử dụng alpha-difluoromethylarginine (một chất ức chế arginine decarboxylase) và alpha-difluoromethylornithine (một chất ức chế ornithine decarboxylase) đã ngăn chặn sự hình thành nụ hoa và sự phát triển tiếp theo của nụ hoa trong các mẫu cây tế bào thuốc lá [191]. Sự suy giảm PA ở cây thuốc lá cũng biểu hiện kiểu hình hoa bất thường [189], trong khi mức độ cao của PA trong cà chua đột biến dẫn đến sự phát triển nhị hoa bất thường [192]. Hoa của cây cà chua chuyển gen đậu quả và hạt biểu hiện tỉ lệ Spd/Put và Spd/Spm cao hơn đáng kể so với hoa của cây chuyển gen không đậu quả và hạt [193].

Trong giai đoạn ra hoa, Spd có liên quan đến nhiều quá trình quan trọng. Spd có liên quan đến việc thúc đẩy sự hình thành nụ hoa. Chúng ảnh hưởng đến quá trình chuyển đổi từ tăng trưởng sinh dưỡng sang tăng trưởng sinh sản bằng cách điều chỉnh sự biểu hiện của các gen liên quan đến sự ra hoa. Spd tương tác với các hormone thực vật, bao gồm auxin và cytokinin, rất cần thiết cho sự phát triển của các cơ quan hoa. Nó điều chỉnh sự cân bằng hormone, do đó ảnh hưởng đến thời gian và kiểu ra hoa. Spd đã được chứng minh là có vai trò giúp thực vật đối phó với các áp lực môi trường khác nhau, chẳng hạn như hạn hán hoặc độ mặn cao. Trong điều kiện căng thẳng, Spd có thể tăng cường khả năng chịu đựng của cây và thúc đẩy sự ra hoa như một phần của cơ chế phản ứng với căng thẳng. Spd cũng có thể tham gia vào quá trình thụ phấn và thụ tinh. Nó đã được phát hiện trong cơ quan sinh sản của thực vật và có thể góp phần vào sự phát triển và trưởng thành của phấn hoa và hạt [45, 153, 192, 194]. Nghiên cứu về các cơ chế cụ thể mà Spd ảnh hưởng đến sự ra hoa đang được tiến hành và các con đường chính xác liên quan có thể khác nhau giữa các loài thực vật khác nhau. Hiểu được vai trò của Spd trong quá trình ra hoa là rất quan trọng để điều khiển quá trình phát triển và sinh sản của thực vật, điều này có thể có tác động đến năng suất và chất lượng cây trồng trong nông nghiệp.

Kết quả trong nghiên cứu hiện tại ghi nhận sự trì hoãn ra hoa trong môi trường bổ các nồng độ Spm đơn lẻ và kết hợp với AgNPs. Các báo cáo về sự tương tác giữa Spd và AgNPs còn rất hạn chế đối với quá trình ra hoa và tạo quả ở thực vật. Tuy nhiên, cả hai chất đều liên quan đến sự stress oxy hoá ở thực vật. Hơn

nữa, việc bổ sung AgNPs có thể ảnh hưởng đến sinh tổng hợp Spd thông qua S-adenosyl methionine [153]. Do đó, việc bổ sung kết hợp Spd và AgNPs trong thí nghiệm này có thể ảnh hưởng đến các quá trình này, từ đó tác động đến khả năng ra hoa và tạo quả *in vitro* của cây chanh dây tím.

Thực vật có thể thay đổi thời gian ra hoa sớm hơn hay muộn hơn ở các điều kiện stress khác nhau nhằm tối đa hóa cơ hội sinh sản, và phần lớn các stress này có liên quan đến hoạt động của ROS. PA có thể làm tăng hoạt động của các enzyme chống oxy hóa khác nhau trong thực vật, do đó nó có thể điều chỉnh hiệu quả stress oxy hóa ở thực vật do các yếu tố khác nhau gây ra. Chẳng hạn, Spd ngoại sinh làm tăng đáng kể hàm lượng Spd và Spm và giảm hàm lượng Put nội sinh trong rễ của cây dưa chuột dưới ảnh hưởng của điều kiện thiếu oxy. Những thay đổi này có thể do việc tăng hoạt động của enzyme chống oxy hóa, giảm ROS và giảm peroxid hóa lipid màng, cuối cùng dẫn đến tăng cường khả năng chịu stress do thiếu oxy. Việc bổ sung Spd ngoại sinh đã cải thiện những tác động tiêu cực của các kim loại nặng như Hg^{2+} và Cr^{6+} như giảm hàm lượng Spd nội sinh và hoạt tính của superoxide dismutase, catalase, peroxidase.

Ngược lại, PA cũng được xem là nguồn gốc của ROS do tạo ra các chất oxy hóa mạnh H_2O_2 trong quá trình dị hóa; do đó, PA có khả năng là nguyên nhân gây hại cho tế bào trong điều kiện stress. Tuy nhiên, H_2O_2 cũng là một phân tử tín hiệu có thể đi vào chuỗi truyền tín hiệu stress và kích hoạt phản ứng bảo vệ chống oxy hóa. Vì vậy, PA đóng vai trò kép trong stress oxy hóa thực vật. Mặt khác, việc bổ sung AgNPs ở một số nồng độ nhất định cũng được báo cáo gây các tác động đến việc hình thành ROS và các cơ chế chống oxy hóa ở nhiều loài thực vật. Do đó, việc bổ sung Spd trong thí nghiệm này có thể tác động đến một số ảnh hưởng có thể có của AgNPs đối với các quá trình này, từ đó tác động đến sự ra hoa và tạo quả *in vitro* của cây chanh dây tím. Tuy nhiên, cơ chế chính xác và tương tác của AgNPs với Spd trong quá trình này cần được làm rõ trong các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nội dung 1: Nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây *in vitro* cây chanh dây tím.

Nguồn mẫu cây từ quá trình phát sinh chồi tối ưu hơn nguồn mẫu từ quá trình phát sinh SE dựa trên hiệu quả tái sinh.

Hiệu quả tái sinh chồi được tăng cường đáng kể từ các mẫu cây oTCL tại lóng thân thứ 3 trong môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA; 1,0 mg/L NAA và 3,0 mg/L AgNPs.

Môi trường MS bổ sung 1 mg/L mT và 3 mg/L AgNPs thích hợp để nhân nhanh chồi.

Nội dung 2: Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*.

Tại nồng độ thích hợp, GA₃ tăng cường khả năng sinh trưởng của chồi, trong khi ABA làm giảm sinh trưởng của chồi tại tất cả các nồng độ bổ sung. Môi trường bổ sung đơn lẻ ABA hoặc GA₃ tại các nồng độ thí nghiệm không kích thích sự ra hoa của cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*.

Bạc ở dạng NPs kích thích sự ra hoa từ các chồi của cây chanh dây tím, trong khi AgNO₃ không gây cảm ứng ra hoa trong giới hạn của nghiên cứu. Tỷ lệ ra hoa dao động từ 11,67% đến 51,67% sau 60 ngày nuôi cấy. Khả năng ra hoa và tạo quả *in vitro* phụ thuộc đáng kể vào nồng độ AgNPs bổ sung. Một số hoa *in vitro* mang các đặc điểm cấu trúc khác biệt so với cấu trúc hoa ngoài tự nhiên. Đối với CoNPs, các chồi không ra hoa ở tất cả nồng độ thí nghiệm sau 60 ngày nuôi cấy.

Bổ sung Spd đơn lẻ tại các nồng độ thí nghiệm không kích thích sự ra hoa *in vitro* ở chanh dây tím. Các chồi chậm ra hoa và tỷ lệ ra hoa giảm đáng kể trong môi trường bổ sung Spd kết hợp với AgNPs so với việc bổ sung AgNPs đơn lẻ. Việc bổ sung kết hợp với Spd cho cấu trúc chồi hoa gần với cấu trúc chồi hoa ngoài tự nhiên.

KIẾN NGHỊ

Trong khuôn khổ về phạm vi và giới hạn nghiên cứu nhất định, để có thể nghiên cứu sâu, hoàn chỉnh và có khả năng ứng dụng cao hơn, một số kiến nghị được đề xuất như sau:

Tiếp tục nghiên cứu sự ra hoa và tạo quả *in vitro* của cây chanh dây tím đối với nguồn mẫu cấy phát sinh từ SE.

Nghiên cứu đã chỉ ra được AgNPs có ảnh hưởng tích cực đến sự ra hoa và tạo quả *in vitro*; tuy nhiên, để làm rõ được các tác động này cần tiếp tục đi sâu nghiên cứu về sự biến đổi động học của các hormone nội sinh và đặc biệt là biểu hiện của các gen liên quan.

Nghiên cứu chỉ dừng lại việc ghi nhận bước đầu tạo quả *in vitro* của cây chanh dây tím. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để hiểu rõ hơn về các đặc điểm sinh lý cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình này.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- [1] **Truong Hoai Phong**, Tran Hieu, Hoang Thanh Tung, Nguyen Thi Nhu Mai, Hoang Dac Khai, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Nguyen Ba Nam, Duong Tan Nhut, Silver nanoparticles: a positive factor for *in vitro* flowering and fruiting of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **2022**, 151, 401-412. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02361-x>
- [2] **Truong Hoai Phong**, Tran Hieu, Hoang Thanh Tung, Nguyen Thi Nhu Mai, Hoang Dac Khai, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Nguyen Ba Nam, Duong Tan Nhut, Silver nanoparticles enhance the *in vitro* plant regeneration via thin cell layer culture system in purple passion fruit. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **2023**, 155:403–415. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02566-8>
- [3] **Truong Hoai Phong**, Tran Hieu, Hoang Thanh Tung, Nguyen Thi Nhu Mai, Hoang Dac Khai, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Nguyen Ba Nam, Duong Tan Nhut, Somatic embryogenesis as potential method for commercial propagation in *Passiflora edulis* Sims f. *edulis* – an important horticultural crop. *Scientia Horticulturae*, **2023**, 316, 112020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112020>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Murthy S.R.K., Kondamudi, Rao C., Pullaiah T., 2012, *In vitro* flowering - A review, *J Agric Technol*, 8, pp. 1571-36.
2. Haque S.M., Paul S., Ghosh B., 2016, High-frequency *in vitro* flowering, hand-pollination and fruit setting in ten different cultivars of *Capsicum* spp. (*C. annuum*, *C. chinense*, and *C. frutescens*): an initial step towards *in vitro* hybrid production, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 127(1), pp. 161-73.
3. Zhu F., Ao Y., Hirst P.M., Niu Y., Luo F., Jiang Y.G., Liu S.X., Zheng Y.Q., Wang X., Zhang N., 2022, Suitable pollen source for the improvement of fruit and seed traits in *Xanthoceras sorbifolium*, *Ind Crops Prod*, 182, pp. 114858.
4. Rivero R., Remberg S.F., Heide O.M., Sønsteby A., 2021, Environmental regulation of dormancy, flowering and runnering in two genetically distant everbearing strawberry cultivars, *Sci Hortic*, 290, pp. 110515.
5. Shen P., Gao S., Hu J., Li Y., Lei T., Shi L., 2021, *In vitro* flowering of the distylous plant *Plumbago auriculata* Lam, *S Afr J Bot*, 137, pp. 492-8.
6. Sukthavornthum W., Bodhipadma K., Noichinda S., Phanomchai S., Deelueak U., Kachonpadungkitti Y., Leung D.W.M., 2018, UV-C irradiation induced alterations in shoot proliferation and *in vitro* flowering in plantlets developed from encapsulated and non-encapsulated microshoots of Persian violet, *Sci Hortic*, 233, pp. 9-13.
7. Rathore N.S., Rathore N., Shekhawat N.S., 2013, *In vitro* flowering and seed production in regenerated shoots of *Cleome viscosa*, *Ind Crops Prod*, 50, pp. 232-6.
8. Sivanesan I., Park S.W., 2015, Optimizing factors affecting adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering and fruiting of *Withania somnifera* (L.) Dunal, *Ind Crops Prod*, 76, pp. 323-8.
9. Manan A.A., Taha R.M., Mubarak E.E., Elias H., 2016, *In vitro* flowering, glandular trichomes ultrastructure, and essential oil accumulation in micropropagated *Ocimum basilicum* L, *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 52(3), pp. 303-14.
10. Haque S.M., Halder T., Ghosh B., 2018, *In vitro* completion of sexual life cycle - Production of next sporophytic generation through *in vitro* flowering and fruiting in *Solanum americanum* and *Solanum villosum*, *S Afr J Bot*, 118, pp. 112-9.

11. Sreelekshmi R., Siril E.A., 2021, Investigation on *in vitro* bouquets and flower longevity of micropropagated *Dianthus chinensis* L, *Sci Hortic*, 275, pp. 109708.
12. Xiong Y., Chen S., Wei Z., Yu X., Pang J., Zhang T., Wu K., Ren H., Jian S., da Silva J.A.T., Ma G., 2021, *In vitro* flowering and fruiting in *Portulaca pilosa* L, *S Afr J Bot*, 140, pp. 1-3.
13. Liu J., Wu B., Xie T., Luan A., Ding Y., Zhang Z., He Y., Zhang Z., 2022, Bud induction and observation of *in vitro* flowering from the callus of *Ananas bracteatus* var. *tricolor*, *HortScience*, 57(5), pp. 595-8.
14. Yockteng R., d'Eeckenbrugge G.C., Souza-Chies T.T., 2011, *Passiflora*. In: Kole C, editor. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Tropical and Subtropical Fruits*, Springer, pp. 129-71.
15. Scorza R., Janick J., 1980, *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L, *J Am Soc Hortic Sci*, 105(6), pp. 892-7.
16. Stinchcombe J.R., Weinig C., Ungerer M., Olsen K.M., Mays C., Halldorsdottir S.S., Purugganan M.D., Schmitt J., 2004, A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene FRIGIDA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(13), pp. 4712-7.
17. Izawa T., 2007, Daylength measurements by rice plants in photoperiodic short-day flowering. *Int Rev Cytol*, Academic Press, pp. 191-222.
18. Simpson G.G., Dean C., 2002, *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time?, *Science*, 296(5566), pp. 285-9.
19. Sahu M., Maurya S., Jha Z., 2023, *In vitro* selection for drought and salt stress tolerance in rice: an overview, *Plant Physiol Rep*, 28(1), pp. 8-33.
20. Vaz A., Kerbauy G., 2008, *In vitro* precocious orchid flowering: a strategy for basic research and commercial approaches. In: da Silva JAT, editor. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology - Advances and topical issues*, Global Science Books, pp. 421-6.
21. Theißen G., Melzer R., 2013, Flower development, genetics of. In: Maloy S, Hughes K, editors. *Brenner's encyclopedia of genetics*, Academic Press, pp. 67-71.
22. Kim D.H., 2020, Current understanding of flowering pathways in plants: focusing on the vernalization pathway in *Arabidopsis* and several vegetable crop plants, *Hortic Environ Biotechnol*, 61(2), pp. 209-27.

23. Izawa T., 2021, What is going on with the hormonal control of flowering in plants?, *The Plant J*, 105(2), pp. 431-45.
24. Cerdán P.D., Chory J., 2003, Regulation of flowering time by light quality, *Nature*, 423(6942), pp. 881-5.
25. Koornneef M., Hanhart C.J., van der Veen J.H., 1991, A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*, *Mol Gen Genet*, 229(1), pp. 57-66.
26. Simpson G.G., 2004, The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time, *Curr Opin Plant Biol*, 7(5), pp. 570-4.
27. Yamaguchi S., 2008, Gibberellin metabolism and its regulation, *Annu Rev Plant Biol*, 59, pp. 225-51.
28. Blázquez M.A., Green R., Nilsson O., Sussman M.R., Weigel D., 1998, Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter, *The Plant Cell*, 10(5), pp. 791-800.
29. Reeves P.H., Coupland G., 2001, Analysis of flowering time control in *Arabidopsis* by comparison of double and triple mutants, *Plant Physiol*, 126(3), pp. 1085-91.
30. Causier B., Schwarz-Sommer Z., Davies B., 2010, Floral organ identity: 20 years of ABCs, *Semin Cell Dev Biol*, 21(1), pp. 73-9.
31. Theißen G., Saedler H., 2001, Floral quartets, *Nature*, 409(6819), pp. 469-71.
32. Wang J.W., 2014, Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway, *J Exp Bot*, 65(17), pp. 4723-30.
33. Bùi Trang Việt, 2000, Sinh lý thực vật đại cương - Phát triển. NXB Đại học Quốc gia TP.HCM, pp. 333.
34. Nwoke F.I.O., 1983, Effects of plant age on photoperiodic induction and development of flowers and fruits in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, *Z Pflanzenphysiol*, 110(5), pp. 393-400.
35. Osnato M., Cota I., Nebhnani P., Cereijo U., Pelaz S., 2022, Photoperiod control of plant growth: Flowering time genes beyond flowering, *Front Plant Sci*, 12, pp. 805635.

36. Rocha D.I., Monte Bello C.C., Sobol S., Samach A., Dornelas M.C., 2015, Auxin and physical constraint exerted by the perianth promote androgynophore bending in *Passiflora mucronata* L. (Passifloraceae), *Plant Biol*, 17(3), pp. 639-46.
37. Farooqi A.H.A., Shukla Y.N., Sharma S., Bansal R.P., 1994, Relationship between gibberellin and cytokinin activity and flowering in *Rosa damascena* Mill, *Plant Growth Regul*, 14(2), pp. 109-13.
38. Nishijima T., 2012, Large flower size: molecular basis and role of cytokinin, *J Jpn Soc Hortic Sci*, 81(2), pp. 129-39.
39. Kovaleva L.V., Voronkov A.S., Zakharova E.V., 2015, Role of auxin and cytokinin in the regulation of the actin cytoskeleton in the *in vitro* germinating male gametophyte of petunia, *Russ J Plant Physiol*, 62(2), pp. 179-86.
40. Dương Tấn Nhựt, Lê Văn Thức, Trần Trọng Tuấn, Trương Thị Diệu Hiền, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Luận V.Q., 2018, Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành hoa *in vitro* ở cây Torenia (*Torenia fournieri* L.), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 51(6), pp. 689-702.
41. Shu K., Luo X., Meng Y., Yang W., 2018, Toward a molecular understanding of abscisic acid actions in floral transition, *Plant Cell Physiol*, 59(2), pp. 215-21.
42. Martignago D., Siemiatkowska B., Lombardi A., Conti L., 2020, Abscisic acid and flowering regulation: Many targets, different places, *Int J Mol Sci*, 21(24), pp.
43. Iqbal N., Khan N.A., Ferrante A., Trivellini A., Francini A., Khan M.I.R., 2017, Ethylene role in plant growth, development and senescence: Interaction with other phytohormones, *Front Plant Sci*, 8, pp. 475.
44. Martínez C., García A., Jamilena M., 2022, Role of ethylene in flower and fruit development. In: Singh S, Husain T, Singh VP, Tripathi DK, Prasad SM, Dubey NK, editors. *Ethylene in Plant Biology*, John Wiley & Sons, pp. 178-219.
45. Qin L., Zhang X., Yan J., Fan L., Rong C., Mo C., Zhang M., 2019, Effect of exogenous spermidine on floral induction, endogenous polyamine and hormone production, and expression of related genes in 'Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.), *Sci Rep*, 9(1), pp. 12777.
46. Chen D., Shao Q., Yin L., Younis A., Zheng B., 2019, Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses, *Front Plant Sci*, 9, pp. 1945.

47. Trần Trọng Tuấn, Trần Thị Mỹ Trâm, Phạm Thị Ngọc Thúy, Nguyễn Hữu Hồ, Nhứt D.T., 2015, Ảnh hưởng của amino acid và polyamine lên quá trình ra hoa *in vitro* của cây hoa Mỡm chó (*Torenia fournieri* L.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 3, pp. 929-37.
48. Chang C., 2016, Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance?, *BMC Biology*, 14(1), pp. 7.
49. Houben M., de Poel B.V., 2019, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene, *Front Plant Sci*, 10, pp. 695.
50. Sharma A., Kumar V., Giridhar P., Gokare R., 2008, Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation, *Electron J Biotechnol*, 11(2), pp. 84-9.
51. Hasan S., 2015, A review on nanoparticles: their synthesis and types, *Res J Recent Sci*, 2277, pp. 2502.
52. Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K., 2018, Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations, *Beilstein J Nanotechnol*, 9, pp. 1050-74.
53. Bijali J., Acharya K., 2020, Current trends in nano-technological interventions on plant growth and development: a review, *IET Nanobiotechnol*, 14(2), pp. 113-9.
54. Zhang X.F., Liu Z.G., Shen W., Gurunathan S., 2016, Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches, *Int J Mol Sci*, 17(9), pp.
55. Gupta N., Upadhyaya C.P., Singh A., Abd-Elsalam K.A., Prasad R., 2018, Applications of silver nanoparticles in plant protection. In: Abd-Elsalam KA, Prasad R, editors. *Nanobiotechnology Applications in Plant Protection*, Springer International Publishing, pp. 247-65.
56. Mahajan S., Kadam J., Dhawal P., Barve S., Kakodkar S., 2022, Application of silver nanoparticles in in-vitro plant growth and metabolite production: revisiting its scope and feasibility, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 150(1), pp. 15-39.
57. Tung H.T., Thuong T.T., Cuong D.M., Luan V.Q., Hien V.T., Hieu T., Nam N.B., Phuong H.T.N., Van The Vinh B., Khai H.D., Nhut D.T., 2021, Silver nanoparticles improved explant disinfection, *in vitro* growth, runner formation and

limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*), *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 145(2), pp. 393-403.

58. Cuong D.M., Du P.C., Tung H.T., Ngan H.T.M., Luan V.Q., Phong T.H., Khai H.D., Phuong T.T.B., Nhut D.T., 2021, Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis* - a valuable medicinal plant, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 146(3), pp. 577-88.

59. Khattab S., Sherif F.E., AlDayel M., Yap Y.K., Meligy A., Ibrahim H.I.M., 2022, Silicon dioxide and silver nanoparticles elicit antimicrobial secondary metabolites while enhancing growth and multiplication of *Lavandula officinalis* in vitro plantlets, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 149(1), pp. 411-21.

60. Salachna P., Byczyńska A., Zawadzińska A., Piechocki R., Mizielińska M., 2019, Stimulatory effect of silver nanoparticles on the growth and flowering of potted oriental lilies, *Agronomy*, 9(10), pp.

61. Rajput B.S., Manokari M., Solanki N.J., Sandhya D., Faisal M., Alatar A.A., Shekhawat M.S., 2024, Silver nanoparticle-induced in vitro flowering in *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees and genetic fidelity assessment of regenerants using molecular markers, *Mol Biol Rep*, 51(1), pp. 501.

62. Amasino R.M., Cheung A.Y., Dresselhaus T., Kuhlemeier C., 2017, Focus on flowering and reproduction, *Plant Physiol*, 173(1), pp. 1-4.

63. Van M.T.T., 1973, Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L, *Planta*, 115(1), pp. 87-92.

64. Prasuna V.N.S., Reddy C.M.N., Rajagopal M., Purna G.S., Srinivas B., 2022, In vitro flowering and production of seeds in *Oxalis corniculata* L. -an important medicinal plant, *Plant Tiss Cult Biotech*, 32(2), pp. 193-203.

65. Liang O.P., Keng C.L., 2006, In vitro plant regeneration, flowering and fruiting of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), *Inter J Bot*, 2(4), pp. 409–14.

66. Mamidalaand P., Nanna R.S., 2009, Efficient in vitro plant regeneration, flowering and fruiting of dwarf Tomato cv. Micro-Msk, *Plant Omics*, 2(3), pp. 98-102.

67. Hu W., Chang C., Peng C.I., Liaw S., 2010, In vitro flowering and fruiting of *Begonia parvula* H. Lev. & Vaniot. Europ, *Europ J Hort Sci*, 75(4), pp. 172-6.

68. Sarker R.H., Das S.K., Hoque M.I., 2012, *In vitro* flowering and seed formation in lentil (*Lens culinaris* Medik.), *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 48(5), pp. 446-52.
69. Jeong B.R., Sivanesan I., 2015, Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 123(3), pp. 607-18.
70. Mobini S.H., Lulsdorf M., Warkentin T.D., Vandenberg A., 2015, Plant growth regulators improve *in vitro* flowering and rapid generation advancement in lentil and faba bean, *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 51(1), pp. 71-9.
71. Anuradha U., Datar M., Waghmode P., 2016, *In vitro* flowering and fruiting of critically endangered plant *Ceropegia rollae* Hemadri, *Indian J Biotechnol*, 15(1), pp. 112-5.
72. Gogoi G., Borua P.K., Al-Khayri J.M., 2017, Improved micropropagation and *in vitro* fruiting of *Morus indica* L. (K-2 cultivar), *J Genet Eng Biotechnol*, 15(1), pp. 249-56.
73. Sheeja T., Mandal A., 2003, *In vitro* flowering and fruiting in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol*, 11(1), pp. 37-42.
74. Qian X., Wang C., Ouyang T., Tian M., 2014, *In vitro* flowering and fruiting in culture of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae), *Pak J Bot*, 46(5), pp. 1877-82.
75. Schotsmans W.C., Fischer G., 2011, Passion fruit (*Passiflora edulis* Sim.). In: Yahia EM, editor. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, Woodhead Publishing, pp. 125-43e.
76. Mandal G., 2017, Production preference and importance of passion fruit (*Passiflora edulis*): A review, *J Agric Sci Food Sci Technol*, 4(1), pp. 27-30.
77. He X., Luan F., Yang Y., Wang Z., Zhao Z., Fang J., Wang M., Zuo M., Li Y., 2020, *Passiflora edulis*: An insight into current researches on phytochemistry and pharmacology, *Front Pharmacol*, 11, pp. 617.
78. Ramaiya D.S., Bujang J.S., Zakaria M.Z., 2018, Nutritive values of passion fruit (*Passiflora* Species) seeds and its role in human health, *J Agric Food Dev*, 4, pp. 23-30.

79. Isutsa D.K., 2004, Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties, *Sci Horti*, 99(3), pp. 395-400.
80. Fernando J.A., Vieira M.L.C., Machado S.R., Appezzato-da-Glória B., 2007, New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 91(1), pp. 37-44.
81. da Silva C.V., de Oliveira L.S., Loriato V.A.P., da Silva L.C., de Campos J.M.S., Viccini L.F., de Oliveira E.J., Otoni W.C., 2011, Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 107(3), pp. 407-16.
82. Pinto D.L.P., de Almeida A.M.R., Rêgo M.M., da Silva M.L., de Oliveira E.J., Otoni W.C., 2011, Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 107(3), pp. 521-30.
83. Rocha D.I., Vieira L.M., Tanaka F.A.O., Silva L.C.d., Otoni W.C., 2012, Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 111(1), pp. 69-78.
84. Rosa Y.B.C.J., Bello C.C.M., Dornelas M.C., 2015, Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 120(1), pp. 69-77.
85. Rocha D.I., Monte-Bello C.C., Dornelas M.C., 2015, Alternative induction of *de novo* shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 120(3), pp. 1087-98.
86. Rocha D.I., Pinto D.L.P., Vieira L.M., Tanaka F.A.O., Dornelas M.C., Otoni W.C., 2016, Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression, *Protoplasma*, 253(2), pp. 595-609.
87. Huh Y.S., Lee J.K., Nam S.Y., 2017, Effect of plant growth regulators and antioxidants on *in vitro* plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), *J Plant Biotechnol*, 44(3), pp. 335-42.

88. Aadhan K., Ayyadurai V.A., 2017, In vitro callus induction studies on *Passiflora edulis* Sims: A valuable medicinal plant, *J Microbiol Biotechnol Res*, 6, pp. 28-31.
89. Hieu T., Tam D.T.T., Linh N.T.N., Tung H.T., Bao H.G., Nguyen C.D., Nhut D.T., 2018, Stimulation of shoot regeneration through leaf thin cell layer culture of *Passiflora edulis* Sims, *Vietnam J Biotechnol*, 16(4), pp. 669-77.
90. Antoniazzi C.A., de Faria R.B., de Carvalho P.P., Mikovski A.I., de Carvalho I.F., de Matos E.M., Reis A.C., Viccini L.F., Paim Pinto D.L., Rocha D.I., Otoni W.C., da Silva M.L., 2018, In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims), *Sci Hortic*, 238, pp. 408-15.
91. Hieu T., Tung H.T., Nguyen C.D., Nhut D.T., 2018, Establishing aseptic explant source for *Passiflora edulis* Sims. and *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *HUJOS: Natural Sci*, 127(1C), pp. 71-84.
92. Hieu T., Tung H.T., Nguyen C.D., Nhut D.T., 2019, Efficiency of shoot regeneration and micropropagation of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) via internodal longitudinal thin cell layer culture, *Vietnam J Biotechnol*, 17(4), pp. 699-708.
93. Chen Y.C., Chang C., Lin H.L., 2020, Topolins and red light improve the micropropagation efficiency of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) ‘Tainung No. 1’, *HortScience*, 55(8), pp. 1-8.
94. Burbulis N., Blinstrubienė A., Petruskevicius A., 2021, In vitro propagation of *Passiflora edulis* through internodal segments as affected by medium composition, *Zemdirbyste-Agriculture*, 108(4), pp. 377-82.
95. Cruz K.Z.C.M., Almeida F.A., Vale E.M., Botini N., Vettorazzi R.G., Santos R.C., Santa-Catarina C., Silveira V., 2022, PEG induces maturation of somatic embryos of *Passiflora edulis* Sims ‘UENF Rio Dourado’ by differential accumulation of proteins and modulation of endogenous contents of free polyamines, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 150(3), pp. 527-41.
96. Tung H.T., Hieu T., Phong T.H., Khai H.D., Hanh N.T.M., Van K.T.T., Nhut D.T., 2022, The application of thin cell layer culture technique in plant regeneration and micropropagation: Latest achievements. In: Nhut DT, Tung HT, Yeung ECT,

editors. *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*, Springer, pp. 231-57.

97. Khai H.D., Hiep P.P.M., Tung H.T., Phong T.H., Mai N.T.N., Luan V.Q., Cuong D.M., Vinh B.V.T., Nhut D.T., 2023, Selenium nanoparticles promote adventitious rooting without callus formation at the base of passion fruit cuttings via hormonal homeostasis changes, *Sci Hortic*, 323, pp. 112485.

98. Hieu T., Phong T.H., Mai N.T.N., Khai H.D., Tung H.T., Cuong D.M., Luan V.Q., Trieu L.N., Nam N.B., Phuong H.T.N., Vinh B.V.T., Nhut D.T., 2023, Production of passion fruit virus-free in vitro shoots by apical meristem culture, *Vietnam J Sci Technol*, 65(2), pp. 61-5.

99. Vaidya B.N., Jackson C.L., Perry Z.D., Dhekney S.A., Joshee N., 2016, Agrobacterium-mediated transformation of thin cell layer explants of *Scutellaria ocmulgee* Small: a rare plant with anti-tumor properties, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 127(1), pp. 57-69.

100. Tripathi D., Rai K.K., Rai S.K., Rai S.P., 2018, An improved thin cell layer culture system for efficient clonal propagation and *in vitro* withanolide production in a medicinal plant *Withania coagulans* Dunal, *Ind Crops Prod*, 119, pp. 172-82.

101. Anh T.T.L., Tung H.T., Khai H.D., Mai N.T.N., Luan V.Q., Cuong D.M., Phuong H.T.N., Diem L.T., Vinh N.Q., Dung D.M., Van The Vinh B., Thao N.P., Nhut D.T., 2022, Micropropagation of Lang Bian ginseng: an endemic medicinal plant, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 151, pp. 565–78.

102. Sabooni N., Shekafandeh A., 2017, Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 130(2), pp. 313-21.

103. Abdolinejad R., Shekafandeh A., Jowkar A., Gharaghani A., Alemzadeh A., 2020, Indirect regeneration of *Ficus carica* by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 143(1), pp. 131-44.

104. Hanh N.T.M., Tung H.T., Khai H.D., Cuong D.M., Luan V.Q., Mai N.T.N., Anh T.T.L., Van Le B., Nhut D.T., 2022, Efficient somatic embryogenesis and regeneration from leaf main vein and petiole of *Actinidia chinensis* Planch. via thin cell layer culture technology, *Sci Hortic*, 298, pp. 110986.

105. Bhattacharyya P., Paul P., Kumaria S., Tandon P., 2018, Transverse thin cell layer (t-TCL)-mediated improvised micropropagation protocol for endangered medicinal orchid *Dendrobium aphyllum* Roxb: an integrated phytomolecular approach, *Acta Physiol Plant*, 40(8), pp. 137.
106. da Silva J.A.T., Nhut D.T., 2003, Thin cell layers and floral morphogenesis, floral genetics and *in vitro* flowering. In: Nhut DT, Le BV, Van KTT, Thorpe T, editors. *Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications*, Springer Netherlands, pp. 285-342.
107. da Silva J.T., Altamura M., Dobránszki J., 2015, The untapped potential of plant thin cell layers, *J Hortic Res*, 23, pp. 127-31.
108. Parthibhan S., Rao M.V., da Silva J.A.T., Senthil Kumar T., 2018, Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aqueum*, *Biol Plant*, 62(3), pp. 439-50.
109. Marinangeli P., 2016, Somatic embryogenesis of *Lilium* from microbulb transverse thin cell layers, *Methods Mol Biol*, 1359, pp. 387-94.
110. Ekmekçigil M., Bayraktar M., Akkuş Ö., Gürel A., 2019, High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 136(3), pp. 451-64.
111. Bao H.G., Tung H.T., Van H.T., Bien L.T., Khai H.D., Mai N.T.N., Luan V.Q., Cuong D.M., Nam N.B., Van The Vinh B., Nhut D.T., 2022, Copper nanoparticles enhanced surface disinfection, induction and maturation of somatic embryos in tuberous begonias (*Begonia × tuberhybrida* Voss) cultured *in vitro*, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 151, pp. 385–99.
112. Li H.Y., Liu F.S., Song S.L., Wang C.X., Sun H.M., 2022, Highly effective organogenesis and somatic embryogenesis of *Clivia*, *Sci Hortic*, 306, pp. 111443.
113. Bonga J.M., 2017, Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers?, *Trees*, 31(3), pp. 781-9.
114. Ramírez-Mosqueda M.A., Iglesias-Andreu L.G., Armas-Silva A.A., Cruz-Gutiérrez E.J., de la Torre-Sánchez J.F., Leyva-Ovalle O.R., Galán-Páez C.M., 2019,

Effect of the thin cell layer technique in the induction of somatic embryos in *Pinus patula* Schl. et Cham, *J For Res*, 30(4), pp. 1535-9.

115. Pacheco G., Simão M.J., Vianna M.G., Garcia R.O., Vieira M.L.C., Mansur E., 2016, *In vitro* conservation of *Passiflora* - A review, *Sci Hortic*, 211, pp. 305-11.

116. Dias L.L.C., Santa-Catarina C., Ribeiro D.M., Barros R.S., Floh E.I.S., Otoni W.C., 2009, Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 99(2), pp. 199-208.

117. Ozarowski M., Thiem B., 2013, Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review, *Rev Bras Farmacogn*, 23(6), pp. 937-47.

118. da Silva M.L., Pinto D.L.P., de Campos J.M.S., de Carvalho L.F., Rocha D.I., Batista D.S., Otoni W.C., 2021, Repetitive somatic embryogenesis from wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) anthers, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 146(3), pp. 635-41.

119. Raza G., Singh M.B., Bhalla P.L., 2019, Somatic embryogenesis and plant regeneration from commercial soybean cultivars, *Plants*, 9(1), pp. 38.

120. Nhut D.T., Huy N.P., Tai N.T., Nam N.B., Luan V.Q., Hien V.T., Tung H.T., Vinh B.T., Luan T.C., 2015, Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *Biotechnol Biotechnol Equip*, 29(2), pp. 299-308.

121. Guan Y., Li S.G., Fan X.F., Su Z.H., 2016, Application of somatic embryogenesis in woody plants, *Front Plant Sci*, 7, pp. 938.

122. de Almeida N.V., Rivas E.B., Cardoso J.C., 2022, Somatic embryogenesis from flower tepals of *Hippeastrum* aiming regeneration of virus-free plants, *Plant Sci*, 317, pp. 111191.

123. Garcia C., de Almeida A.A.F., Costa M., Britto D., Valle R., Royaert S., Marelli J.P., 2019, Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 137(2), pp. 193-212.

124. Diem L.T., Phong T.H., Tung H.T., Khai H.D., Anh T.T.L., Mai N.T.N., Cuong D.M., Luan V.Q., Que T., Phuong H.T.N., Vinh B.V.T., Nhut D.T., 2022,

- Tetraploid induction through somatic embryogenesis in *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. by colchicine treatment, *Sci Hortic*, 303, pp. 111254.
125. Yue J., Dong Y., Du C., Shi Y., Teng Y., 2022, Transcriptomic and physiological analyses reveal the acquisition of somatic embryogenesis potential in *Agapanthus praecox*, *Sci Hortic*, 305, pp. 111362.
126. Bradaï F., Pliego-Alfaro F., Sánchez-Romero C., 2016, Long-term somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.): Influence on regeneration capability and quality of regenerated plants, *Sci Hortic*, 199, pp. 23-31.
127. Oliveira L.B., de Mello T., de Araujo C.P., de Oliveira J.P.B., Ferreira A., Zanardo T.E.C., Vieira L.M., Otoni W.C., Alexandre R.S., Carvalho V.S., 2022, Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest, *Sci Hortic*, 299, pp. 111051.
128. Mahendran D., Kavi Kishor P.B., Geetha N., Venkatachalam P., 2018, Phycomolecule-coated silver nanoparticles and seaweed extracts induced high-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gloriosa superba* L, *J Appl Psychol*, 30(2), pp. 1425-36.
129. Cutri L., Nave N., Ami M.B., Chayut N., Samach A., Dornelas M.C., 2013, Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp, *Mech Dev*, 130(1), pp. 61-9.
130. Bugallo V., Pannunzio M.J., Cardone S., Facciuto G., 2015 The hidden path of hybridization in *Passiflora*: microscopic steps to create a novel variety, *Passiflora Online J*, pp. 47-53.
131. Jacob Y., Ferrero F., 2003, Morphology and anatomy - Pollen grains and tubes. In: Roberts AV, editor. *Encyclopedia of rose science*, Elsevier, pp. 518-23.
132. Madureira H.C., Pereira T.N.S., da Cunha M., Klein D.E., de Oliveira M.V.V., de Mattos L., de Souza Filho G.A., 2014, Self-incompatibility in passion fruit: cellular responses in incompatible pollinations, *Biologia*, 69(5), pp. 574-84.
133. Nave N., Katz E., Chayut N., Gazit S., Samach A., 2010, Flower development in the passion fruit *Passiflora edulis* requires a photoperiod-induced systemic graft-transmissible signal, *Plant Cell Environ*, 33(12), pp. 2065-83.

134. [Hiếu T.], 2021, Nghiên cứu nhân giống cây chanh dây (*Passiflora edulis*) bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào và thử nghiệm tạo cây vi ghép, [Luận án Tiến sĩ Sinh lý học thực vật], [Đại học Huế], [Huế].
135. Murashige T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15(3), pp. 473-97.
136. Chau N.H., Bang L.A., Buu N.Q., Dung T.T.N., Ha H.T., Quang D.V., 2008, Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection, *Adv Nat Sci*, 9, pp. 241-8.
137. Buu N.Q., Hien D.T., Chau N.H., Tin T.X., Van N.T., Duong K.T., Ha H.T., 2014, Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51), *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol*, 5(1), pp. 015016.
138. Hieu T., Phong T.H., Khai H.D., Mai N.T.N., Cuong D.M., Luan V.Q., Tung H.T., Nam N.B., Nhut D.T., 2021, Efficient production of vigorous passion fruit rootstock for *in vitro* grafting, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 148(3), pp. 635-48.
139. Cristescu S.M., Mandon J., Arslanov D., De Pessemier J., Hermans C., Harren F.J., 2013, Current methods for detecting ethylene in plants, *Ann Bot*, 111(3), pp. 347-60.
140. Chattopadhyaya B., Banerjee J., Basu A., Sen S.K., Maiti M.K., 2010, Shoot induction and regeneration using internodal transverse thin cell layer culture in *Sesamum indicum* L, *Plant Biotechnol Rep*, 4(2), pp. 173-8.
141. Nhut D.T., Van K.T.T., Le B.V., Thorpe T.A., 2003, Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications. Springer Dordrecht, pp. 517.
142. Gorelova V., Sprakel J., Weijers D., 2021, Plant cell polarity as the nexus of tissue mechanics and morphogenesis, *Nat Plants*, 7(12), pp. 1548-59.
143. Saha N., Gupta S.D., 2018, Promotion of shoot regeneration of *Swertia chirata* by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene interceptions and activation of antioxidant activity, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 134(2), pp. 289-300.
144. Jadczyk P., Kulpa D., Bihun M., Przewodowski W., 2019, Positive effect of AgNPs and AuNPs in *in vitro* cultures of *Lavandula angustifolia* Mill, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 139(1), pp. 191-7.

145. Ngan H.T.M., Cuong D.M., Tung H.T., Nghiep N.D., Le B.V., Nhut D.T., 2020, The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') plantlets cultured *in vitro*, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 141(2), pp. 393-405.
146. Dar R.A., Nisar S., Tahir I., 2021, Ethylene: A key player in ethylene sensitive flower senescence: A review, *Sci Hortic*, 290, pp. 110491.
147. Sarmast M.K., Salehi H., 2016, Silver nanoparticles: An influential element in plant nanobiotechnology, *Mol Biotechnol*, 58(7), pp. 441-9.
148. Tripathi D.K., Tripathi A., Shweta S.S., Singh Y., Vishwakarma K., Yadav G., Sharma S., Singh V.K., Mishra R.K., Upadhyay R.G., Dubey N.K., Lee Y., Chauhan D.K., 2017, Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A concentric review, *Front Microbiol*, 8, pp. 07.
149. Kokina I., Gerbreders V., Sledevskis E., Bulanovs A., 2013, Penetration of nanoparticles in flax (*Linum usitatissimum* L.) calli and regenerants, *J Biotechnol*, 165(2), pp. 127-32.
150. Ptak A., Tahchy A.E., Wyżgolik G., Henry M., Laurain-Mattar D., 2010, Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 102(1), pp. 61-7.
151. Kumar V., Ramakrishna A., Ravishankar G.A., 2007, Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr, *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 43(6), pp. 602-7.
152. Manickavasagam M., Pavan G., Vasudevan V., 2019, A comprehensive study of the hormetic influence of biosynthesized AgNPs on regenerating rice calli of Indica cv. IR64, *Sci Rep*, 9(1), pp. 8821.
153. Rakesh B., Sudheer W.N., Nagella P., 2021, Role of polyamines in plant tissue culture: An overview, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 145(3), pp. 487-506.
154. Bais H.P., Sudha G.S., Ravishankar G.A., 2000, Putrescine and silver sitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local, *J Plant Growth Regul*, 19(2), pp. 238-48.

155. Farrokhzad Y., Babaei A., Yadollahi A., Kashkooli A.B., Mokhtassi-Bidgoli A., Hessami S., 2022, Informative title: Development of lighting intensity approach for shoot proliferation in *Phalaenopsis amabilis* through combination with silver nanoparticles, *Sci Hortic*, 292, pp. 110582.
156. Chang M.Z., Huang C.H., 2018, Effects of GA₃ on promotion of flowering in *Kalanchoe* spp, *Sci Hortic*, 238, pp. 7-13.
157. Mutasa-Göttgens E., Hedden P., 2009, Gibberellin as a factor in floral regulatory networks, *J Exp Bot*, 60(7), pp. 1979-89.
158. Saxena S., Kaushik N., Sharma R., 2008, Effect of abscisic acid and proline on *in vitro* flowering in *Vigna aconitifolia*, *Biol Plant*, 52, pp. 181-3.
159. Yan B., Hou J., Cui J., He C., Li W., Chen X., Li M., Wang W., 2019, The effects of endogenous hormones on the flowering and fruiting of *Glycyrrhiza uralensis*, *Plants*, 8(11), pp. 519.
160. Mahendran D., Geetha N., Venkatachalam P., 2019, Role of silver nitrate and silver nanoparticles on tissue culture medium and enhanced the plant growth and development. In: Kumar M, Muthusamy A, Kumar V, Bhalla-Sarin N, editors. *In vitro Plant Breeding towards Novel Agronomic Traits: Biotic and Abiotic Stress Tolerance*, Springer, pp. 59-74.
161. Revathi J., Manokari M., Latha R., Priyadharshini S., Kher M.M., Shekhawat M.S., 2020, Photoperiod and silver ions modulate *in vitro* flowering in *Oldenlandia herbacea* (L.) Roxb, *Israel J Plant Sci*, 67(3-4), pp. 219-24.
162. Naing A.H., Soe M.T., Kyu S.Y., Kim C.K., 2021, Nano-silver controls transcriptional regulation of ethylene- and senescence-associated genes during senescence in cut carnations, *Sci Hortic*, 287, pp. 110280.
163. de Matos A., de Oliveira B., de Oliveira M., Cardoso J., 2021, AgNO₃ improved micropropagation and stimulate *in vitro* flowering of rose (*Rosa x hybrida*) cv. Sena, *Ornamental Horticulture*, 27(1), pp. 33-40.
164. Arnao M.B., Hernández-Ruiz J., 2020, Melatonin in flowering, fruit set and fruit ripening, *Plant Reprod*, 33(2), pp. 77-87.
165. Shi H., Wei Y., Wang Q., Reiter R.J., He C., 2016, Melatonin mediates the stabilization of DELLA proteins to repress the floral transition in *Arabidopsis*, *J Pineal Res*, 60(3), pp. 373-9.

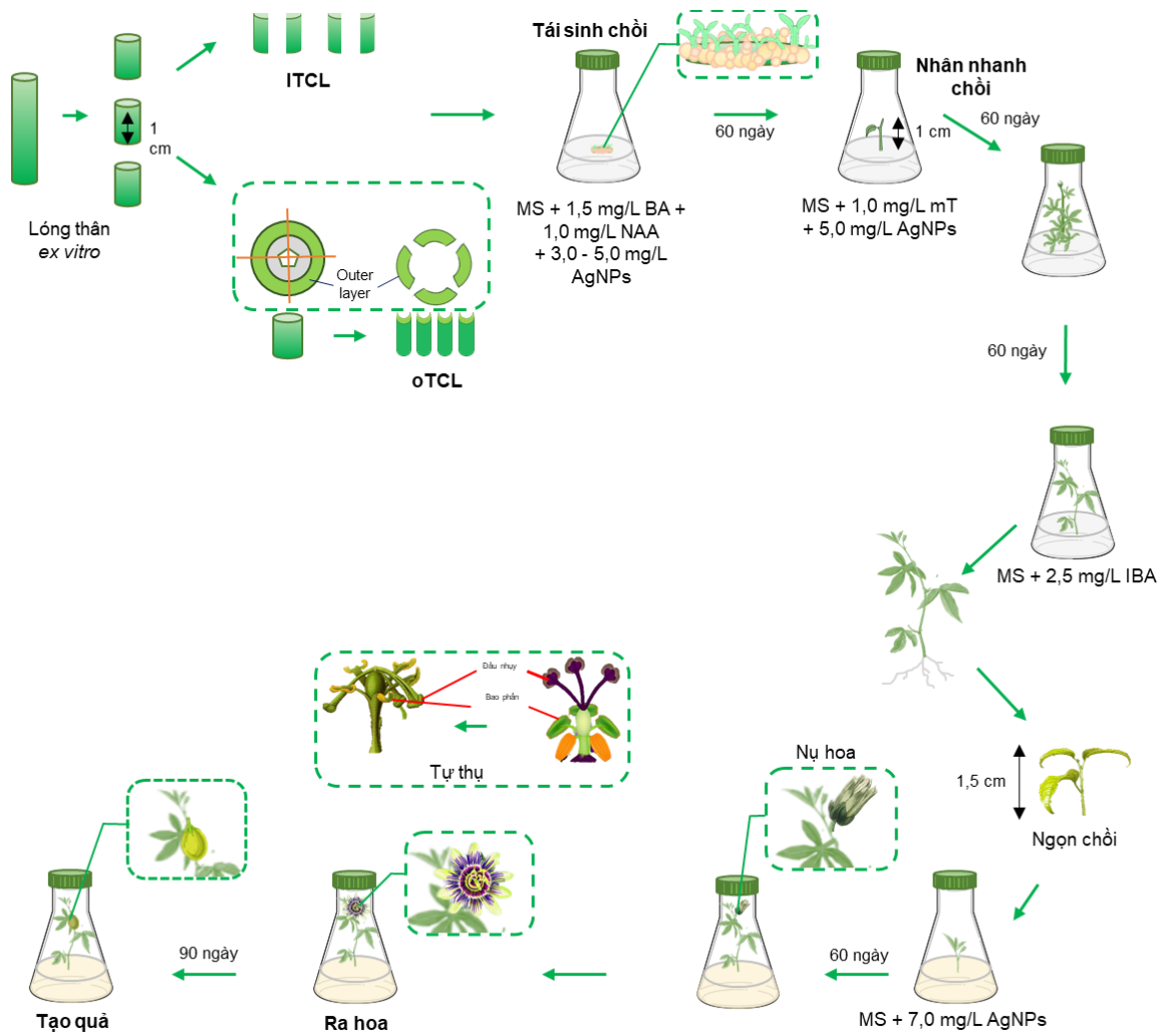
166. Kolář J., Johnson C.H., Macháčková I., 2003, Exogenously applied melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) affects flowering of the short-day plant *Chenopodium rubrum*, *Physiol Plant*, 118(4), pp. 605-12.
167. Prameswara V.A., Johnston M., Perkins M., Robertson V., Ratnadewi D., 2009, Ethylene influences development and flowering of *Ptilotus* spp. *in vitro* and *ex vitro*, *Sci Hortic*, 122(2), pp. 227-32.
168. Würschum T., Tucker M.R., Maurer H.P., Leiser W.L., 2015, Ethylene inhibitors improve efficiency of microspore embryogenesis in hexaploid triticale, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 122(3), pp. 751-7.
169. Ngan H.T.M., Tung H.T., Nghiep N.D., Le B.V., Nhut D.T., 2019, The effect of silver nanoparticles on the limitation of ethylene gas and hydrolytic enzymatic activity in micropropagation of rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby love'), *Vietnam J Biotechnol*, 17(3), pp. 505-17.
170. Landa P., 2021, Positive effects of metallic nanoparticles on plants: Overview of involved mechanisms, *Plant Physiol Biochem*, 161, pp. 12-24.
171. Martin R.E., Postiglione A.E., Muday G.K., 2022, Reactive oxygen species function as signaling molecules in controlling plant development and hormonal responses, *Curr Opin Plant Biol*, 69, pp. 102293.
172. Devireddy A.R., Zandalinas S.I., Fichman Y., Mittler R., 2021, Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress, *Plant J*, 105(2), pp. 459-76.
173. Cuong D.M., Mai N.T.N., Tung H.T., Khai H.D., Luan V.Q., Phong T.H., Vinh B.V.T., Phuong H.T.N., Binh N.V., Nhut D.T., 2023, Positive effect of silver nanoparticles in micropropagation of *Limonium sinuatum* (L.) Mill. 'White', *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 155(2), pp. 417-32.
174. Tsuji H., Sato M., 2024, The function of florigen in the vegetative-to-reproductive phase transition in and around the shoot apical meristem, *Plant Cell Physiol*, 65(3), pp. 322-37.
175. Whipple C.J., Hall D.H., DeBlasio S., Taguchi-Shiobara F., Schmidt R.J., Jackson D.P., 2010, A conserved mechanism of bract suppression in the grass family, *The Plant Cell*, 22(3), pp. 565-78.

176. Geng M., Li L., Ai M., Jin J., Hu D., Song K., 2022, Recent advances in metal-based nanoparticle-mediated biological effects in *Arabidopsis thaliana*: A mini review, *Materials (Basel)*, 15(13), pp. 4539.
177. Tung H.T., Bao H.G., Cuong D.M., Ngan H.T.M., Hien V.T., Luan V.Q., Vinh B.V.T., Phuong H.T.N., Nam N.B., Trieu L.N., Truong N.K., Hoang P.N.D., Nhut D.T., 2021, Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum, *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 57(6), pp. 897-906.
178. Haque S.M., Ghosh B., 2013, In vitro completion of sexual life cycle: Production of R1 plants of *Ipomoea quamoclit* L, *Propag Ornament Plants*, 13(1), pp. 19-24.
179. Sivanandhan G., Theboral J., Dev G.K., Selvaraj N., Manickavasagam M., Ganapathi A., 2015, Effect of carbon and nitrogen sources on *in vitro* flower and fruit formation and withanolides production in *Withania somnifera* (L.) Dunal, *Indian J Exp Biol*, 53(3), pp. 177-83.
180. Das M.R., Hossain T., Mia M.A.B., Ahmed J.U., Kariman A.J.M.S., Hossain M.M., 2013, Fruit setting behaviour of passion fruit, *Am J Plant Sci*, 4(5), pp. 1066-73.
181. Tymoszuk A., Kulus D., 2020, Silver nanoparticles induce genetic, biochemical, and phenotype variation in chrysanthemum, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 143(2), pp. 331-44.
182. Akeel A., Jahan A., 2020, Role of Cobalt in plants: Its stress and alleviation. In: Naeem M, Ansari AA, Gill SS, editors. *Contaminants in agriculture: Sources, impacts and management*, Springer International Publishing, pp. 339-57.
183. Boobalan S., Kamalanathan D., 2019, Spermidine influences enhanced micropropagation and antibacterial activity in *Aerva javanica* (Burm. F.) Shult, *Ind Crops Prod*, 137, pp. 187-96.
184. Ahmed S., Ariyaratne M., Patel J., Howard A.E., Kalinoski A., Phuntumart V., Morris P.F., 2017, Altered expression of polyamine transporters reveals a role for spermidine in the timing of flowering and other developmental response pathways, *Plant Sci*, 258, pp. 146-55.



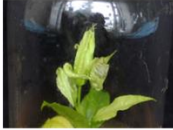





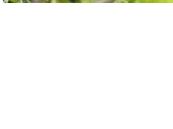

185. Kaur-Sawhney R., Kandpal G., McGonigle B., Galston A.W., 1990, Further experiments on spermidine-mediated floral-bud formation in thin-layer explants of Wisconsin 38 tobacco, *Planta*, 181(2), pp. 212-5.
186. Huang C.K., Chang B.S., Wang K.C., Her S.J., Chen T.W., Chen Y.A., Cho C.L., Liao L.J., Huang K.L., Chen W.S., Liu Z.H., 2004, Changes in polyamine pattern are involved in floral initiation and development in *Polianthes tuberosa*, *J Plant Physiol*, 161(6), pp. 709-13.
187. Sousa-Baena M.S., Sinha N.R., Hernandez-Lopes J., Lohmann L.G., 2018, Convergent evolution and the diverse ontogenetic origins of tendrils in angiosperms, *Front Plant Sci*, 9, pp.
188. Scorza L.C.T., Hernandez-Lopes J., Melo-de-Pinna G.F.A., Dornelas M.C., 2017, Expression patterns of *Passiflora edulis* APETALA1/FRUITFULL homologues shed light onto tendril and corona identities, *EvoDevo*, 8(1), pp. 3.
189. Malmberg R.L., McIndoo J., 1983, Abnormal floral development of a tobacco mutant with elevated polyamine levels, *Nature*, 305(5935), pp. 623-5.
190. de Cantú L.B., Kandeler R., 1989, Significance of polyamines for flowering in *Spirodela punctata*, *Plant Cell Physiol*, 30(3), pp. 455-8.
191. Tiburcio A.F., Kaur-Sawhney R., Galston A.W., 1988, Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures, *Plant Cell Physiol*, 29(7), pp. 1241-9.
192. Rastogi R., Sawhney V.K., 1990, Polyamines and flower development in the male sterile stamenless-2 mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Plant Physiol*, 93(2), pp. 446-52.
193. Nambeesan S.U., Mattoo A.K., Handa A.K., 2019, Nexus between Spermidine and floral organ identity and fruit/seed set in tomato, *Front Plant Sci*, 10, pp.
194. de Dios P., Matilla A.J., Gallardo M., 2006, Flower fertilization and fruit development prompt changes in free polyamines and ethylene in damson plum (*Prunus insititia* L.), *J Plant Physiol*, 163(1), pp. 86-97.

PHỤ LỤC

1.1. Sơ đồ thể hiện tóm tắt quy trình ra hoa và tạo quả *in vitro* ở cây chanh dây tím dựa trên AgNPs.



1.2. Khoảng thời gian trung bình để hoàn thành quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả *in vitro* từ chồi ngọn (1,5 cm) của cây chanh dây tím trong môi trường bổ sung 7 mg/L AgNPs riêng lẻ và kết hợp với 0,5 mM Spermidine.

| | AgNPs | SỰ KIỆN | AgNPs + Spd | |
|---|---------------------------|--|----------------------------|---|
|  | Ngày 1 | Chồi <i>in vitro</i> 1,5 cm | Ngày 1 |  |
|  | Ngày 40 - 45 | Cảm ứng chồi hoa (0,1 mm; quan sát giải phẫu) | Ngày 65 - 70 |  |
|  | Ngày 55 - 60 (51,72%) | Hình thành nụ hoa (quan sát bằng mắt thường) | Ngày 85 - 90 (17,78%) |  |
|  | Ngày 65 - 70 | Nụ hoa đầu tiên nở | Ngày 90 - 100 |  |
|  | Ngày 90 - 100 (56,79%) | Tạo quả non (5 - 10 mm; quan sát bằng mắt thường) | Ngày 110 - 120 (64,45%) |  |

1.3. Khoảng thời gian trung bình và một số đặc điểm của quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của chanh dây tím trong điều kiện *in vitro* và điều kiện tự nhiên.

