

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

TRƯỜNG 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



Nguyễn Thị Trung

Người hướng dẫn 1

GS.TS. Dương Tấn Nhựt

Người hướng dẫn 2

TS. Nguyễn Bá Nam

Hà Nội - 2024

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 Nhật 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 8 tháng 8 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 28 tháng 8 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 VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC BẢNG.....	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH, ĐỒ THỊ.....	ix
MỞ ĐẦU.....	1
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 thọ 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
1.4.3. 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	32
1.4.3.3. Sự ra hoa và tạo quả.....	33
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP 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. Bố trí thí nghiệm.....	39
2.3.1.1. Nội dung 1: Nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây <i>in vitro</i> 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 <i>in vitro</i> 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>	91
3.2.3.1. Ảnh hưởng của Spd đơn lẻ đến sự sinh trưởng và ra hoa <i>in vitro</i>	91
3.2.3.2. Ảnh hưởng của Spd kết hợp với AgNPs đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả <i>in vitro</i>	93
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	102
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	103
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	104
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ 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
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 cơ bản 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.	91
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.	93

DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Mô hình ABC về sự phát triển của các cơ quan 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	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 ngoài tự nhiên.....	31
Hình 2.1. Sơ đồ thể hiện khái quát các nội dung nghiên cứu.....	35
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 sinh trưởng 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 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> và hướng xuống ở hoa ngoài tự nhiên	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 MS không bổ sung CoCl ₂ đến sự sinh trưởng của chồi sau 60 ngày nuôi cấy	88
Hình 3.25. Hàm lượng GA ₃ , 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 các nồng độ Spd khác nhau kết hợp với 7,0 mg/L AgNPs sau 90 ngày nuôi cấy	94
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.....	94
Hình 3.29. Sự hình thành chồi hoa của cây chanh dây tím ở điều kiện tự nhiên và <i>in vitro</i>	95
Hình 3.30. Sự chuyển đổi hình thành sơ khởi hoa <i>in vitro</i>	97
Hình 3.31. Hình ảnh giải phẫu của sơ khởi hoa cảm ứng từ chồi <i>in vitro</i> sau 65 ngày nuôi cấy	97
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.....	98
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.....	99

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]. 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 [3].

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 [4]. 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 (plant growth regulator - PGR) và khoáng chất [1, 5]. 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 [4]. 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 [6]. Hiện tại, sự ra hoa *in vitro* chủ yếu được quan sát và mô tả trong quá trình vi nhân giống ở một số loài cây cảnh và cây rau [5-12].

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 [13]. 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* [14]. 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 axit gibberellic A₃ (GA₃), axit abscisic (ABA), bạc nitrate (AgNO₃), các hạt nano bạc (silver nanoparticles - AgNPs), các hạt nano coban (cobalt nanoparticles - CoNPs), và 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*) trong điều kiện nuôi cấy *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 bao gồm GA₃, ABA, AgNO₃, AgNPs, CoNPs và Spd 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 phôi soma (somatic embryo - 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 Spd 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 [15]. Trong khi đó, một số giống lúa được kích thích ra hoa trong điều kiện ngày ngắn [16]. 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 [17]. 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 [17]. 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 [18]. 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 [19].

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 phấn hoa từ các loài thực vật quý 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 (shoot apical meristem - 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 [20]:

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* [21].

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 [22]. 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 thụ cảm 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 ra 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 [21].

Bên cạnh đó, sự ra hoa ở một số loài thực vật chịu tác động của chất lượng ánh sáng [21]. 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 [23].

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 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 mầm 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 ít 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 và cho thấy rằng sự ra hoa có cơ sở biểu sinh [17].

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 hoang dại ở cả quang kỳ ngày dài và quang kỳ ngày ngắn [24]. 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.

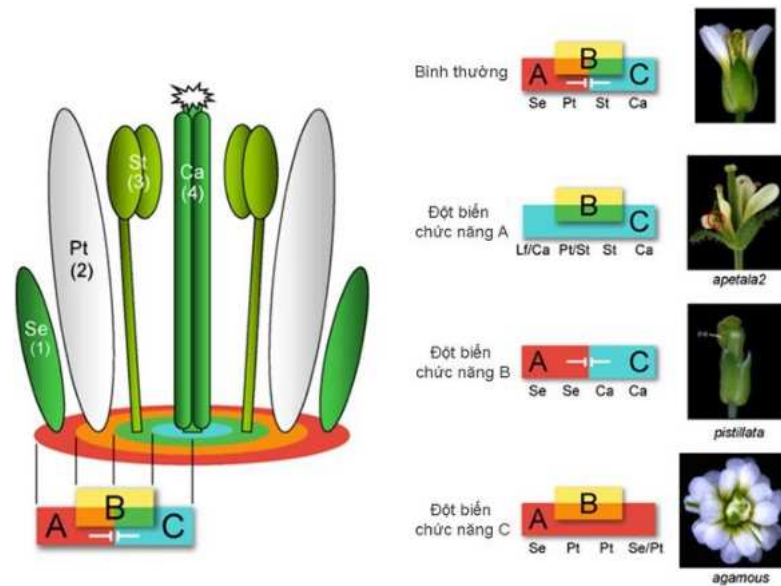
Tác động này của *FLC* phụ thuộc vào hàm lượng, và do đó *FLC* hoạt động như một yếu tố xác định khả năng của các con đường ra hoa để đáp ứng với các tín hiệu. Vì vậy, con đường tự chủ thúc đẩy sự ra hoa một cách gián tiếp bằng cách tạo điều kiện đáp ứng các tín hiệu tích cực thúc đẩy sự ra hoa [25].

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 [26]. Các đột biến ngăn chặn tín hiệu hoặc ngăn chặn sinh tổng hợp GAs làm chậm quá trình ra hoa, đặc biệt trong những ngày ngắn [17]. 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 [27]. GAs dường như hoạt động độc lập với con đường quang chu kỳ bởi vì sự trì hoãn ở đột biến là tương đối nhỏ trong điều kiện ngày dài so với điều kiện ngày ngắn. Hơn nữa, một đột biến kép giữa đột biến suy giảm GAs với quang chu kỳ biểu hiện một kiểu hình cộng gộp là sự ra hoa trễ trong điều kiện ngày dài [28]. 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* [27].

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) [29].

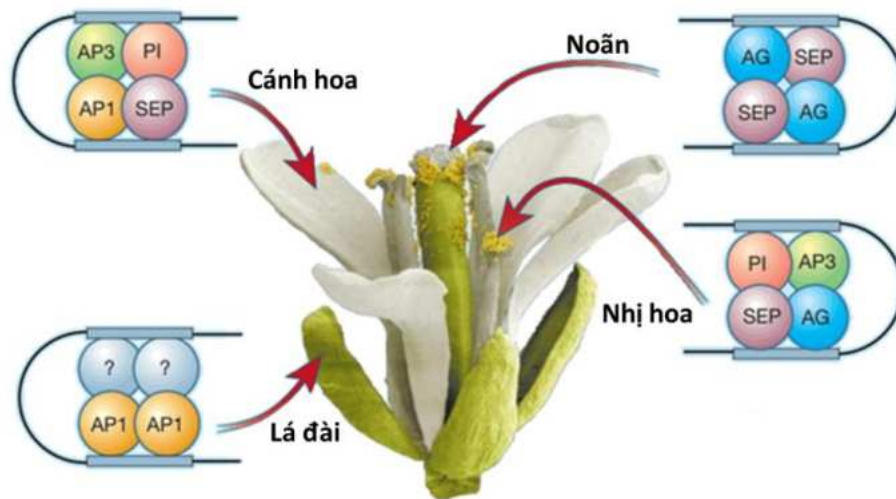


Hình 1.1. Mô hình ABC về sự phát triển của các cơ quan hoa. Các vòng xoắn của hoa *Arabidopsis thaliana* được ký hiệu: Se (1): lá đài, Pt (2): cánh hoa, St (3): nhị hoa, Ca (4): lá noãn. Góc bên phải thể hiện các hoa được quan sát khi xảy ra biểu hiện đột biến của các nhóm A, B và C [29].

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 minh. 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 [30].



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 [30].

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 [31]. 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 [32].

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 *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench bị ảnh hưởng bởi độ tuổi bắt đầu cảm ứng quang kỳ và thời gian cảm ứng quang kỳ [33].

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 [32]. 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% [4].

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 [34]. 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 [23].

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 [32]. 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, chẳng hạn như sự uốn cong của cơ quan hoa [35].

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 hình thành mầm 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* [36]. 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 [37]. 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 [38].

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 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 lông 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 [32]. 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 [39].

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 [40]. 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 [41]. 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 *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* [41].

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 hormone [42]. 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 [43].

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

1.2.5.1. Polyamine

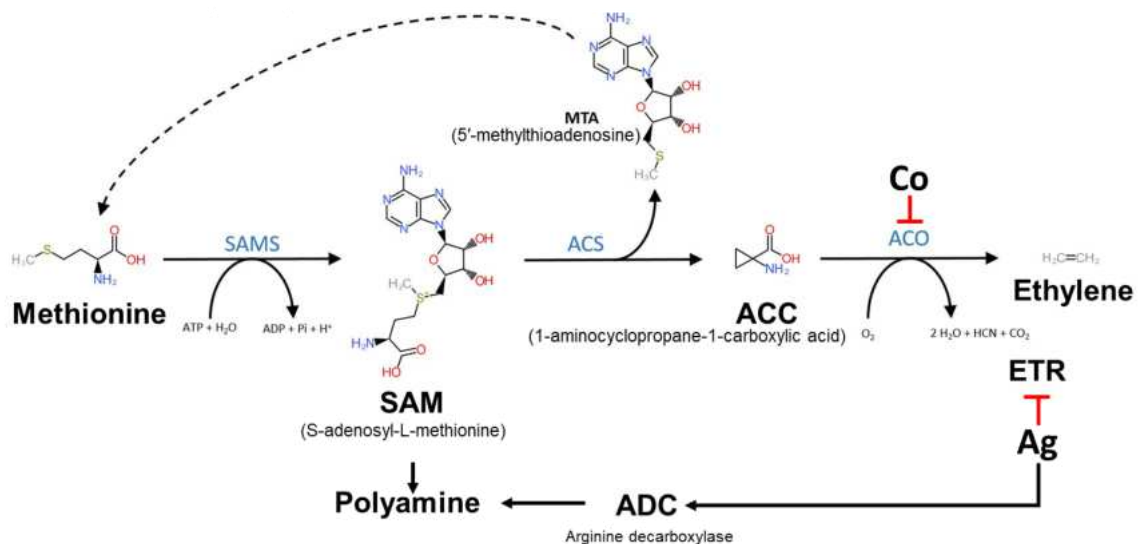
Polyamine (PA), là những hợp chất hữu cơ bao gồm có 2 hoặc nhiều nhóm amin, hoạt động như chất điều hòa sinh trưởng và được coi là phổ biến trong tất cả các sinh vật sống. Putrescine (Put), Spermidine (Spd), Spermine (Spm) là các loại PA có mặt phổ biến trong sinh vật sống bao gồm cả thực vật. Ở thực 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 nhiễm 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 nhiễm 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 [44].

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 [45].

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 [46]. 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) [47-49].

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 [47, 50]. Ở một số loài, ETH có vai trò kích thích sự ra hoa, chẳng hạn như sự ra hoa ở một số loài cây trồng như ở thơm 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 cũng đã báo cáo về sự ra hoa và tạo quả *in vitro* ở một số loài thực vật như *Capsicum* spp. [2], *Solanum americanum* và *Solanum villosum* [9] 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 [10].

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

ngiên 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 cấy, hình thành và tăng sinh SE, tăng hiệu quả tái sinh chồi và tăng sự tích lũy các hợp chất thứ cấp [56-58]. 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 [59]. 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 [60].

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 [60]. 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 [61]. 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, 8]. 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. Sự sụt 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 $AgNO_3$ ảnh hưởng tốt đến sự ra hoa của một số loài chi *Capsicum* [2]. Trong số đó, các PGR là nhân tố quan trọng trong lĩnh vực ra hoa *in vitro* ở thực vật. Một số nghiên cứu sử dụng nguồn mẫu và các PGR 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, 8, 62, 63].

Loài	Mẫu cấy 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, $Ag_2O_3S_2$
<i>Ceropegia bulbosa</i> var. <i>bulbosa</i>	Đốt thân	GA_3 , BA
<i>Ceropegia jainii</i> Ansari & B.G.Kulk.	Đốt thân	BA, Spm
<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

Loài	Mẫu cây ban đầu	PGR
<i>Cymbidium goeringii</i> Rchb.f	Thân rễ	NAA, BA, GA ₃
<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>	[64]
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Lá	+	+	+	[65]
<i>Begonia parvula</i>	Hạt	+	+	<i>kth</i>	[66]
<i>Lens culinaris</i> Medik.	Hạt	+ (58%)	+	+ (70%)	[67]
<i>Cleome viscosa</i>	Đốt thân	+ (72,74%)	+	+ (75%)	[6]
<i>Scrophularia takesimensis</i> Nakai	Chồi	+	+	<i>kth</i>	[68]
<i>Vicia faba</i>	Hạt	+	+ (90%)	+	[69]
<i>Withania somnifera</i>	Chồi ngọn	+ (74,9%)	+	+ (66%)	[7]
<i>Capsicum</i> spp.	Chồi ngọn	+	+	<i>kth</i>	[2]
<i>Ceropegia rollae</i> Hemadri	Đốt thân	+	<i>kth</i>	<i>kth</i>	[70]
<i>Cucumis sativus</i>	Đốt thân	+	<i>kth</i>	<i>kth</i>	[71]
<i>Solanum americanum</i> , <i>Solanum villosum</i>	Cây con	+	+	+ (86,4 - 94,5%)	[9]
<i>Portulaca pilosa</i>	Thân	+	+	+ (78%)	[11]
<i>Oxalis corniculata</i>	Đốt thân	+	+	+ (75%)	[63]

(+: 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 2,0 mg/L BA, 1 mg/L ABA và 0,5 mg/L IAA. Quả *in vitro* hình thành trong vòng 162 ngày sau khi tự thụ phấn [72]. 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 [65].

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 μ M $Ag_2O_3S_2$. 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*) [9]. $AgNO_3$ (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 [64]. 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 [6].

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 [73]. 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 [68]. 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 [70]. 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 [7]. Nhìn chung, có thể thấy rằng sự ra hoa và tạo quả *in vitro* ở thực vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, chẳng hạn như kiểu gen thực vật, loại mẫu cấy, điều kiện môi trường và các chất bổ sung trong môi trường nuôi cấy. Vì vậy, việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng quyết định đến sự ra hoa và tạo quả *in vitro* đối với từng loài thực vật khác nhau trở thành một thách thức và đang được quan tâm nghiên cứu.

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.

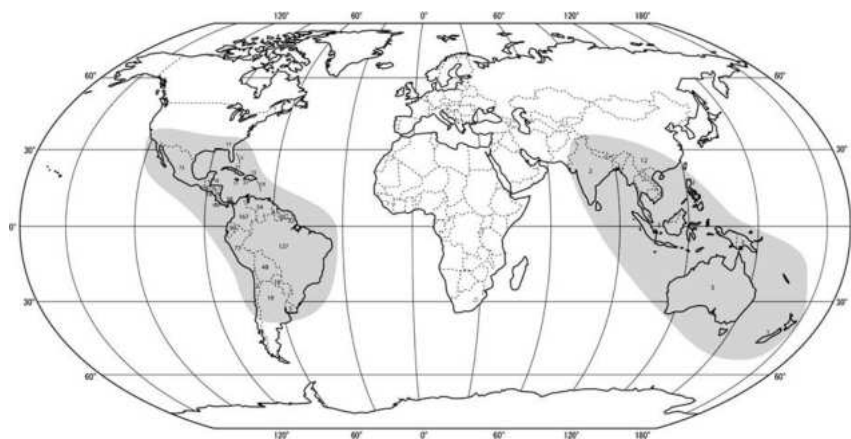
Lá: Lá có dạng ba thùy, màu xanh, viền ngoài có dạng răng cưa, cây non lá ít chia thùy và có hình trái xoan.

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 [13].

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. Loại 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) [13].



Hình 1.4. Sự phân bố của chi *Passiflora* (thể hiện tại vùng màu xám) [13].

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 [74].

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*) [13].

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 [75]. 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 [76]. 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 [77].

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	[78]
2	Những hiểu biết mới đối với quá trình phát sinh cơ quan <i>in vitro</i> trên chi <i>Passiflora</i>	2007	[79]

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	[80]
4	Tạo phôi soma từ phôi hợp tử trưởng thành của kiểu gen cây chanh dây thương mại (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	2011	[81]
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	[82]
6	Các phản ứng đối với việc tạo phôi soma ở một số loài <i>Passiflora</i> spp.	2015	[83]
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	[84]
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	[85]
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	[86]
10	Nghiên cứu tạo mô sẹo <i>in vitro</i> trên <i>Passiflora edulis</i> Sims: một cây thuốc quý	2017	[87]
11	Kích thích sự phát sinh chồi thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào lá ở <i>Passiflora edulis</i> Sims	2018	[88]
12	Tái sinh cây tam bội <i>in vitro</i> từ nuôi cấy nội nhũ của cây chanh dây thương mại	2018	[89]
13	Thiết lập nguồn mẫu cây vô tính cây chanh dây tím và cây chanh dây vàng	2018	[90]
14	Sự tái sinh chồi và vi nhân giống ở cây chanh dây tím thông qua nuôi cấy các mẫu cây lớp mỏng tế bào cắt dọc	2019	[91]
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	[92]

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	[93]
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	[94]
18	Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng ở chanh dây trong tái sinh thực vật và vi nhân giống	2022	[95]
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	[96]
20	Sản xuất chồi <i>in vitro</i> chanh dây sạch virus bằng phương pháp nuôi cấy mô phân sinh đỉnh	2023	[97]

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) [90]. 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 [92]. 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 [89]. Riêng đối với công tác tái sinh thực vật *in vitro*, kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (thin cell layer - 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 cấy TCL bao gồm các mẫu cấy 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 [95]. Kỹ thuật TCL đã được ứng dụng trên nhiều loài

cây dược liệu như *Scutellaria ocmulgee* [98], *Withania coagulans* [99], *Panax vietnamensis* var. *langbianensis* [100]. Kỹ thuật này cũng được sử dụng trong tái sinh nhiều loài cây rau và cây ăn quả, chẳng hạn như *Rubus* spp. [101], *Ficus carica* [102], *Actinidia chinensis* Planch [103]. Kỹ thuật TCL đã được ứng dụng thành công trong vi nhân giống hơn 20 loài phong lan [104, 105] và nhiều loài cây cảnh khác như *Lilium* [106], *Cattleya forbesii* Lindl [107], *Begonia* × *tuberhybrida* Voss [108], *Clivia miniata* Regel [109]. 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 [110]. Ví dụ, một quy trình tạo phôi *in vitro* hiệu quả từ các mẫu cây 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 [111].

Đối với chanh dây tím, nhân giống *in vitro* chủ yếu dựa vào tái sinh chồi [112]. 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 [79, 113], rễ [80], lá [86], nội nhũ [89] và đốt thân [92]. 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* [88, 91, 95]. 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* [90]. Do đó, việc khảo sát sự tái sinh dựa trên các mẫu cây 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 [114]. 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 [80, 86, 95]. 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 [115]. 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 [116]. 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 [112, 117]. 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 [118]. 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 [119], hoặc đa bội hóa nhân tạo [120]. 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) [117]. 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 [115, 121, 122]. 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 [84]. 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, 120, 123]. 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.

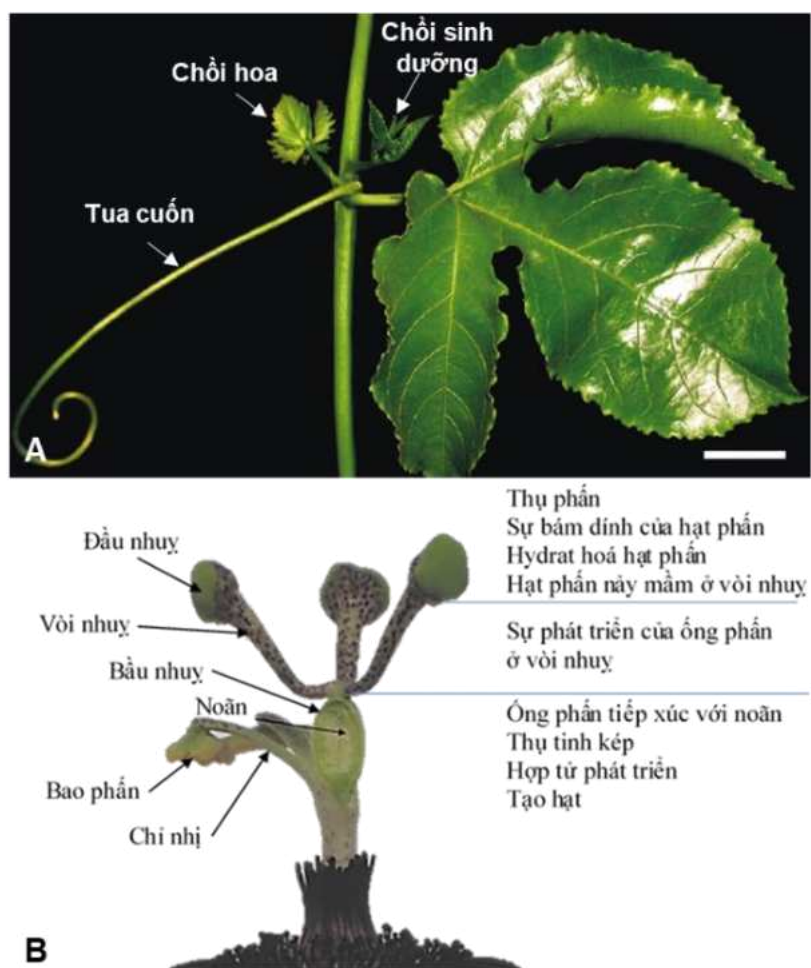
Đối với chanh dây tím, quá trình tạo cây con chủ yếu dựa trên cơ chế phát sinh cơ quan [112]. Sự tái sinh này đã được thực hiện thành công từ các loại mô và cơ quan khác nhau, chẳng hạn như trụ dưới lá mầm [79, 113], lá [86], rễ [80], đốt thân [92], và nội nhũ [89]. Ngược lại, hầu hết các hệ thống phát sinh SE đã được thiết lập đều sử dụng phôi hợp tử có nguồn gốc từ hạt trưởng thành làm mẫu cây [81, 84, 94]. 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 [86]. 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). Đây dường như là cấu tạo phổ biến được thiết lập ở loài này [124]. 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 có thể 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 [13].



Hình 1.6. Đặc điểm đốt thân chứa chồi hoa và cấu trúc hoa của cây chanh dây tím ngoài tự nhiên. **A.** Đặc điểm của đốt thân chứa chồi hoa (Thước: 2 cm) [124]. **B.** Mặt cắt hoa thể hiện các cơ quan của hoa và các sự kiện sau thụ phấn [125].

1.4.3.2. Hiện tượng tự bất 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) [126]. 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 [127]. Nhiều loài 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 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.

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 bất hợp một phần (*partial self-incompatibility*), nghĩa

là chúng vẫn có khả năng tự thụ phấn nhưng số lượng hạt tạo ra khác nhau. 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 [128-130].

1.4.3.3. Sự ra hoa và tạo quả

Ngoài điều kiện tự nhiên, chanh dây tím có khả năng ra hoa và tạo quả quanh năm. Đối với giống này, sự ra hoa và tạo quả được ghi nhận sau khi trải qua giai đoạn non nhất định, khoảng từ 6 đến 9 tháng hoặc có thể thay đổi tùy theo điều kiện trồng trọt. 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 tím không phụ thuộc lớn vào quang kỳ ngoài điều kiện tự nhiên. 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 [131].

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* [14]. 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 cấy. Các mẫu lá và mẫu lóng chỉ ra hoa nếu chúng có nguồn gốc gần các ngọn; các mẫu cấy 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 [14].

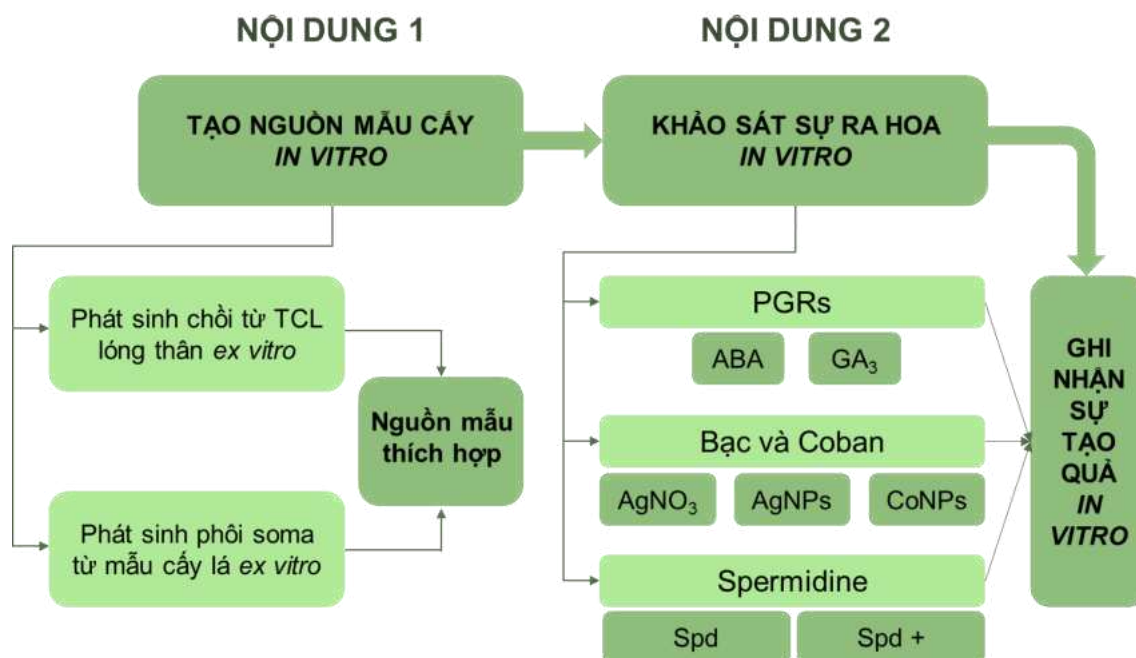
Bên cạnh đó, PGR như các nhóm auxin, cytokinin, GAs, ABA thường được sử dụng để kích thích sự ra hoa *in vitro* ở nhiều loài thực vật. Ở cây chanh dây tím, các nhóm auxin và cytokinin ở nhiều loại và nồng độ khác nhau thường được sử dụng trong quá trình nuôi cấy các chồi nhằm mục đích nhân nhanh các chồi và tạo ra các

rễ *in vitro* [132]. 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.

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.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ thể hiện khái quát các 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 spermidine đến sự sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả *in vitro*.

Nội dung tiến hành:

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

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

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

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

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

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

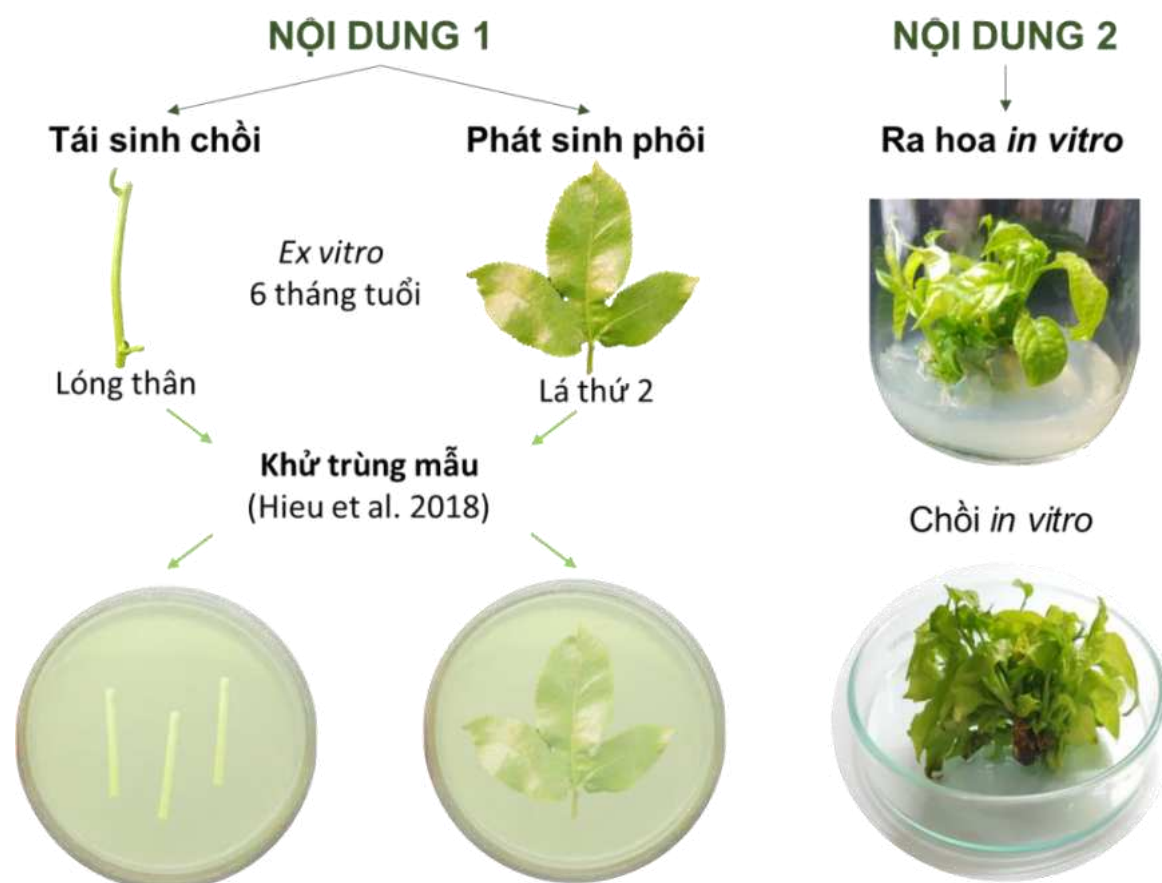
2.2. Vật liệu nghiên cứu

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) [90]. 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) [133] 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: 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), máy đo hàm lượng diệp

lục SPAD-502 (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 [134]. Dung dịch CoNPs (20 - 60 nm) thu được dựa trên chất khử $NaBH_4$ và chất ổn định carboxymethyl cellulose [135].

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, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich, Mỹ). 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) [133] 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). 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. Bố trí thí nghiệm

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

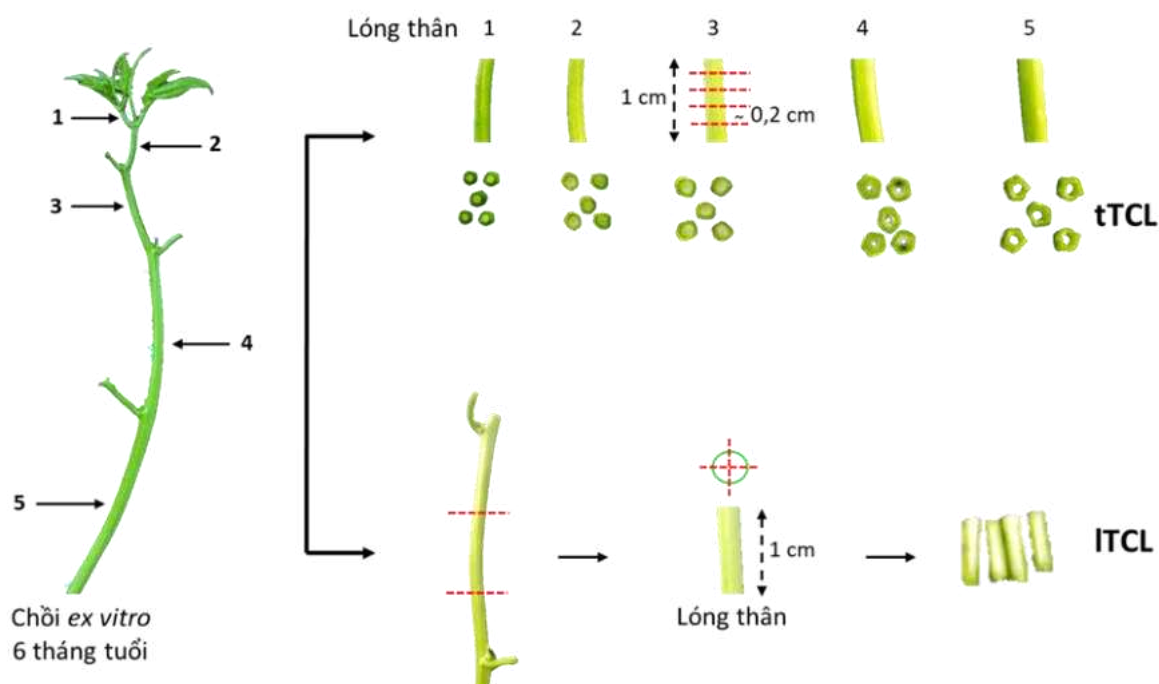
- *Thí nghiệm 1.1:* Nghiên cứu tái sinh chồi từ các mẫu cây TCL từ lóng thân *ex vitro*

Thí nghiệm 1.1.1. 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 [136] 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 1.1.2. 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:

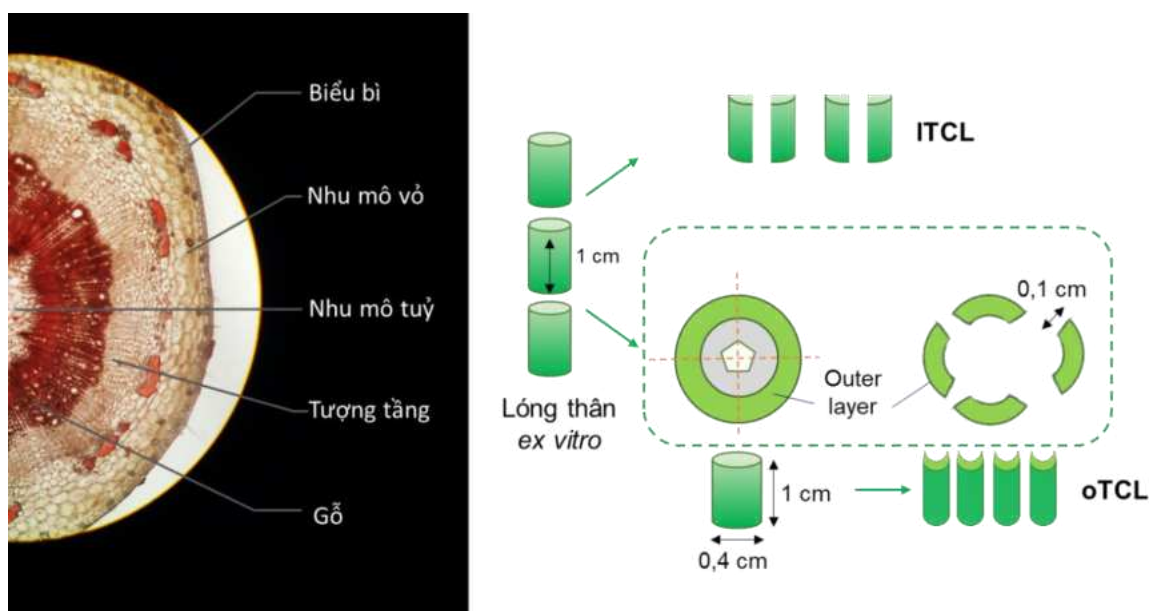
Trong thí nghiệm này, các đoạn lóng thân *ex vitro* ở vị trí lóng thứ 3 được sử dụng làm nguồn mẫu cây. Các đoạn lóng thân (1 cm) được cắt ngang thành 5 mẫu tTCL hoặc cắt dọc thành 4 mẫu ITCL như mô tả ở Hình 2.3. Các mẫu cây được nuôi cấy trong môi trường tương tự như thí nghiệm 1.1 để so sánh hiệu 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 1.1.3. 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 [136] 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 (%), số chồi/mẫu và chiều cao chồi (cm) 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 1.2:** Nghiên cứu phát sinh phôi soma (SE) từ mẫu cây lá *ex vitro*
Thí nghiệm 1.2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và NAA đến sự phát sinh SE từ mẫu cây lá

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 cây ban đầu. Trong thí nghiệm này, các mẫu cây 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 1.2.2. 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 2,0 mg/L 2,4-D 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 cây 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.

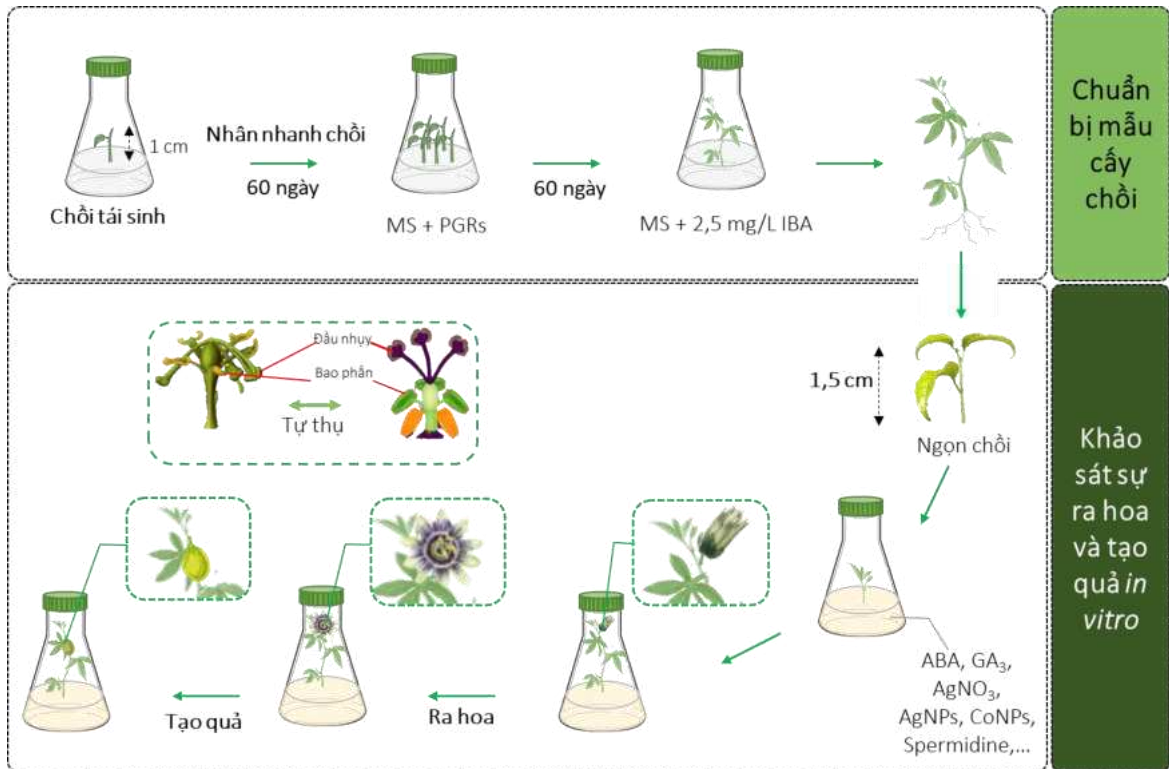
- *Thí nghiệm 1.3:* Nghiên cứu nhân nhanh nguồn mẫu cây chồi thích hợp

Tiếp theo, các chồi tái sinh từ các mẫu cây oTCL được chuyển sang môi trường nuôi cấy để tiến hành nhân nhanh chồi. Chen và cộng sự (2020) đã báo cáo rằng tại nồng độ 1,0 mg/L *meta*-Topolin (mT) thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi và cải thiện chất lượng chồi [92]. Trong thí nghiệm này, 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 mT và kết hợp với 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 hàm lượng chlorophyll tổng số (nmol/cm²) 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), các dạng bạc và coban, 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 [136] 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 cấy 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 2.1: Khảo sát ảnh hưởng của PGR ngoại sinh đến quá trình ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 2.1.1. 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 2.1.2. 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 2.2: Khảo sát ảnh hưởng của bạc và coban đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Mục đích:

Thí nghiệm 2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của AgNO₃ 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 AgNO₃ (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 2.2.2. 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 2.2.3. 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 CoCl₂, 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 2.3: Khảo sát ảnh hưởng của spermidine đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 2.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của 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 2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của Spd 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 30 bình nuôi cấy và lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, hàm lượng chlorophyll tổng số (nmol/cm²), 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 hàm lượng chlorophyll tổng số (nmol/cm^2) ở lá: Mẫu ở lá thứ 3 tính từ ngọn chồi được sử dụng để định lượng hàm lượng chlorophyll tổng số.

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 (High performance liquid chromatography - HPLC). Quy trình thực hiện như sau: Nghiền nhỏ mẫu 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 $0,45 \mu\text{m}$, rồi bơm vào hệ thống HPLC. Hệ thống máy HPLC Thermo-Ultimate 3000, cột C18 (dài 25 cm, đường kính hạt $0,5 \mu\text{m}$), đầu dò UV ở bước sóng 280 nm. Hệ dung môi pha động: (A): ACN, (B): H_2O 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 [137].

Hàm lượng GA_3 , ABA và melatonin của chồi được xác định bằng phương pháp HPLC sau 60 ngày nuôi cấy. Các hormone được định lượng bằng cách sử dụng

đường chuẩn dựa trên các chất chuẩn tương ứng. 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) [138]. 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× [132].

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. Các số liệu được xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai ANOVA bằng phần mềm thống kê SPSS 26.0 với các phép thử *Tukey* và *t* 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 NT.

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.

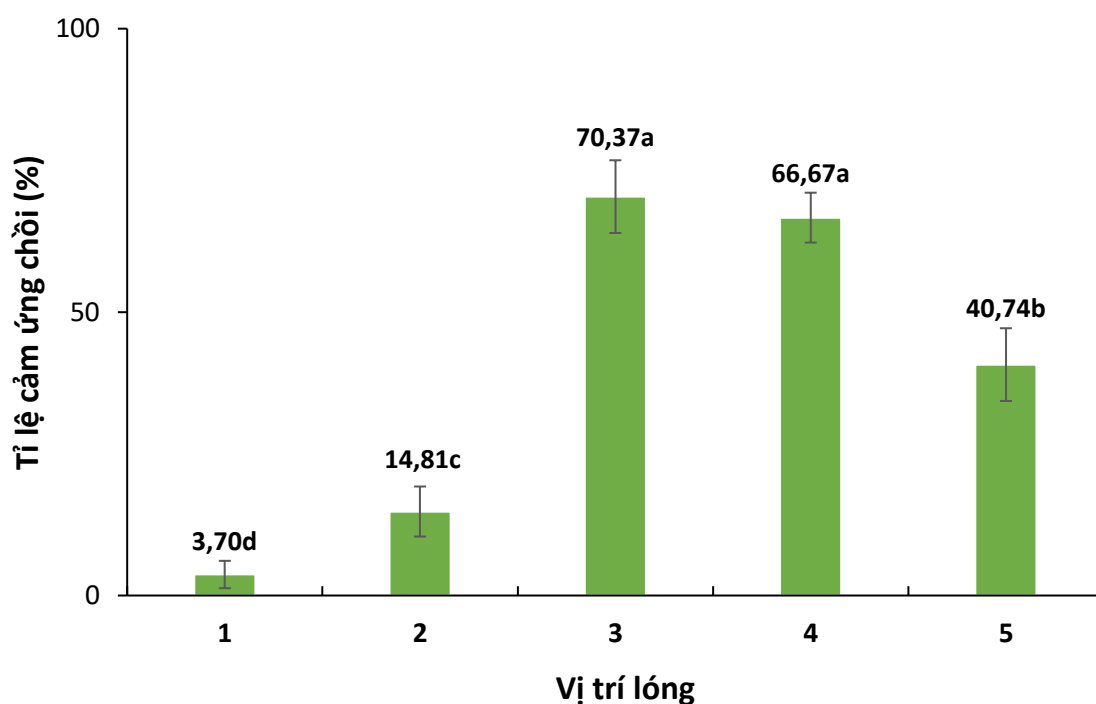
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

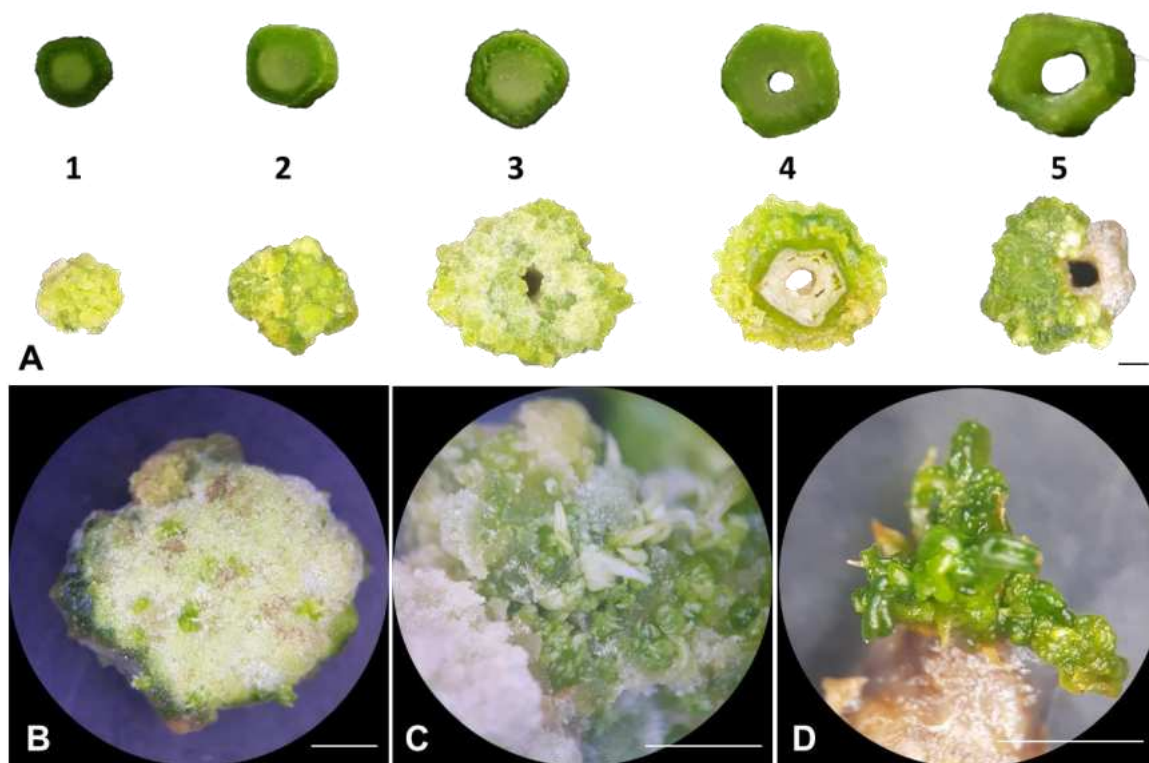
3.1.1. Nghiên cứu tái sinh chồi từ các mẫu cây TCL lóng thân *ex vitro*

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 tái sinh từ 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.



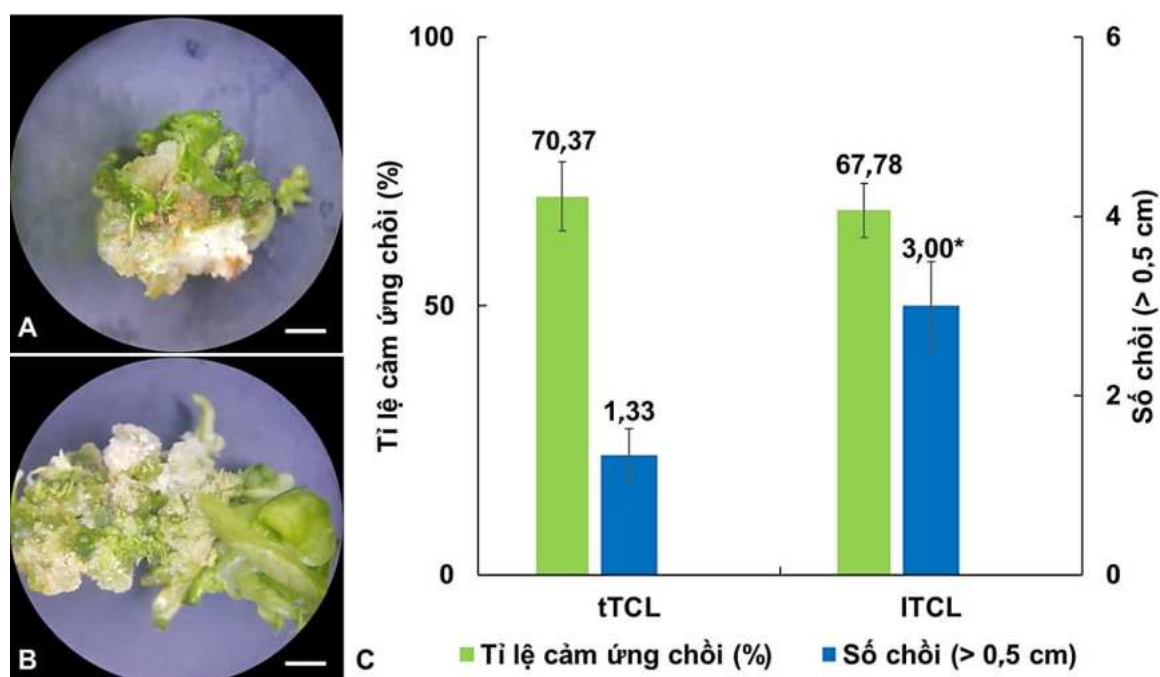
Hình 3.2. Sự cảm ứng chồi của mẫu cây tTCL từ các lóng thân *ex vitro*. **A.** Mẫu cây tTCL tại các vị trí lóng từ 1 đến 5 sau 30 ngày nuôi cấy. **B, C, D.** Chồi hình thành từ mẫu cây tTCL tại vị trí 2, 3 và 5 sau 60 ngày nuôi cấy. (Thước: 1 mm).

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 [139]. Trên cây chanh dây vàng, mẫu cây tTCL lóng thân *in vitro* từ vị trí đốt thứ 3 cũng được ghi nhận cho hiệu quả tái sinh chồi cao nhất [132]. Đối với mẫu cây tTCL từ 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 [91].

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).



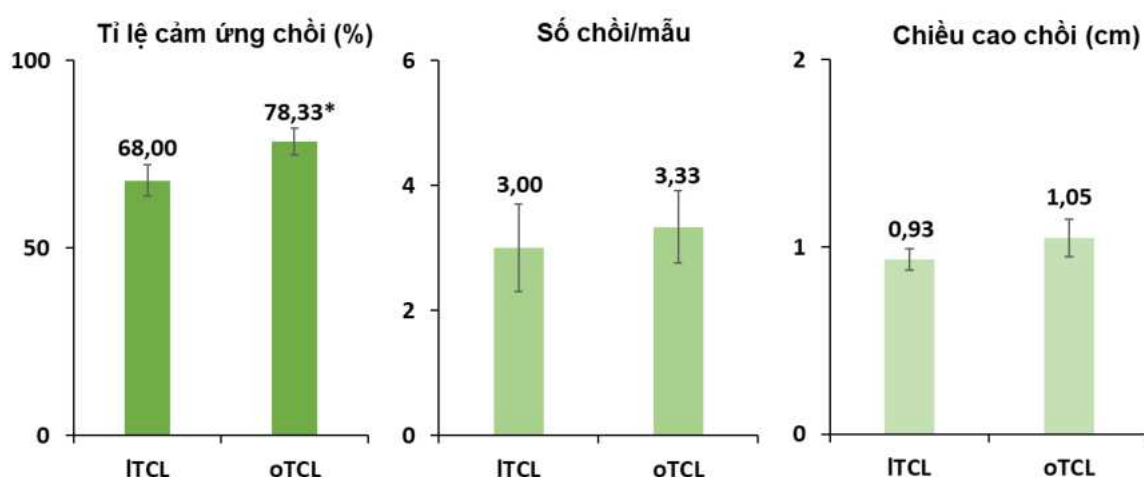
Hình 3.3. Sự cảm ứng chồi của các mẫu cây TCL từ lóng thân *ex vitro* sau 60 ngày nuôi cấy. **A, B.** Chồi hình thành từ mẫu cây tTCL và ITCL (Thước: 2 mm). **C.** So sánh tỉ lệ cảm ứng chồi và số chồi giữa mẫu cây tTCL và ITCL.

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, kết quả cho thấy 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 [136]. 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 [140].

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 (78,33%) cao hơn đáng kể đối với ITCL (68,00%) (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.

Mặt khác, nhằm mục đích tăng cường hiệu quả tái sinh chồi, hai loại mẫu cây 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

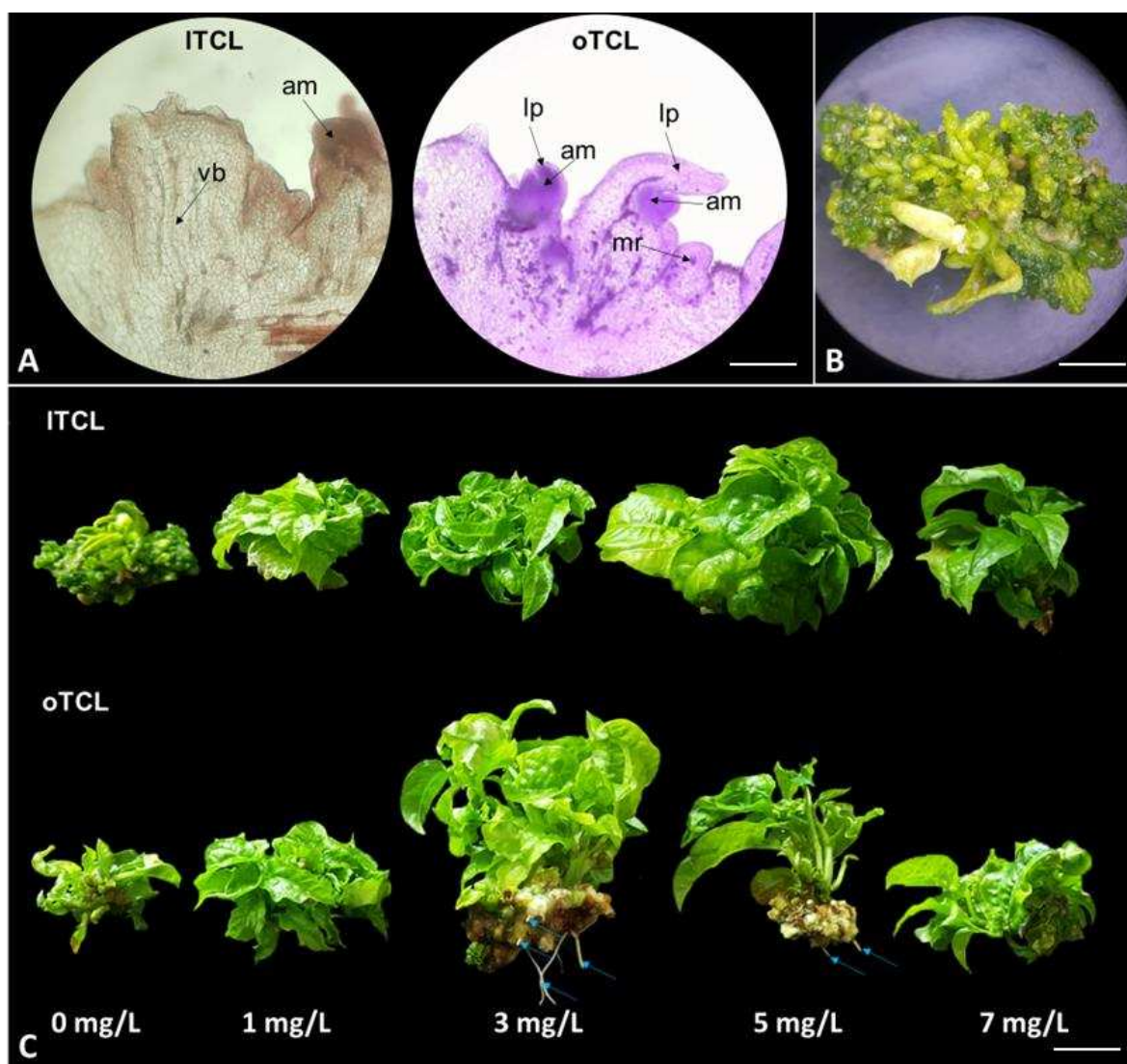
oTCL có thể được tăng cường đáng kể trong môi trường bổ sung các nồng độ AgNPs thích hợp (Bảng 3.1, Hình 3.5).

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	68,00 ^{d*}	78,33 ^c	3,00 ^d	3,33 ^d	0,93 ^c	1,05 ^d
1,0	69,33 ^d	87,67 ^b	5,00 ^c	10,67 ^b	1,23 ^{bc}	1,54 ^c
3,0	72,67 ^c	100,00^a	7,33 ^{bc}	15,33^a	1,37 ^b	2,61^a
5,0	87,67^a	87,33 ^b	11,33^a	7,33 ^c	2,53^a	2,50 ^b
7,0	80,00 ^{bc}	82,33 ^{bc}	7,67 ^b	7,00 ^c	2,50 ^a	1,47 ^{cd}

* 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 $p < 0,05$ (Tukey's test).

Đối với các mẫu cây ITCL, việc bổ sung 5,0 mg/L AgNPs cho tỉ lệ tái sinh chồi cao nhất (87,67%). 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 5,0 hoặc 7,0 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. (*am* - apical meristem: Mô phân sinh ngọn, *mr* - meristematic region: Vùng mô phân sinh), *lp* - leaf primordia: Sơ khởi lá, *vb* - vascular bundle: Mạch dẫn).

Hieu và cộng sự (2022) cũng đã ghi nhận tỉ lệ tái sinh chồi cao của mẫu cây ITCL (71,67%) từ đoạn thân *in vitro* của cây chanh dây vàng [136]. 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* của cây chanh dây tím. 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 tượng 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 [95, 99, 105, 141]. 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* [142] và *Lavandula angustifolia* [143].

Nhìn chung, đối với các mẫu cây tTCL 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 trong môi trường sau 60 ngày nuôi cấy (Bảng 3.2, Hình 3.6). Sự hình thành 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 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 $p < 0,05$ (Tukey's test).



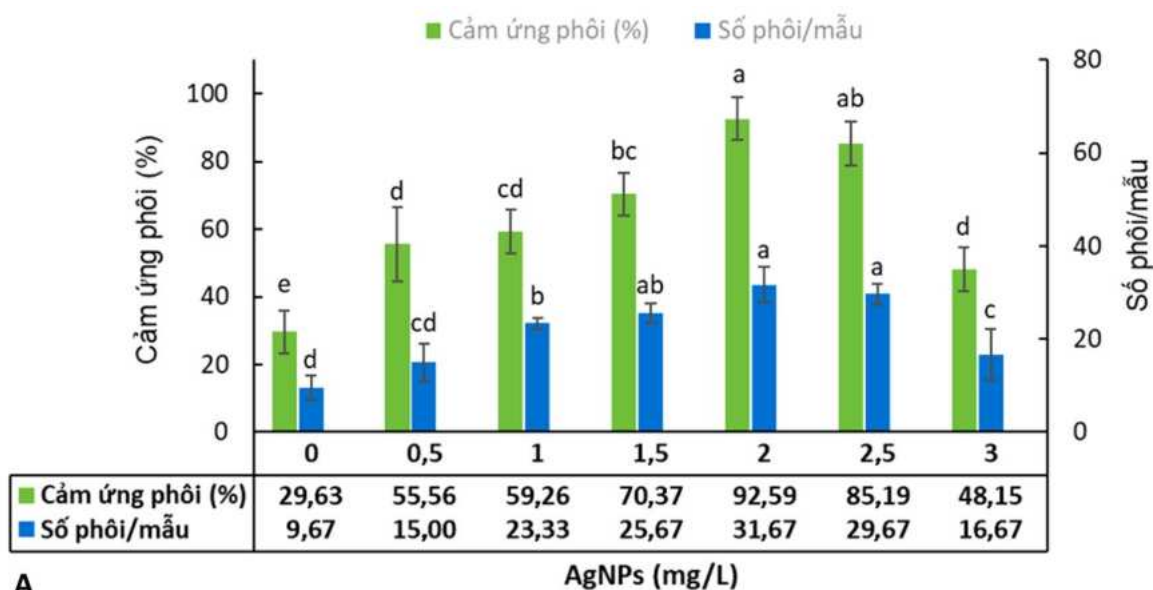
Hình 3.6. Cảm ứng SE từ mẫu cây lá sau 60 ngày nuôi cấy. **A.** và **C.** Phôi hình thành gián tiếp. **B.** và **D.** Phôi hình thành trực tiếp. (Em) SE, (Fm) Vùng mô phân sinh, (Lt) Mô lá. (A, B: Thước 0,5 mm; C, D: Thước 40 μ m).

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 [117]. 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.

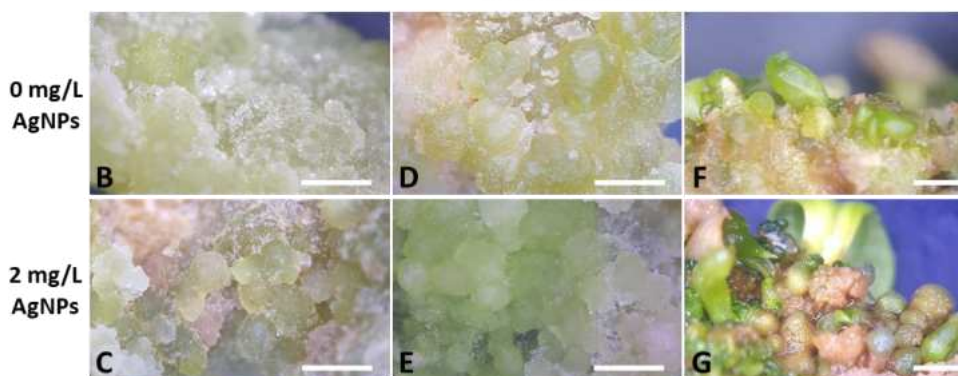
3.1.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs đối với quá trình phát sinh SE gián tiếp từ mẫu lá

Các kết quả thí nghiệm trên chỉ ra rằng nồng độ 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 rằng 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 SE 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 lượng SE trên mẫu (31,67 phôi) tối ưu. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ AgNPs lên 3,0 mg/L, cả tỉ lệ cảm ứng và số lượng SE 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) nuôi cấy.

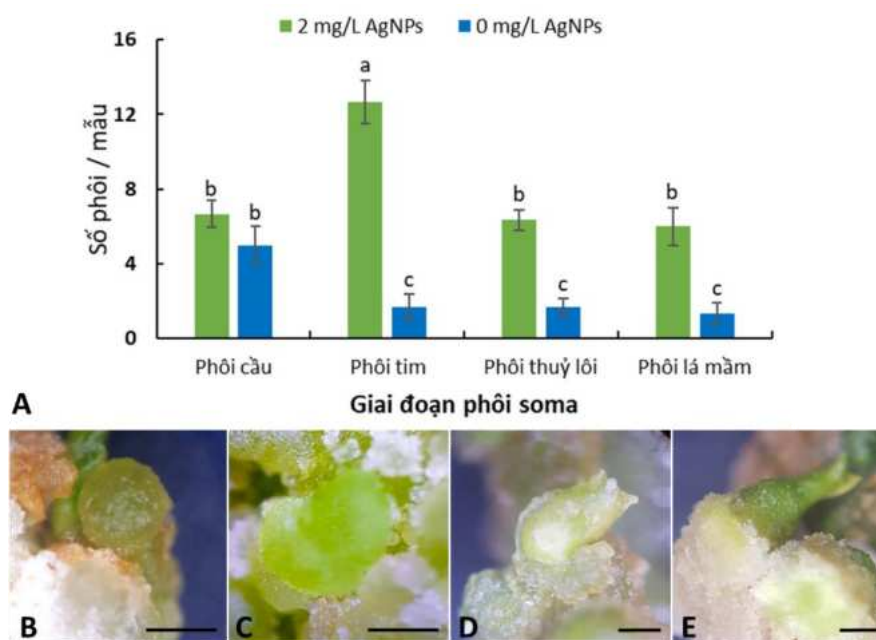


A

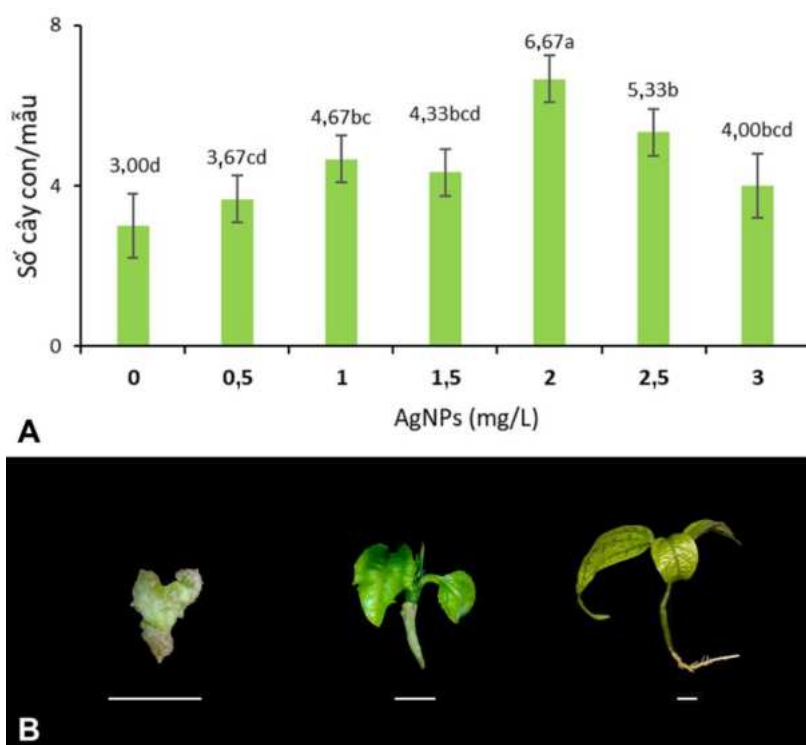


Hình 3.7. Ảnh hưởng của AgNPs đối với sự phát sinh SE gián tiếp từ mẫu lá. **A.** Sự cảm ứng SE và số lượng SE trên mỗi mẫu cây trong môi trường được bổ sung các nồng độ AgNPs khác nhau sau 75 ngày nuôi cấy. Sự phát sinh SE từ mẫu lá trên môi trường không bổ sung và bổ sung 2,0 mg/L AgNPs sau 15 ngày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

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 thuỷ 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, thuỷ 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 thủy lồi. **E.** Giai đoạn lá mầm. (Thước: 0,5 mm).



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).

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, 144]. 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 cường của các chất chống oxy hóa thường ghi nhận ở các cây được xử lý với AgNPs [145-147].

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* [148], *Leucosium aestivum* [149], và *Coffea canephora* [150]. 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* [151]. Cuong 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 loài thực vật [119]. 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 [151]. 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 [152, 153]. 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 [94]. 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 [154]. 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 ROS [147]. 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.

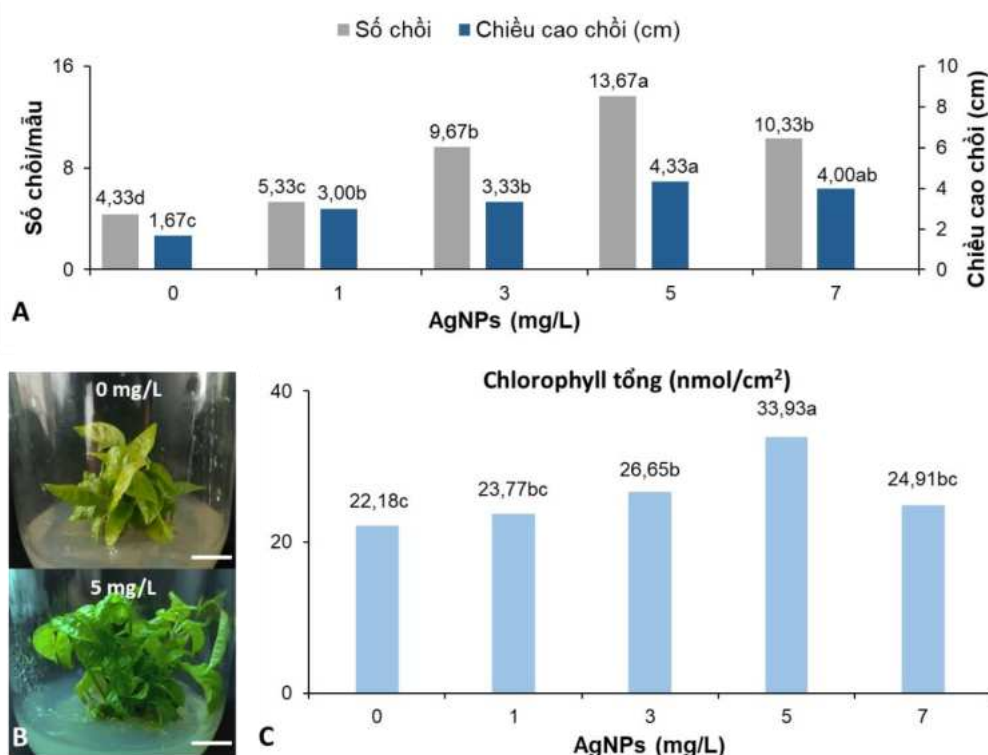
Nhìn chung, sự phát sinh SE từ mẫu cây lá cây chanh dây tím bị ảnh hưởng đáng kể bởi loại và nồng độ auxin. Sự phát sinh SE gián tiếp được ghi nhận tại 2,0 mg/L 2,4-D, trong khi việc bổ sung 2,0 mg/L NAA cho phát sinh SE trực tiếp. Mặt khác, việc bổ sung AgNPs ở tất cả các nồng độ thí nghiệm cho tỉ lệ 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 (6,67 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

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

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

Kết quả của các thí nghiệm trước cho thấy mẫu cây 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 chồi tái sinh từ môi trường này được thu nhận và tiếp tục được nhân nhanh nhằm mục đích tạo ra số chồi 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 chồi 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 chồi của chanh dây tím (Hình 3.10).



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. **A.** Ảnh hưởng của AgNPs đến số chồi trên mẫu và chiều cao chồi. **B.** Chồi trong môi trường không bổ sung AgNPs và bổ sung 5,0 mg/L AgNPs (Thuốc: 1 cm). **C.** Ảnh hưởng của AgNPs đến tổng hàm lượng chlorophyll 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 cô 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 tổng hàm lượng chlorophyll ở lá (33,93 nmol/cm²) so với đối chứng (22,18 nmol/cm²) (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 [142, 146]. 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* [143]. 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 [154]. 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 tổng hàm lượng chlorophyll 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 cây 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*

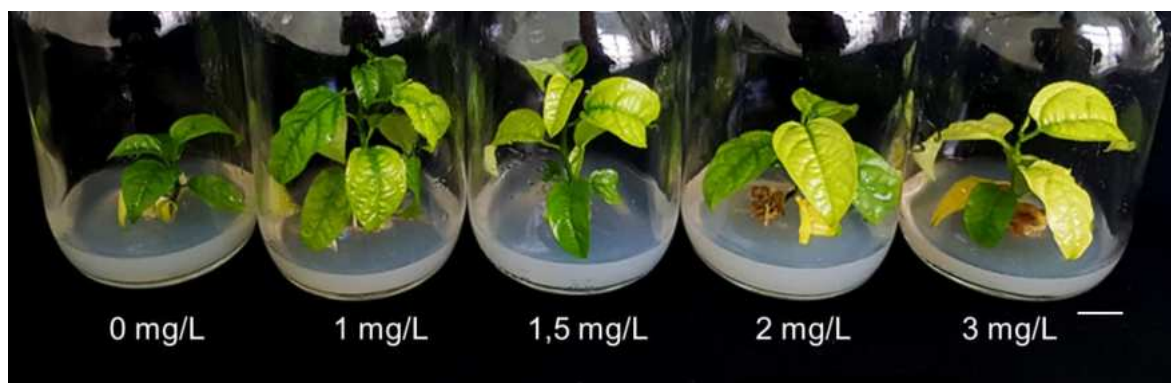
Trong môi trường bổ sung GA₃, sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím được tăng cường đáng kể tại nồng độ thích hợp (Bảng 3.3, Hình 3.11). Chiều cao của các chồi nuôi cấy trong môi trường bổ sung GA₃ ở nồng độ 1,0 mg/L và 1,5 mg/L (6,33 cm và 7,10 cm, tương ứng) cao hơn đáng kể so với đối chứng (2,07 cm). Ngoài ra, số lá trên chồi đạt tối ưu trong môi trường bổ sung 1,0 mg/L GA₃ (10,33 lá/chồi). Tổng hàm lượng chlorophyll ở lá giảm đáng kể trong môi trường bổ sung 2,0 và 3,0 mg/L GA₃ (24,38 và 24,04 nmol/cm²) so với đối chứng (27,12 nmol/cm²). 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	Chlorophyll tổng số (nmol/cm ²)
0	2,07 ^{c*}	6,67 ^b	27,12 ^a
1,0	6,33 ^a	10,33 ^a	26,85 ^a
1,5	7,10 ^a	8,33 ^{ab}	26,93 ^a
2,0	3,90 ^b	7,00 ^b	24,38 ^b
3,0	4,07 ^b	7,67 ^b	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 $p < 0,05$ (Tukey'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* [155]. 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 [156]. 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 GA₃ 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* [8]. 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 [155]. Sự gia tăng hàm lượng GA₃, đi kèm với sự hình thành mầm hoa trong cây *Bryophyllum daigremontianum* được ghi nhận khi được chuyển từ điều kiện ngày dài sang điều kiện ngày ngắn [155]. 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.

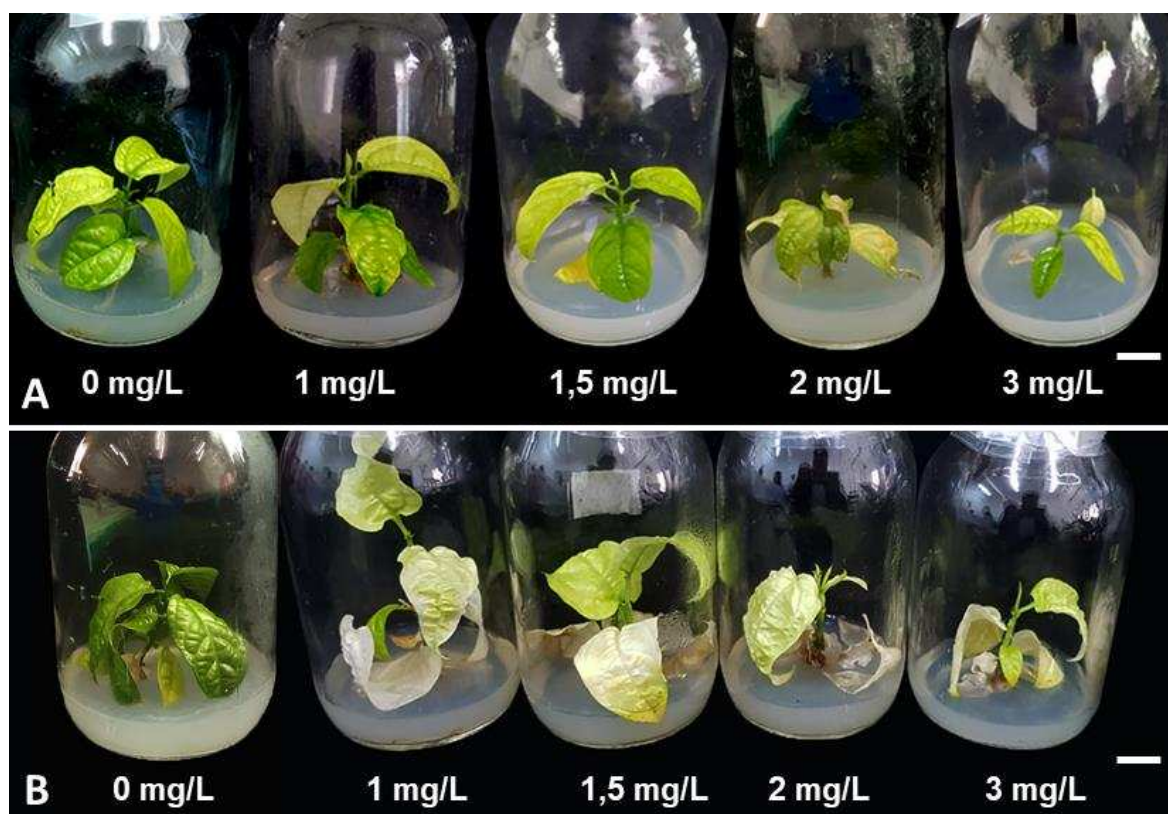
3.2.1.2. Ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

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 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 2,0 và 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). Tại nồng độ thí nghiệm cao nhất là 3,0 mg/L ABA, tổng hàm lượng chlorophyll được ghi nhận thấp nhất (23,21 nmol/cm²) và thấp hơn đáng kể so với đối chứng (27,12 nmol/cm²). 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 lục tổ 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	Chlorophyll tổng số (nmol/cm ²)
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 ^{abc}	25,29 ^{ab}
2,0	1,80 ^{ab}	4,00 ^{bc}	25,40 ^{ab}
3,0	1,73 ^b	3,33 ^c	23,21 ^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 $p < 0,05$ (Tukey'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 [40]. 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 [41].

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 [72]. 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 [157]. 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 tổng hàm lượng chlorophyll 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* [132]. 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 [158]. 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*

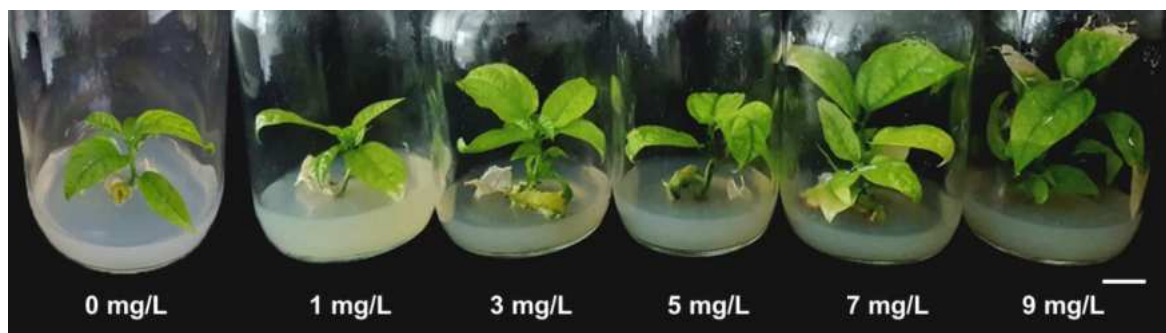
3.2.2.1. Ảnh hưởng của AgNO₃ đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

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 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 tổng hàm lượng chlorophyll 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 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	Chlorophyll tổng số (nmol/cm ²)
0	2,07 ^{c*}	6,67 ^c	27,12 ^b
1,0	3,53 ^c	6,33 ^c	26,91 ^b
3,0	5,90 ^b	8,33 ^c	29,40 ^a
5,0	5,63 ^b	7,67 ^c	30,01 ^a
7,0	7,73 ^a	11,67 ^b	29,57 ^a
9,0	7,07 ^{ab}	15,33 ^a	28,45 ^a

* 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 $p < 0,05$ (Tukey's test).



Hình 3.13. Chồi chanh dây sinh trưởng 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 [159]. AgNO₃ cũng được cho là có ảnh hưởng đến quá trình ra hoa *in vitro* ở một số loài thực vật. Chẳng hạn, 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 μ M [50]. Tuổi thọ hoa *in vitro* của *Dianthus chinensis* cũng được cải thiện trong môi trường bổ sung AgNO₃ [10]. 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. [160].

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, 145, 161]. 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 sinh tổng hợp PA (một yếu tố quan trọng trong quá trình ra hoa ở nhiều loài thực vật) do sự sẵn có của S-adenosyl methionine [152]. 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 [10, 153]. 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* \times *hybrida*, sự ra hoa *in vitro* được ghi nhận ở nồng độ thấp hơn đáng kể (2 mg/L) [162]. 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 tổng hàm lượng chlorophyll (30,12 nmol/cm²) so với đối chứng (6,67 lá/chồi và 27,12 nmol/cm²; tương ứng). Tuy nhiên, tổng hàm lượng chlorophyll 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).

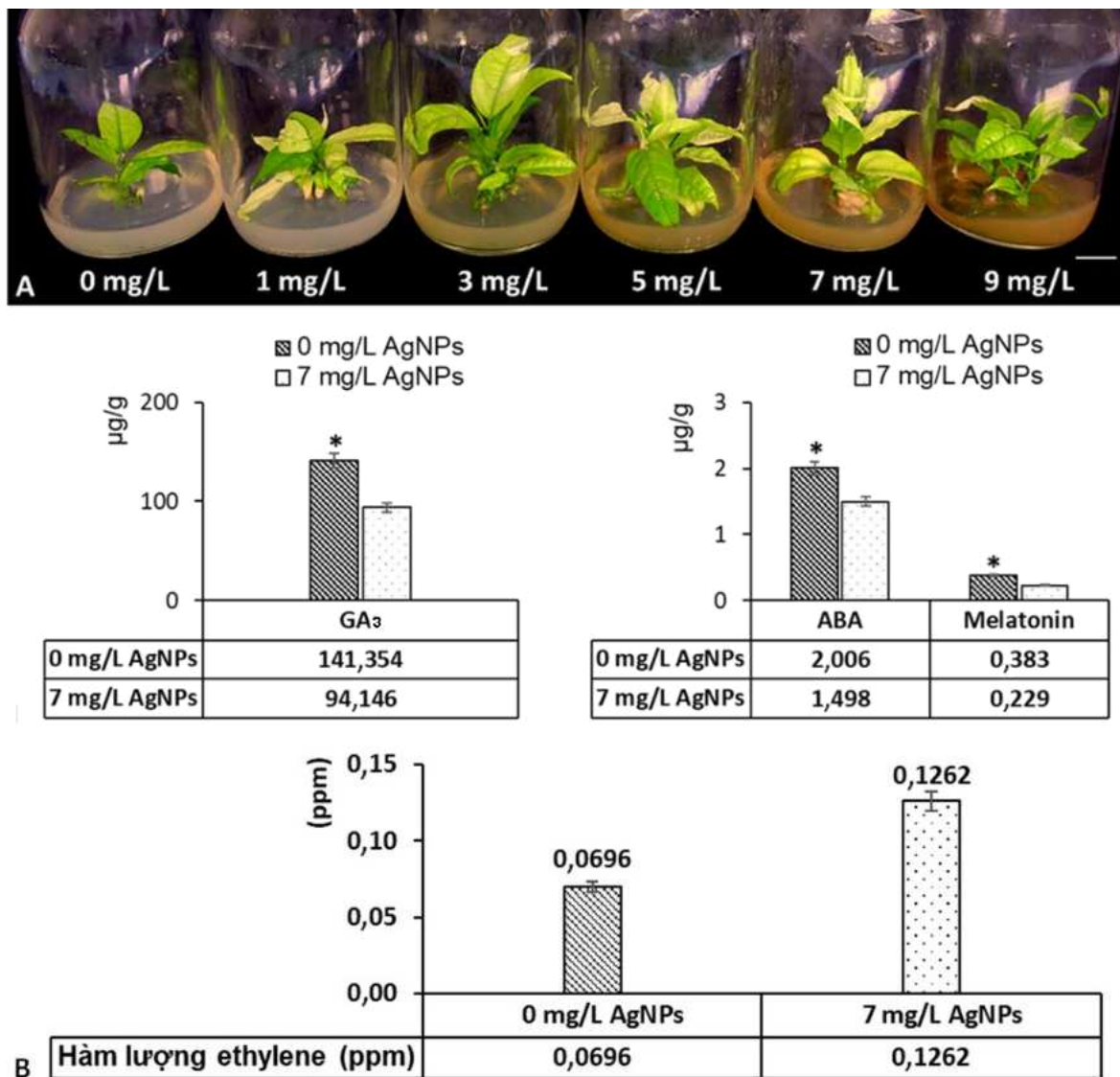
Bảng 3.6 Ảnh hưởng của AgNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro* của chồi sau 60 ngày nuôi cấy.

AgNPs (mg/L)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá /chồi	Chlorophyll tổng số (nmol/cm ²)	Tỉ lệ ra hoa (%)	Số nụ hoa /chồi
0	2,07 ^{e*}	6,67 ^e	27,12 ^c	0,00 ^e	0,00 ^c
1,0	3,50 ^d	10,67 ^d	28,40 ^b	0,00 ^e	0,00 ^c
3,0	7,23 ^{ab}	13,33 ^b	30,12 ^a	11,67 ^d	0,67 ^{bc}
5,0	6,27 ^c	10,67 ^d	25,68 ^d	23,33 ^c	1,00 ^b
7,0	7,50 ^a	12,00 ^c	24,73 ^e	51,67^a	2,33^a
9,0	6,77 ^{bc}	14,67 ^a	24,00 ^f	38,33 ^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 $p < 0,05$ (Tukey'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 11,67% đến 51,67% được ghi nhận 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 (51,67%) và số hoa (2,33 hoa/chồi) cao nhất. Tỷ 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 (38,33% 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 (Thước: 1 cm). **B.** Hàm lượng GA₃, ABA, melatonin tích lũy trong chồi và hàm lượng ETH tích lũy trong bình nuôi cấy ở NT 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 GA₃ (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 [158].

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 [163]. Hàm lượng melatonin cũng đã được báo cáo ảnh hưởng đến các giai đoạn phát triển khác nhau của hoa [163, 164]. 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* [165] và *Arabidopsis thaliana* [163].

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 đáng kể 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* [166]. 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

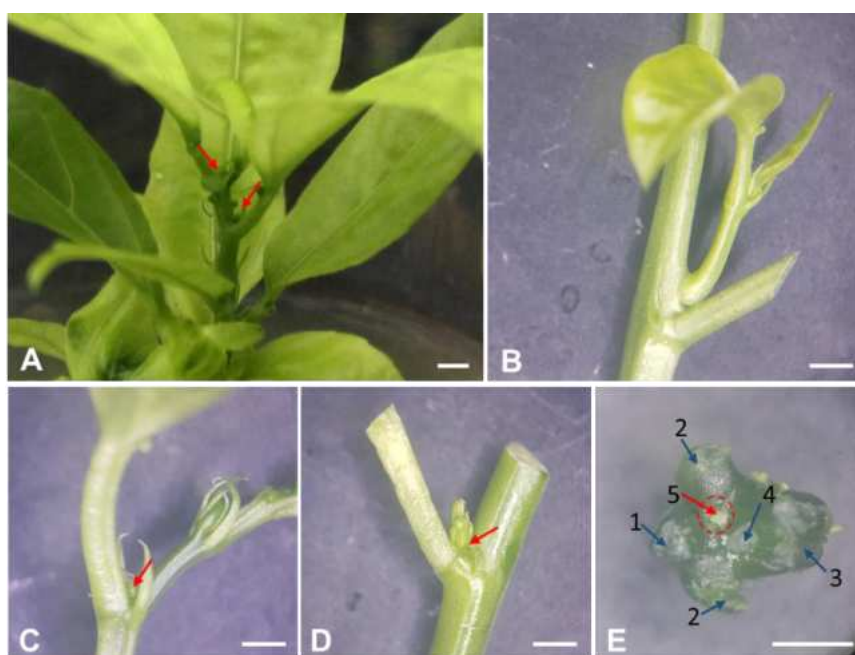
do tác động của AgNPs và lượng ETH này có ảnh hưởng đến quá trình cảm ứng ra hoa. Vì vậy, sự tích tụ ETH và tác động của chúng đối với sự ra hoa *in vitro* của cây chanh dây tím cần được khảo sát làm rõ trong những nghiên cứu tiếp theo.

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 [167]. 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 [159]. 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 [168]. 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* [60]. 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 một số tác động của AgNO₃, các tác động 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 [152]. 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 [169]. 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 [170]. 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

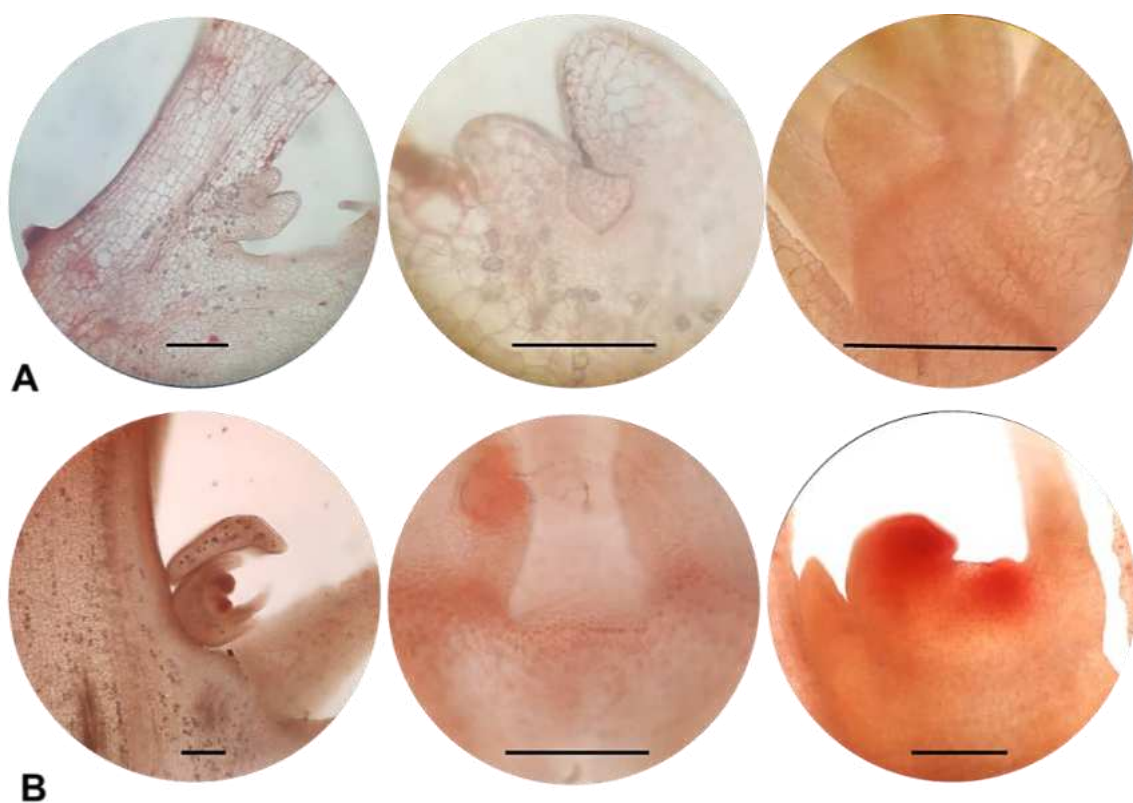
thúc đẩy sự ra hoa *in vitro* [60]. Ngoài ra, sự tương tác giữa ROS và tín hiệu hormone nội sinh tham gia vào quá trình phối hợp các phản ứng thích nghi của thực vật [171]. Những thay đổi về hàm lượng các hormone nội sinh như auxin, cytokinin, GAs và ABA đã được ghi nhận ở một số loài thực vật tiếp xúc với AgNPs [151, 172]. 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. 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* [59]. 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 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).

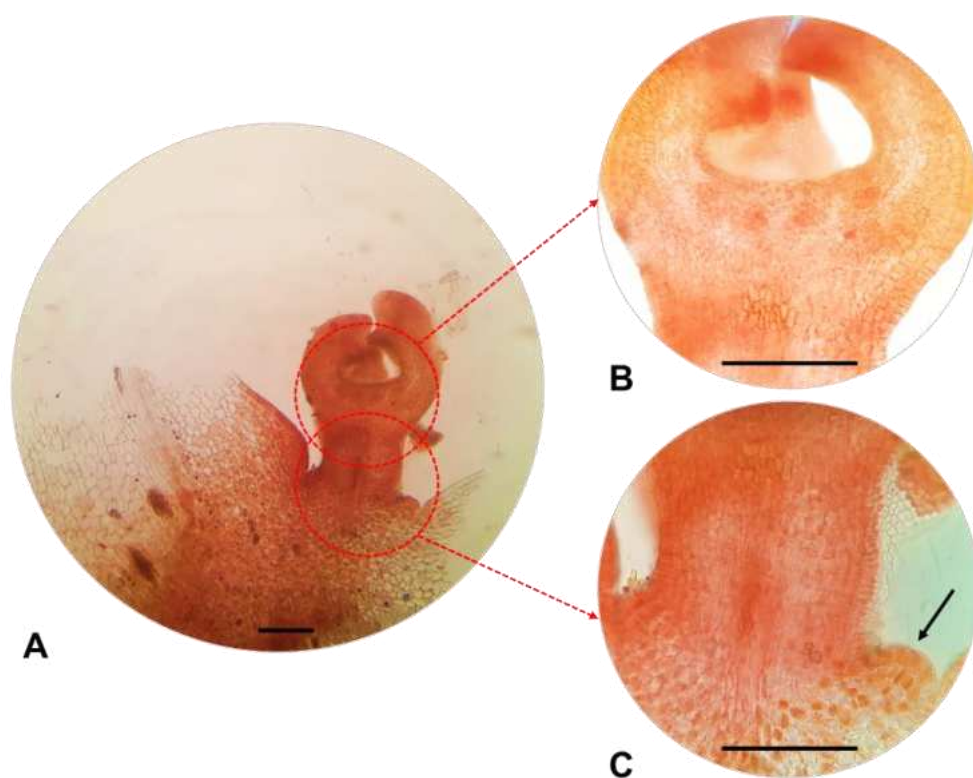
Một số ghi nhận ở nghiên cứu này cũng tiết lộ một số đặc điểm của quá trình hình thành chồi hoa *in vitro* dưới tác động của AgNPs. Kết quả quan sát cho thấy các chồi hoa được cảm ứng tại vị trí dưới nách lá ở các đốt gần với ngọn chồi. Ở chồi không cảm ứng ra hoa, các chồi sinh dưỡng thường được hình thành phát triển ở các đốt thân (Hình 3.15). Tại thời điểm sau 40 - 45 ngày nuôi cây 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 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 [173].

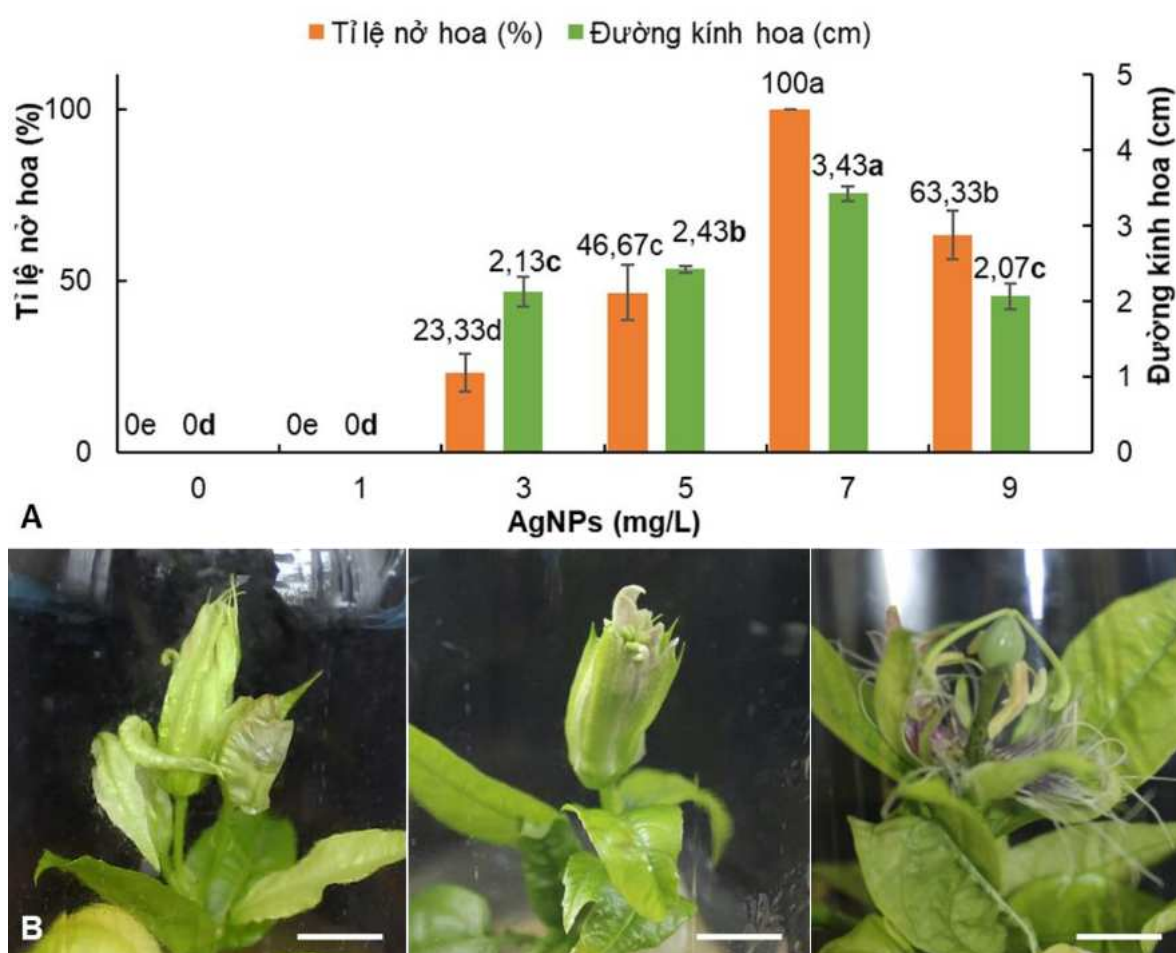


Hình 3.17. Giải phẫu chồi hoa từ chồi *in vitro* nuôi cấy trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs sau 45 ngày nuôi cấy. **A.** Chồi hoa. **B.** Lá đài đang hình thành ở sơ khởi hoa. **C.** Vùng mô hình thành tua cuốn (*vị trí mũi tên*). (Thước: 40 μ m).

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 [124]. 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

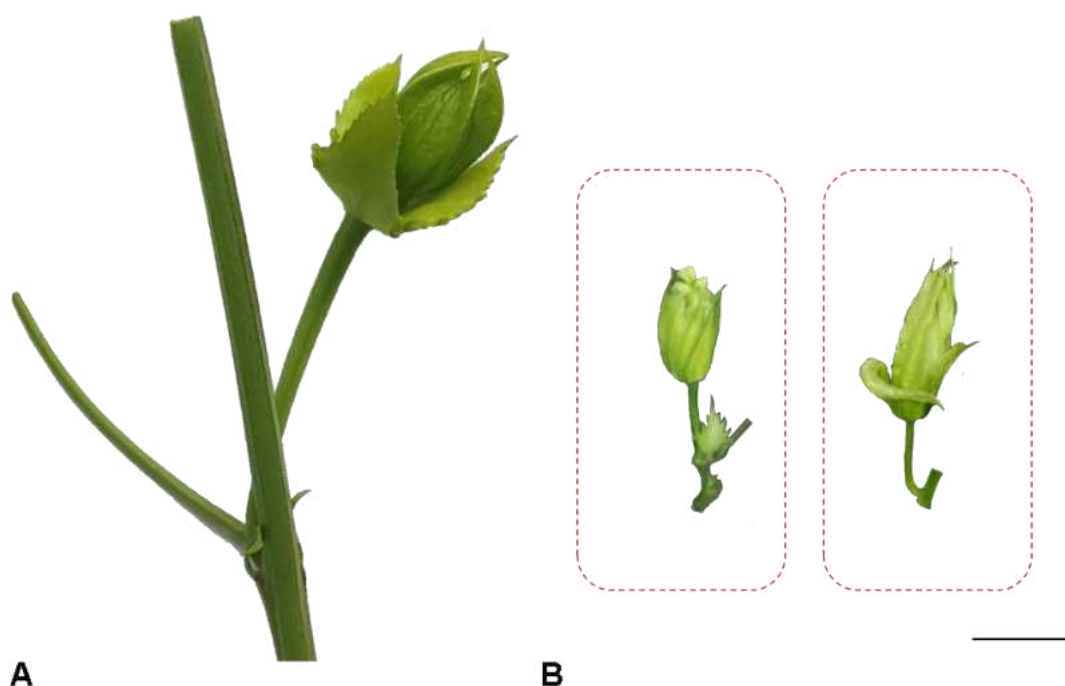
Sự nở hoa *in vitro* là một quá trình phức tạp và chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau. Trong nghiên cứu hiện tại, sự nở hoa của cây chanh dây tím đã được ghi nhận trong điều kiện *in vitro* với tỉ lệ khác nhau. Sau 70 ngày nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy tỉ lệ nở hoa (23,33 - 100%) được ghi 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 (63,33%). Ngoài ra, những hoa *in vitro* có đường kính trung bình 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

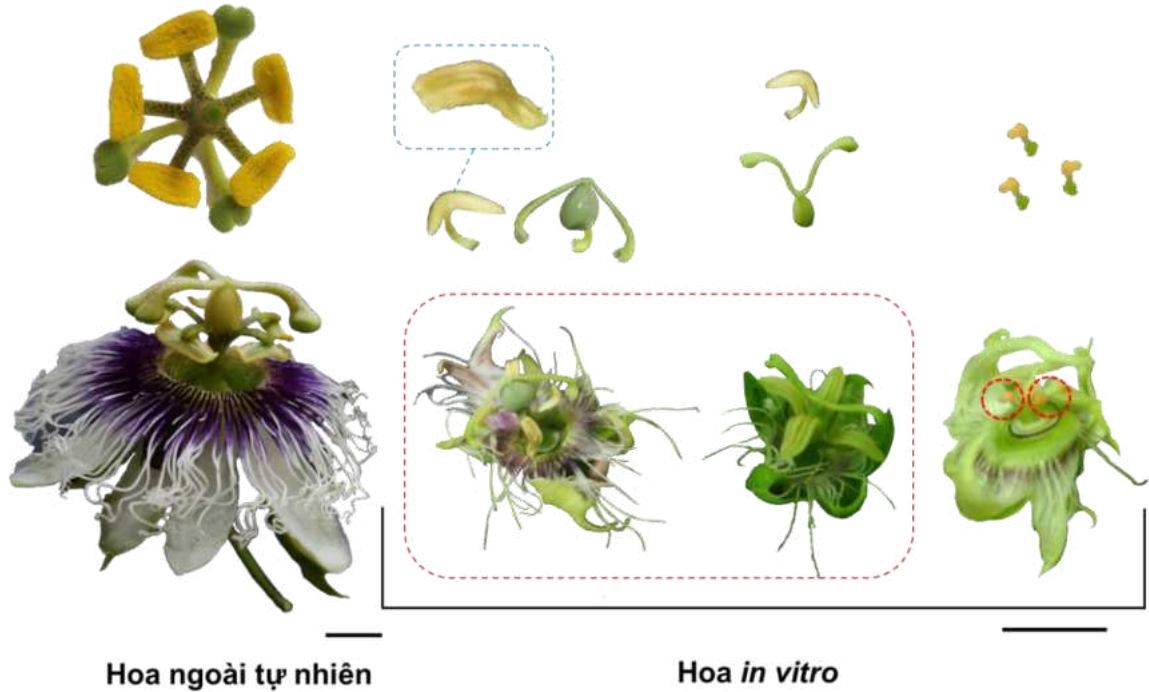
Mặt khác, khi so sánh với nụ hoa ngoài tự nhiên từ cây 2 năm tuổi cho thấy rằng, nụ hoa *in vitro* có kích thước nhỏ, các lá đài bao quanh mỏng hơn. Ngoài ra, đa số hoa *in vitro* thường khuyết thiếu các lá bắc, vị trí lá bắc sai lệch hoặc các lá bắc rụng trong quá trình phát triển của nụ hoa (Hình 3.19). 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* đã được ghi nhận [174]. 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 nở 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 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: 1 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 [162].

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 [42]. 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* [29, 30]. Mặt khác, những biến đổi DNA/RNA/protein ở thực vật cũng được báo cáo khi tiếp xúc với AgNPs [175]. Mặc dù các báo cáo hiện tại về tác động của AgNPs đối với sự biểu hiện của các gen xác định cơ quan hoa rất hạn chế, nhưng tác động của AgNPs đối với sự biểu hiện gen đã được báo cáo gợi lên khả năng có thể có sự biến đổi đối với nhóm gen 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 [175]. 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 (56,67%), số quả (1,67 quả/chồi) và đường kính quả (1,13 cm) cao nhất. Tuy nhiên, khi nồng độ AgNPs tăng lên 9,0 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	20,00 ^c	1,00 ^b	0,07 ^c
5,0	36,33 ^b	1,00 ^b	0,77 ^{bc}
7,0	56,67 ^a	1,67 ^a	1,13 ^a
9,0	33,33 ^b	1,00 ^b	0,83 ^{bc}

* 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 $p < 0,05$ (Tukey'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* [64], *Cleome viscosa* [6], *Scrophularia takesimensis* [68], *Withania somnifera* [7], *Capsicum* spp. [2], *Solanum* spp. [9]. 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.

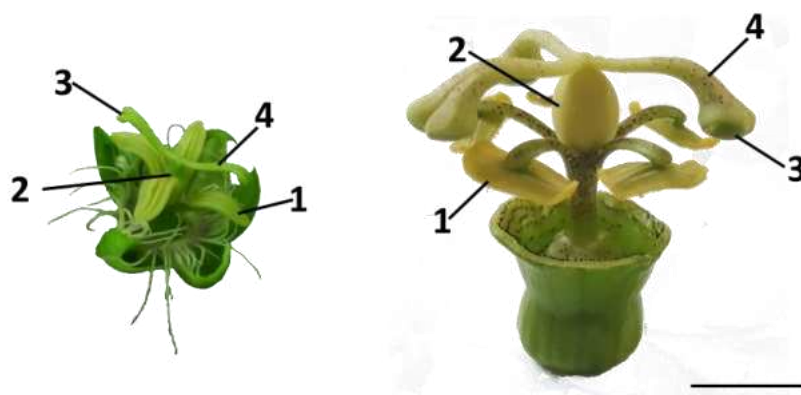


Hình 3.21. Sự nở hoa và tạo quả *in vitro* trong môi trường bổ sung 7,0 mg/L AgNPs. **A.** Hoa *in vitro* có đầy đủ nhị và nhụy (1- bao phấn, 2- bầu nhụy, 3- vòi nhụy, 4- đầu nhụy). **B.** Hoa tàn được ghi nhận sau khi nở 10 ngày. **C.** Quả non hình thành được ghi nhận sau 20 ngày hoa nở. (Thước: 1 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 [61]. Tuy nhiên, tuổi thọ của hoa phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là hàm lượng ETH [145]. 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 [10]. 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* [9]. 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, 142, 144, 176]. 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* [177], 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* [178]. Cơ chế tự bắt thụ ở chanh dây tím đòi hỏi sự giao phấn từ các hoa khác, vì vậy, sự có mặt của tác nhân thụ phấn ngoài tự nhiên làm 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* [127]. 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 [130]. 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 [128-130]. Cơ chế tự bất hợp thường được điều khiển bởi hệ thống di truyền liên quan đến nhiều alen ở locus S. Đồng thời, mức độ tự bất hợp khác nhau giữa các giống và chúng có thể thay đổi bởi các yếu tố như nhiệt độ, tuổi cây.

Mặt khác, một số nghiên cứu đã báo cáo về sự ổn định di truyền của các cây tái sinh *in vitro* trong môi trường bổ sung AgNPs. Chẳng hạn, tính đồng nhất di truyền của cây con *Dendrocalamus strictus* trong môi trường chứa AgNPs với cây cho mẫu ban đầu đã được ghi nhận, đồng thời, sự ra hoa *in vitro* các cây con này cũng được tăng cường đáng kể ở nồng độ 6,0 mg/L AgNPs [60]. Ngược lại, 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* [179]. 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 cũng được chứng minh là kích hoạt các gen liên quan đến phản ứng stress kim loại và oxy hóa, tạo ra sự biểu hiện của các gen liên quan đến con đường truyền tín hiệu 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 các gen liên quan đến con đường truyền tín hiệu hormone [175]. 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 hoàn chỉnh diễn ra 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.

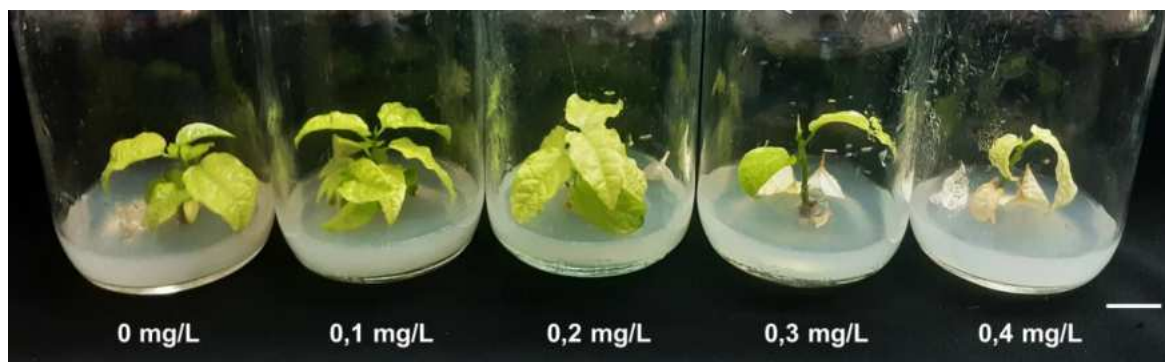
3.2.2.4. Ảnh hưởng của CoNPs đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

Kết quả ghi nhận ở Bảng 3.8 và Hình 3.23 cho thấy rằng, việc bổ sung CoNPs trong môi trường MS cơ bản tại các nồng độ thí nghiệm ảnh hưởng đáng kể đến sự sinh trưởng của chồi chanh dây tím sau 60 ngày nuôi cấy. Trong đó, số lá trung bình 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 giảm đáng kể trong môi trường bổ sung 0,3 mg/L và 0,4 mg/L CoNPs, đồng thời sự rụng lá của chồi cũng được ghi nhận (Hình 3.23). Tổng hàm lượng chlorophyll cũng sụt giảm đáng kể khi tăng nồng độ CoNPs lên 0,3 mg/L và 0,4 mg/L (22,85 và 19,82 nmol/cm²; tương ứng) so với đối chứng (27,12 nmol/cm²). Mặt khác, chiều cao chồi thay đổi không đáng kể trong môi trường bổ sung CoNPs tại các nồng độ thí nghiệm.

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

CoNPs (mg/L)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chlorophyll tổng số (nmol/cm ²)
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 $p < 0,05$ (Tukey'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 được sử dụng phổ biến trong môi trường nuôi cấy thực vật *in vitro*. Coban là thành phần quan trọng cần thiết cho một số hoạt động của enzyme và coenzyme ở thực vật. Một số tác động của coban được ghi nhận đối với 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 [180]. 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 kết hợp với 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. Ngoài ra, các hạt nano ở liều lượng cao cũng có thể làm giảm sự sinh trưởng của chồi do sự sản xuất ROS một cách quá mức [181, 182].

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 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. Tổng hàm lượng chlorophyll 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 nmol/cm^2 ; tương ứng) so với đối chứng (25,53 nmol/cm^2). Tuy nhiên, tổng hàm lượng chlorophyll giảm đáng kể trong môi trường bổ sung 0,5 mg/L CoNPs (24,82 nmol/cm^2). 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; và 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 3.24).

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.

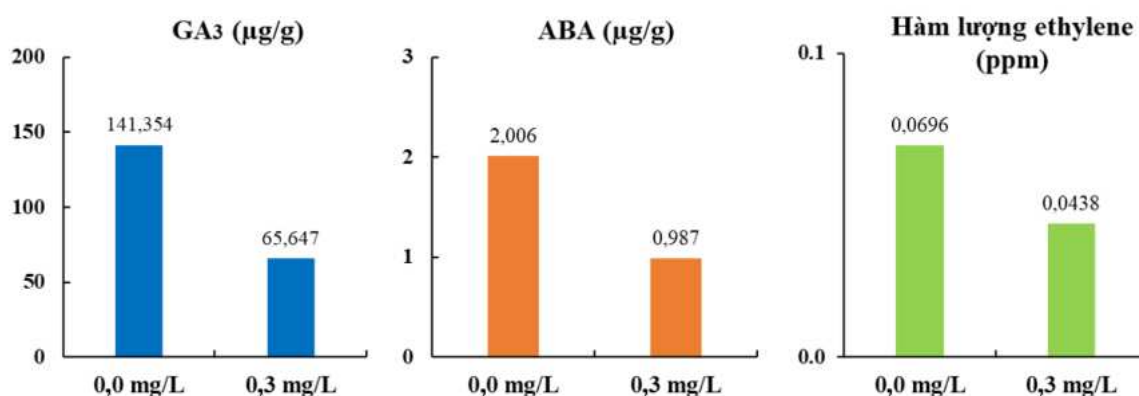
CoNPs (mg/L)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chlorophyll tổng số (nmol/cm ²)
0	1,97 ^{c*}	4,67 ^c	25,53 ^c
0,1	3,17 ^c	7,33 ^b	27,66 ^b
0,2	6,53 ^b	7,00 ^b	28,11 ^{ab}
0,3	8,87 ^a	11,67 ^a	30,37 ^a
0,4	7,27 ^b	8,67 ^b	31,33 ^a
0,5	2,03 ^c	8,00 ^b	24,82 ^c

* 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 $p < 0,05$ (Tukey's test).



Hình 3.24. Ảnh hưởng của CoNPs trong môi trường MS 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 sung CoNPs (Thước: 50 μm).

Kết quả phân tích 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 GA₃ nội sinh (65,647 µg/g) thấp hơn so với đối chứng (141,354 µg/g), và hàm lượng ABA nội sinh (0,987 µg/g) thấp hơn so với đối chứng (2,006 µg/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 GA₃, 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.

Nhìn chung, CoNPs ở nồng độ thích hợp cho thấy hiệu quả đáng kể trong việc tăng cường sự sinh trưởng chồi và cũng kích thích sự hình thành rễ *in vitro* ở chanh dây tím. Tác dụng tích cực của coban ở dạng hạt nano cũng được quan sát thấy ở một số loài thực vật. Chẳng hạn, chồi cây *Mentha longifolia* được xử lý với 0,8 mg/L CoNPs cho thấy chiều cao chồi, chỉ số tăng trưởng, số lượng chồi và lông cao hơn so với đối chứng sau 28 ngày nuôi cấy [183]. Jahani và cộng sự (2019) báo cáo rằng chồi *Brassica napus* được xử lý với Co₃O₄NPs cho thấy sự cải thiện đáng kể đối với chiều dài chồi, trọng lượng tươi và khô của chồi sau 5 tuần nuôi cấy [182].

Một số nghiên cứu đã báo cáo những thay đổi về hormone nội sinh của các mẫu vật tiếp xúc với các hạt nano kim loại. Chẳng hạn, sự gia tăng hàm lượng cytokinin được quan sát thấy ở *Capsicum annuum* khi phản ứng với AgNPs, và sự giảm IAA và ABA ở *Gossypium herbaceum* khi phản ứng với các hạt nano đồng (CuNPs) [184]. Trong nghiên cứu hiện tại, việc bổ sung CoNPs trong môi trường nuôi cấy làm tăng hàm lượng GAs và giảm hàm lượng ABA nội sinh của chồi chanh dây tím. Những thay đổi hormone nội sinh này có thể là một trong những nguyên nhân

quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển của chồi. Ngoài ra, việc kích hoạt một số enzyme liên quan đến tăng trưởng được quan sát thấy ở các mẫu vật tiếp xúc với CoNPs cũng có thể là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự tăng trưởng này [144, 185]. Tuy nhiên, sự tương tác này cần được nghiên cứu sâu hơn trong nghiên cứu trong tương lai.

Ngoài các tác động đến sự sinh trưởng ở thực vật, coban cũng được sử dụng để kích thích sự ra hoa *in vitro*. Chẳng hạn, việc bổ sung coban ngoại sinh trong môi trường MS đã tăng cường đáng kể sự ra hoa *in vitro* trên cây *Capsicum frutescens* sau 25 ngày nuôi cấy [50]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu hiện tại, các chồi trong môi trường MS cơ bản (hoặc môi trường 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 được báo cáo có tác động đáng kể đến hoạt động của ETH ở thực vật. Trong khi bạc dễ gây rối loạn hoạt tính của protein thụ thể của ETH thì coban ức chế quá trình tổng hợp ETH [47]. ETH được báo cáo có vai trò kích thích hoặc gây ức chế sự ra hoa tùy thuộc vào loài thực vật [2]. 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 ý rằng hàm lượng GAs tăng trong chồi có thể có tác động 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 GA_3 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*

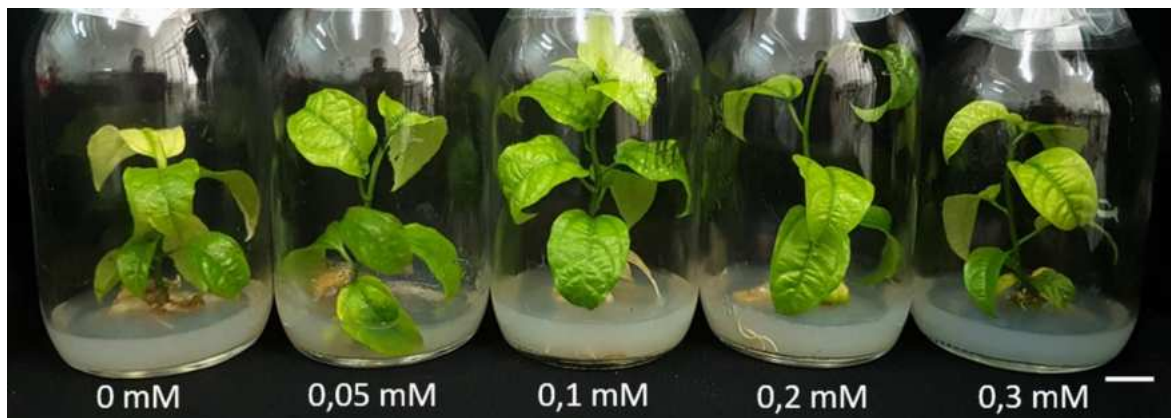
3.2.3.1. Ảnh hưởng của Spd đơn lẻ đến sự sinh trưởng và ra hoa *in vitro*

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 0,1-0,2 mM cho chiều cao chồi (8,50 - 8,87 cm) cao hơn đáng kể so với NT đối chứng (5,13 cm). Số lá trên chồi tối ưu (10,33 lá/chồi) được ghi nhận trong môi trường bổ sung 0,1 mM Spd. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy tổng hàm lượng chlorophyll tăng đáng kể trong môi trường bổ sung 0,1 mM và 0,2 mM Spd (33,75 và 32,94 nmol/cm²; 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 tổng hàm lượng chlorophyll 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	Chlorophyll tổng số (nmol/cm ²)
0,0	5,13 ^{b*}	8,67 ^{ab}	26,40 ^c
0,05	5,77 ^b	8,33 ^{ab}	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 ^b	8,33 ^{ab}	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 $p < 0,05$ (Tukey'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 ở thực vật bậc cao bao gồm Put, Spm, Spd. Chúng đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật như quá trình phân chia tế bào, phát sinh hình thái, sinh trưởng và sự lão hóa [45]. Trong đó, Spd là một PA có vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh lý ở thực vật. Nó được tổng hợp từ arginine và đóng vai trò trong việc điều chỉnh biểu hiện gen, tăng trưởng tế bào và chống oxy hóa. Tuy nhiên, liều lượng và thời điểm cung cấp Spd cần được tối ưu hóa để đạt được hiệu quả tốt nhất [44]. Trong nghiên cứu này, các kết quả ban đầu cho thấy việc bổ sung Spd tại nồng độ thích hợp tác động tích cực trong việc tăng cường chiều cao, số lá và tổng hàm lượng chlorophyll ở lá đối với chồi chanh dây tím sau 90 ngày nuôi cấy.

Spd 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 [186]. Ngược lại, việc bổ sung Spd thông qua sự hấp thu của rễ trong giai đoạn ra hoa ở cây *Arabidopsis thaliana* dẫn đến hiện tượng ra hoa chậm [187]. 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 phát 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 [188]. 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 [44]. Trong khi đó, sự ra hoa sớm ở cây *Polianthes tuberosa* được cho là có liên quan đến sự gia tăng Spd nội sinh [189]. 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 khác nhau của Spd đối với sự ra hoa 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.

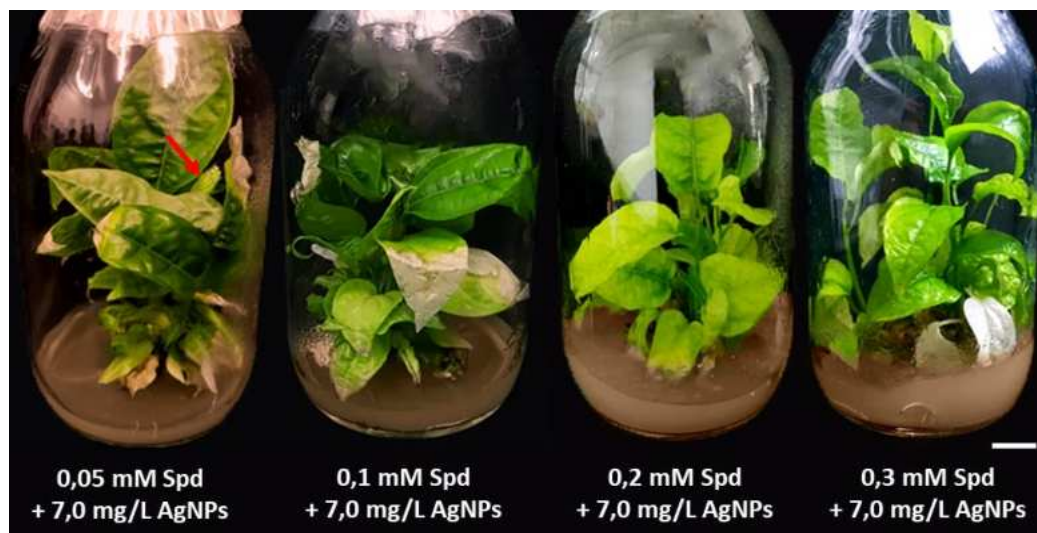
3.2.3.2. Ảnh hưởng của Spd kết hợp với AgNPs đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Trong các thí nghiệm trước, sự ra hoa *in vitro* ở chanh dây tím được ghi nhận với tỉ lệ cao nhất 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 lá/chồi, 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 $p < 0,05$ (Tukey's test). (-) Không ghi nhận.



Hình 3.27. Sự sinh trưởng và ra hoa của chòi trong môi trường bổ sung các nồng độ Spd khác nhau kết hợp với 7,0 mg/L AgNPs 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 của ngọn chòi (Thước: 1 mm). **C.** Đặc điểm của 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 cây (Hình 3.28). Đồng thời, trong điều kiện *in vitro*, kết quả quan sát cho thấy rằng tại vị trí đốt thân chứa chồi 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 3.29).



Hình 3.29. 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.

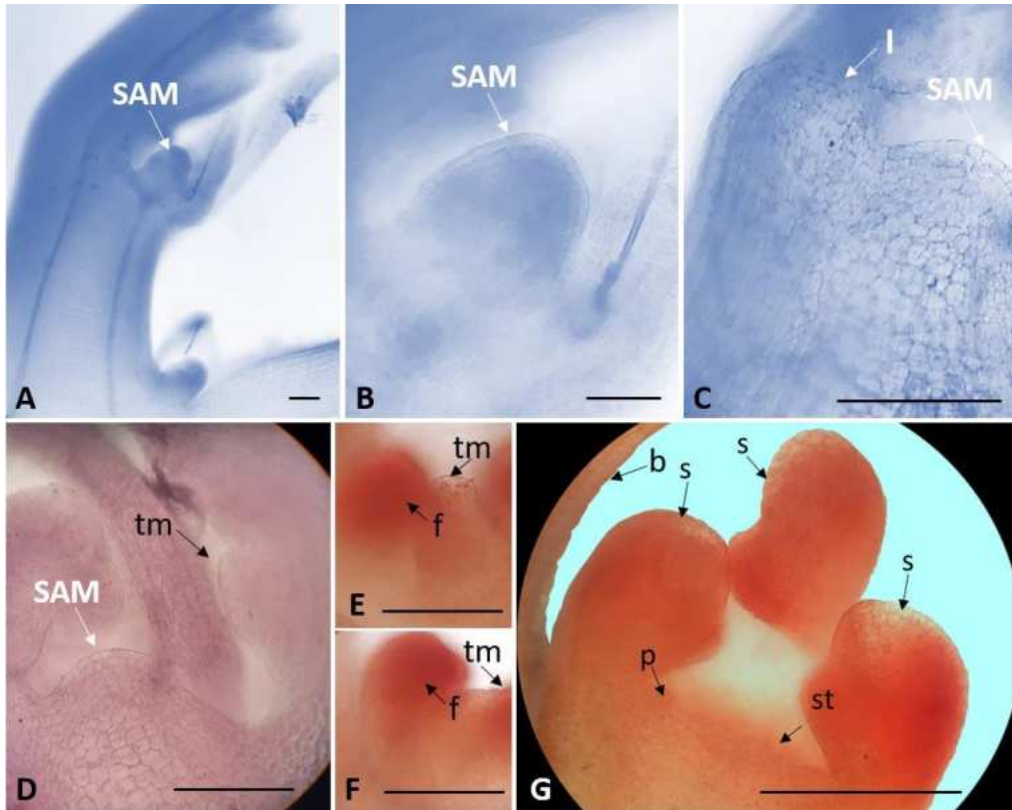
Ngoài điều kiện tự nhiên, các chồi hoa chanh dây tím hình thành dưới các nách lá tại các vị trí đốt. Mỗi đốt bao gồm một bông hoa duy nhất, bên cạnh một tua cuốn; đây dường như là cấu tạo phổ biến được thiết lập ở loài này [124]. Các nghiên cứu về sự phát triển, nguồn gốc và sự điều hòa phân tử của các tua cuốn ở thực vật còn rất hạn chế. Các nghiên cứu trên cơ sở phân tử cơ bản của sự phát triển tua cuốn 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 sơ khởi hoa [190]. Đối với cây chanh dây, việc chuyển sang giai đoạn trưởng thành quan sát ở chồi nách bao gồm sự hình thành mô phân sinh sinh dưỡng và sự hình thành của một tua cuốn. Mô phân sinh hoa 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 chồi nách. Điều này cho thấy các tua cuốn là một phần của chồi hoa *Passiflora* [191]. 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.

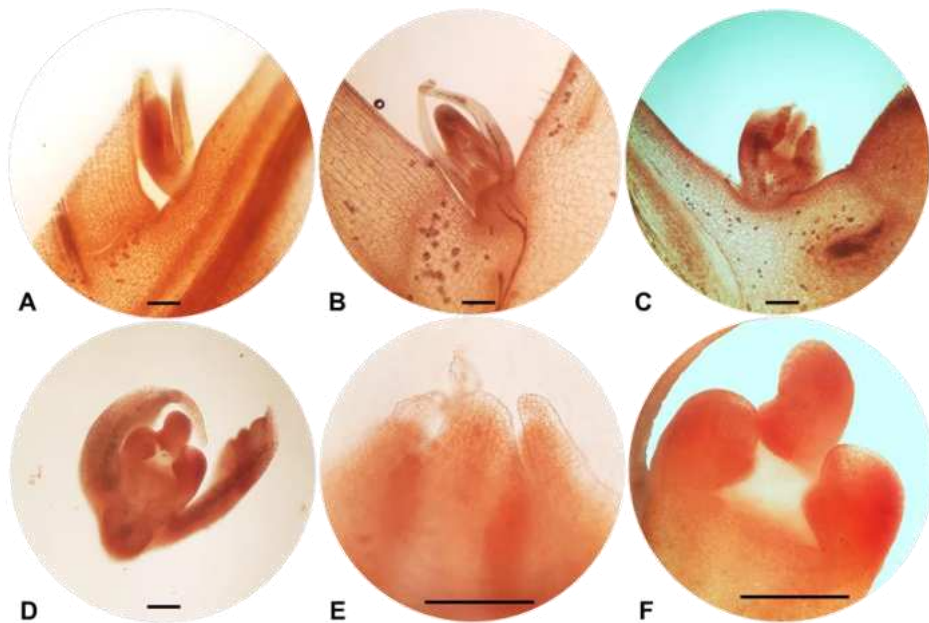
Trong thí nghiệm hiện tại, sự xuất hiện của các tua cuốn của cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro* cho thấy sự sinh trưởng và phát triển gắn với cấu trúc ngoài điều kiện tự nhiên. Sự xuất hiện tua cuốn này được ghi nhận trong môi trường bổ sung kết hợp AgNPs và Spd, trong khi hiện tượng này không 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.

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

Mặt khác, sự chuyển đổi của SAM trong quá trình cảm ứng ra hoa cũng được ghi nhận thông qua phân tích giải phẫu. Trong giai đoạn sinh trưởng, 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 (Hình 3.30G và 3.31). Các sơ khởi hoa này tiếp tục phát triển để hình thành các nụ hoa hoàn chỉnh.



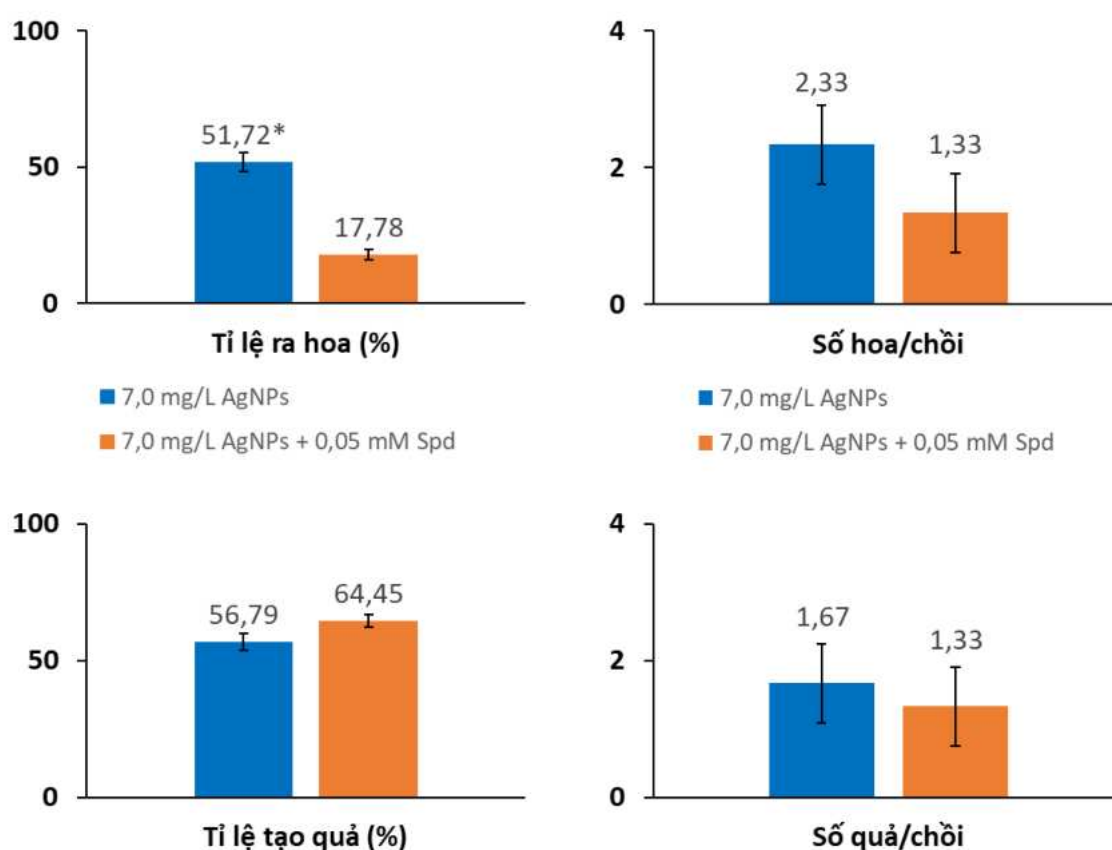
Hình 3.30. Sự chuyển đổi hình thành sơ khởi hoa *in vitro*. **A, B.** Mô phân sinh đỉnh chồi (SAM). **C.** Sự phân chia tạo mô lá ở SAM. **D.** Sự hình thành mô phân sinh tua cuốn ở vùng đáy sườn của SAM. **E, F.** Sự hình thành sơ khởi hoa ở cạnh đáy sườn mô tua cuốn. **G.** Sự hình thành các mô cơ 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).



Hình 3.31. 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).

Sự tạo quả *in vitro* trong môi trường bổ sung Spd và AgNPs

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 (Hình 3.32). Mặt khác, kết quả so sánh cho thấy việc bổ sung Spd kết hợp với AgNPs cho thấy tỉ lệ ra hoa thấp hơn đáng kể so với bổ sung riêng lẻ AgNPs. Bên cạnh đó, quan sát cũng cho thấy sự sinh trưởng của 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).



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.



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. **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).

Các vai trò của PA trong cảm ứng ra hoa, sự hình thành sơ khởi hoa và phát triển 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. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng việc cung cấp Spd ngoại sinh có thể thúc đẩy quá trình ra hoa, cải thiện chất lượng và số lượng 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 [44]. 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. Ngược lại, việc bổ sung Spd trong giai đoạn ra hoa ở cây *Arabidopsis thaliana* dẫn đến hiện tượng ra hoa chậm [187].

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 [192]. S-adenosyl methionine decarboxylase (SAMdc) là một loại enzyme quan trọng trong con đường sinh tổng hợp PA. Sự ức chế SAMdc dẫn đến giảm khả năng ra hoa và phát triển của hoa ở *Spirodela punctata*, điều này đã bị đảo ngược khi bổ sung Spd [193]. Tương tự, 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 [194]. Sự suy giảm PA ở cây thuốc lá cũng biểu hiện các kiểu hình hoa bất thường [192], trong khi tăng cường mức độ của PA trong cà chua dẫn đến sự phát triển nhị hoa bất thường [195]. 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 [196].

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, các hormone cần thiết cho sự phát triển của các cơ quan hoa. Nó cũng điều chỉnh sự cân bằng hormone, do đó ảnh hưởng đến thời gian và con đường 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 vai trò quan trọng trong 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 phần hoa và hạt [44, 152, 195, 197].

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 bước đầu ghi nhận sự trì hoãn ra hoa trong môi trường bổ sung 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 yếu tố 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 [152]. 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. Ngược lại, PA cũng được xem là nguồn gốc của ROS do tạo ra các chất oxy hóa mạnh như 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 [45]. 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 hoá 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

Đối với nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây *in vitro*, quá trình phát sinh chồi thích hợp hơn quá trình phát sinh SE dựa trên hiệu quả tái sinh từ mẫu cây. Khả năng tái sinh chồi được tăng cường đáng kể từ các mẫu cây oTCL tại lóng thân thứ 3. AgNPs (3 mg/L) tác động tích cực đến hiệu quả tái sinh và nhân nhanh chồi.

Bổ sung các PGR đơn lẻ như ABA hoặc GA₃ tại các nồng độ thí nghiệm ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chồi nhưng không kích thích sự ra hoa của cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*.

AgNPs kích thích sự ra hoa từ các chồi *in vitro* của cây chanh dây tím, trong khi AgNO₃ không gây cảm ứng ra hoa trong giới hạn của nghiên cứu. Một số hoa *in vitro* mang các đặc điểm cấu trúc khác biệt so với cấu trúc hoa ngoài tự nhiên. AgNPs (7 mg/L) làm tăng tỉ lệ tạo quả non và đường kính quả *in vitro*. CoNPs tác động tích cực đến sự sinh trưởng và sự hình thành rễ của chồi nhưng không kích thích sự ra hoa *in vitro*. AgNPs và CoNPs làm thay đổi hàm lượng GA₃, ABA nội sinh của chồi và hàm lượng ethylene tích lũy trong bình nuôi cấy.

Việc bổ sung Spd đơn lẻ không kích thích sự ra hoa *in vitro*, và sự kết hợp giữa Spd và AgNPs làm giảm tỷ lệ ra hoa và làm chậm quá trình ra hoa so với việc bổ sung AgNPs đơn lẻ. Tuy nhiên, việc bổ sung kết hợp với Spd ghi nhận sự hình thành tua cuốn bên cạnh chồi hoa tương tự như sự ra hoa ngoài tự nhiên.

KIẾN NGHỊ

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

Tiếp tục đi sâu nghiên cứu về sự biến đổi động học của các hormone nội sinh và biểu hiện của các gen liên quan đến giai đoạn cảm ứng ra hoa và sự phát triển của hoa *in vitro*.

Tiếp tục nghiên cứu các giai đoạn tiếp theo của quá trình tạo quả và tạo hạt trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Sreelekshmi R., Siril E.A., 2021, Investigation on *in vitro* bouquets and flower longevity of micropropagated *Dianthus chinensis* L, *Sci Hortic*, 275, pp. 109708.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Scorza R., Janick J., 1980, *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L, *J Am Soc Hortic Sci*, 105(6), pp. 892-7.
15. 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.
16. Izawa T., 2007, Daylength measurements by rice plants in photoperiodic short-day flowering. *Int Rev Cytol*, 256, pp. 191-222.
17. Simpson G.G., Dean C., 2002, *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time?, *Science*, 296(5566), pp. 285-9.
18. 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.
19. Vaz A., Kerbauy G., 2008, *In vitro* precocious orchid flowering: a strategy for basic research and commercial approaches. In: da Silva J.A.T., editor, *Floriculture, ornamental and plant biotechnology - Advances and topical issues*, Global Science Books, pp. 421-6.
20. 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.
21. 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.
22. Izawa T., 2021, What is going on with the hormonal control of flowering in plants?, *The Plant J*, 105(2), pp. 431-45.

23. Cerdán P.D., Chory J., 2003, Regulation of flowering time by light quality, *Nature*, 423(6942), pp. 881-5.
24. 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.
25. 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.
26. Yamaguchi S., 2008, Gibberellin metabolism and its regulation, *Annu Rev Plant Biol*, 59, pp. 225-51.
27. 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.
28. 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.
29. Causier B., Schwarz-Sommer Z., Davies B., 2010, Floral organ identity: 20 years of ABCs, *Semin Cell Dev Biol*, 21(1), pp. 73-9.
30. Theißen G., Saedler H., 2001, Floral quartets, *Nature*, 409(6819), pp. 469-71.
31. Wang J.W., 2014, Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway, *J Exp Bot*, 65(17), pp. 4723-30.
32. Bùi Trang Việt, 2000, *Sinh lý thực vật đại cương - Phát triển*, NXB Đại học Quốc gia TP.HCM, tr. 1-333.
33. 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.
34. 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.
35. 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.

36. 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.
37. Nishijima T., 2012, Large flower size: molecular basis and role of cytokinin, *J Jpn Soc Hortic Sci*, 81(2), pp. 129-39.
38. 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.
39. Dương Tấn Nhựt, Lê Văn Thức, Trần Trọng Tuấn, Trương Thị Diệu Hiền, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, 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), tr. 689-702.
40. 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.
41. 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. 9700.
42. 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.
43. Martínez C., García A., Jamilena M., 2022, Role of ethylene in flower and fruit development. In: Singh S., Husain T., Singh V.P., Tripathi D.K., Prasad S.M., Dubey N.K., editors, *Ethylene in Plant Biology*, John Wiley & Sons. pp. 178-219.
44. 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.
45. 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.
46. Trần Trọng Tuấn, Trần Thị Mỹ Trâm, Phạm Thị Ngọc Thúy, Nguyễn Hữu Hồ, Dương Tấn Nhựt, 2015, Ảnh hưởng của amino acid và polyamine lên quá trình ra

hoa *in vitro* của cây hoa Mõm chó (*Torenia fournieri* L.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 3, tr. 929-37.

47. Chang C., 2016, Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance?, *BMC Biology*, 14(1), pp. 7.

48. 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.

49. Schaller G.E., Binder B.M., 2017, Inhibitors of ethylene biosynthesis and signaling. In: Binder B.M., Schaller G.E., editors, *Ethylene Signaling: Methods and Protocols*, Springer New York, pp. 223-35.

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. 1534.

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 K.A., 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., Vinh B.V.T., 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. Salachna P., Byczyńska A., Zawadzińska A., Piechocki R., Mizielńska M., 2019, Stimulatory effect of silver nanoparticles on the growth and flowering of potted oriental lilies, *Agronomy*, 9(10), pp. 610.

60. 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.

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

62. 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.

63. 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.

64. 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.

65. 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.

66. 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.

67. 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.

68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. Schotsmans W.C., Fischer G., 2011, Passion fruit (*Passiflora edulis* Sim.). In: Yahia E.M., editor, *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, Woodhead Publishing. pp. 125-43e.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Isutsa D.K., 2004, Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties, *Sci Hortic*, 99(3), pp. 395-400.

79. 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.
80. 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 passion fruit species, *P. cincinnata* Masters, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 107(3), pp. 407-16.
81. 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 passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 107(3), pp. 521-30.
82. Rocha D.I., Vieira L.M., Tanaka F.A.O., da Silva L.C., 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.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. 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.

87. 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.
88. 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.
89. 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 passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), *Sci Hortic*, 238, pp. 408-15.
90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. 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 D.T., Tung H.T., Yeung E.C.T.,

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

96. 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.

97. 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.

98. 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.

99. 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.

100. 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.

101. 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.

102. 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.

103. 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.

104. 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.
105. da Silva J.A.T., Nhut D.T., 2003, Thin cell layers and floral morphogenesis, floral genetics and *in vitro* flowering. In: Nhut D.T., Le B.V., Van K.T.T., Thorpe T., editors, *Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications*, Springer Netherlands, pp. 285-342.
106. Marinangeli P., 2016, Somatic embryogenesis of *Lilium* from microbulb transverse thin cell layers, *Methods Mol Biol*, 1359, pp. 387-94.
107. 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.
108. 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., Vinh B.V.T., 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.

114. 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.

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

116. 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.

117. 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.

118. 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.

119. 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.

120. 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.

121. 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.

122. 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.

123. Mahendran D., Kishor P.B.K., 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.

124. 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.

125. 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.

126. Jacob Y., Ferrero F., 2003, Morphology and anatomy - Pollen grains and tubes. In: Roberts A.V., editor, *Encyclopedia of rose science*, Elsevier, pp. 518-23.

127. 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.

128. Bruckner C.H., Casali V.W.D., de Moraes C.F., Regazzi A.J., da Silva E.A.M., 1995, Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), *ActaHortic*, 370, pp. 45-57.

129. Souza M.M., Pereira T.N.S., Viana A.P., Pereira M.G., do Amaral-Júnior A.T., Madureira H.C., 2004, Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae), *Sci Hortic*, 101(4), pp. 373-85.

130. 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.

131. 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.

132. Trần Hiếu, 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.

133. 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.

134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. Khai H.D., Bien L.T., Vinh N.Q., Dung D.M., Nghiep N.D., Mai N.T.N., Tung H.T., Luan V.Q., Cuong D.M., Nhut D.T., 2021, Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of Begonia somatic embryos under clinorotation, *Plant Sci*, 312, pp. 111045.
138. 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.
139. 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.
140. 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. 1-517.
141. 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.
142. 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.
143. 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.

144. 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.
145. Dar R.A., Nisar S., Tahir I., 2021, Ethylene: A key player in ethylene sensitive flower senescence: A review, *Sci Hortic*, 290, pp. 110491.
146. Sarmast M.K., Salehi H., 2016, Silver nanoparticles: An influential element in plant nanobiotechnology, *Mol Biotechnol*, 58(7), pp. 441-9.
147. 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.
148. 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.
149. 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.
150. 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.
151. 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.
152. 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.
153. 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.

154. 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.
155. Chang M.Z., Huang C.H., 2018, Effects of GA₃ on promotion of flowering in *Kalanchoe* spp, *Sci Hortic*, 238, pp. 7-13.
156. Mutasa-Göttgens E., Hedden P., 2009, Gibberellin as a factor in floral regulatory networks, *J Exp Bot*, 60(7), pp. 1979-89.
157. 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.
158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. Arnao M.B., Hernández-Ruiz J., 2020, Melatonin in flowering, fruit set and fruit ripening, *Plant Reprod*, 33(2), pp. 77-87.
164. 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.

165. 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.
166. 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.
167. 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.
168. 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.
169. Landa P., 2021, Positive effects of metallic nanoparticles on plants: Overview of involved mechanisms, *Plant Physiol Biochem*, 161, pp. 12-24.
170. 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.
171. 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.
172. 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.
173. 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.
174. 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.

175. 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.
176. 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.
177. 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.
178. 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.
179. 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.
180. Akeel A., Jahan A., 2020, Role of cobalt in plants: Its stress and alleviation. In: Naeem M., Ansari A.A., Gill S.S., editors, *Contaminants in agriculture: Sources, impacts and management*, Springer International Publishing, pp. 339-57.
181. Faisal M., Saquib Q., Alatar A.A., Al-Khedhairy A.A., Ahmed M., Ansari S.M., Alwathnani H.A., Dwivedi S., Musarrat J., Praveen S., 2016, Cobalt oxide nanoparticles aggravate DNA damage and cell death in eggplant via mitochondrial swelling and NO signaling pathway, *Biol Res*, 49, pp. 20.
182. Jahani M., Khavari-Nejad R.A., Mahmoodzadeh H., Saadatmand S., 2019, Effects of foliar application of cobalt oxide nanoparticles on growth, photosynthetic pigments, oxidative indicators, non-enzymatic antioxidants and compatible osmolytes in canola (*Brassica napus* L.), *Acta Biol Crac Ser Bot*, 61(1), pp. 29-42.
183. Talankova-Sereda T.E., Liapina K.V., Shkopinskij E.A., Ustinov A.I., Kovalyova A.V., Dulnev P.G., Kucenko N.I., 2016, The influence of Cu и Co nanoparticles on growth characteristics and biochemical structure of *Mentha longifolia in vitro*. In: Fesenko O., Yatsenko L., editors, *Nanophysics*,

Nanophotonics, Surface Studies, and Applications, Springer International Publishing, pp. 427-36.

184. Rastogi A., Zivcak M., Sytar O., Kalaji H.M., He X., Mbarki S., Brestic M., 2017, Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review, *Front Chem*, 5, pp. 78.

185. Tung H.T., Nguyen P.L.H., Lich T.V., Ngan H.T.M., Cuong D.M., Luan V.Q., Khai H.D., Mai N.T.N., Vinh B.V.T., Nhut D.T., 2022, Enhanced shoot and plantlet quality of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Revolution Yellow) cultivar on medium containing silver and cobalt nanoparticles, *Sci Hortic*, 306, pp. 111445.

186. 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.

187. 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.

188. 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.

189. 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.

190. 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. 403.

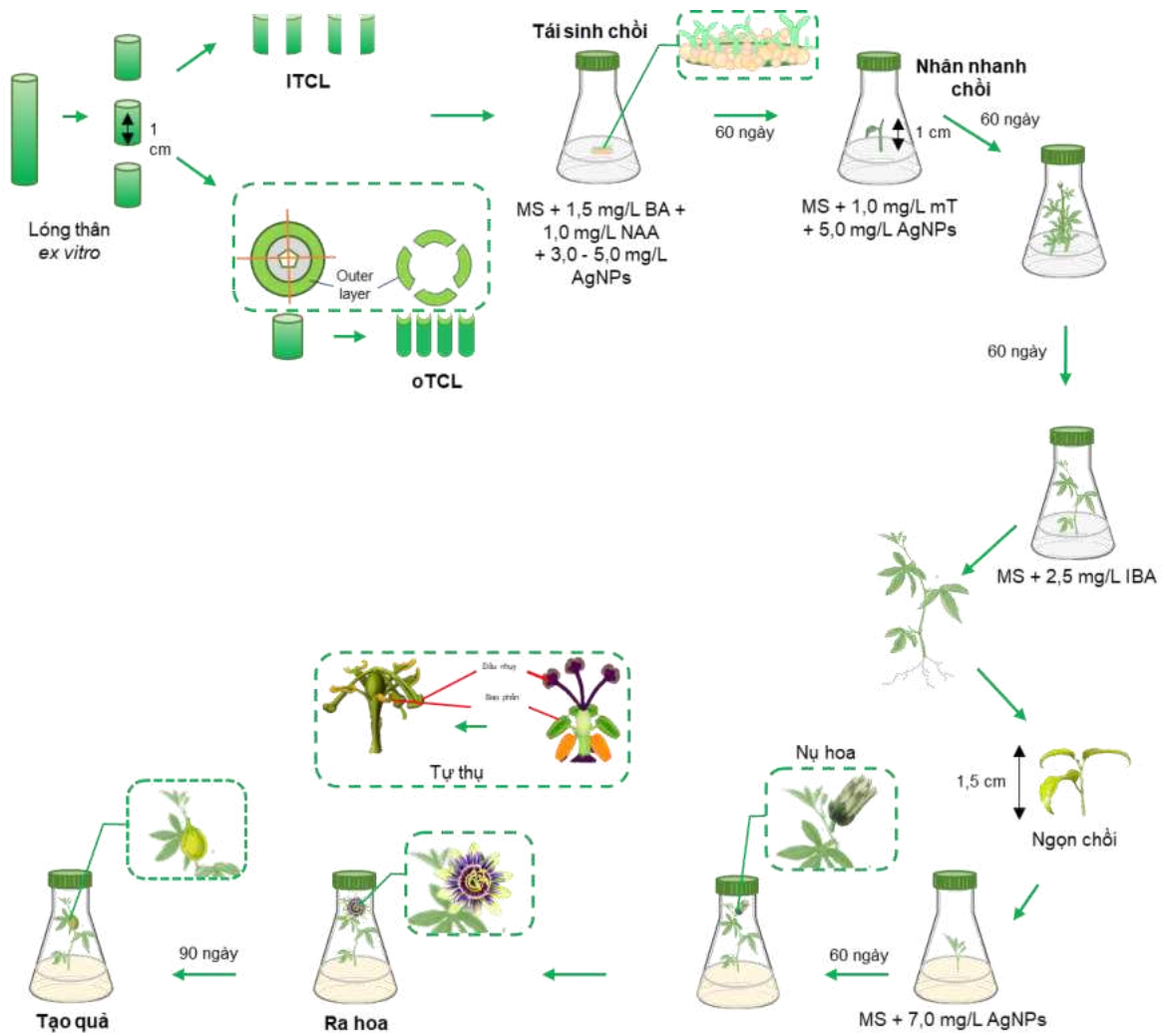
191. Scorza L.C.T., Hernandez-Lopes J., Melo-de-Pinna G.F.A., Dornelas M.C., 2017, Expression patterns of *Passiflora edulis* APETALA1/FRUITFULL homologues shed light onto tendril and corona identities, *EvoDevo*, 8(1), pp. 3.

192. Malmberg R.L., McIndoo J., 1983, Abnormal floral development of a tobacco mutant with elevated polyamine levels, *Nature*, 305(5935), pp. 623-5.


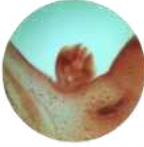






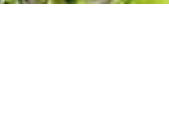

193. de Cantú L.B., Kandeler R., 1989, Significance of polyamines for flowering in *Spirodela punctata*, *Plant Cell Physiol*, 30(3), pp. 455-8.
194. Tiburcio A.F., Kaur-Sawhney R., Galston A.W., 1988, Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures, *Plant Cell Physiol*, 29(7), pp. 1241-9.
195. 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.
196. 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. 1033.
197. 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

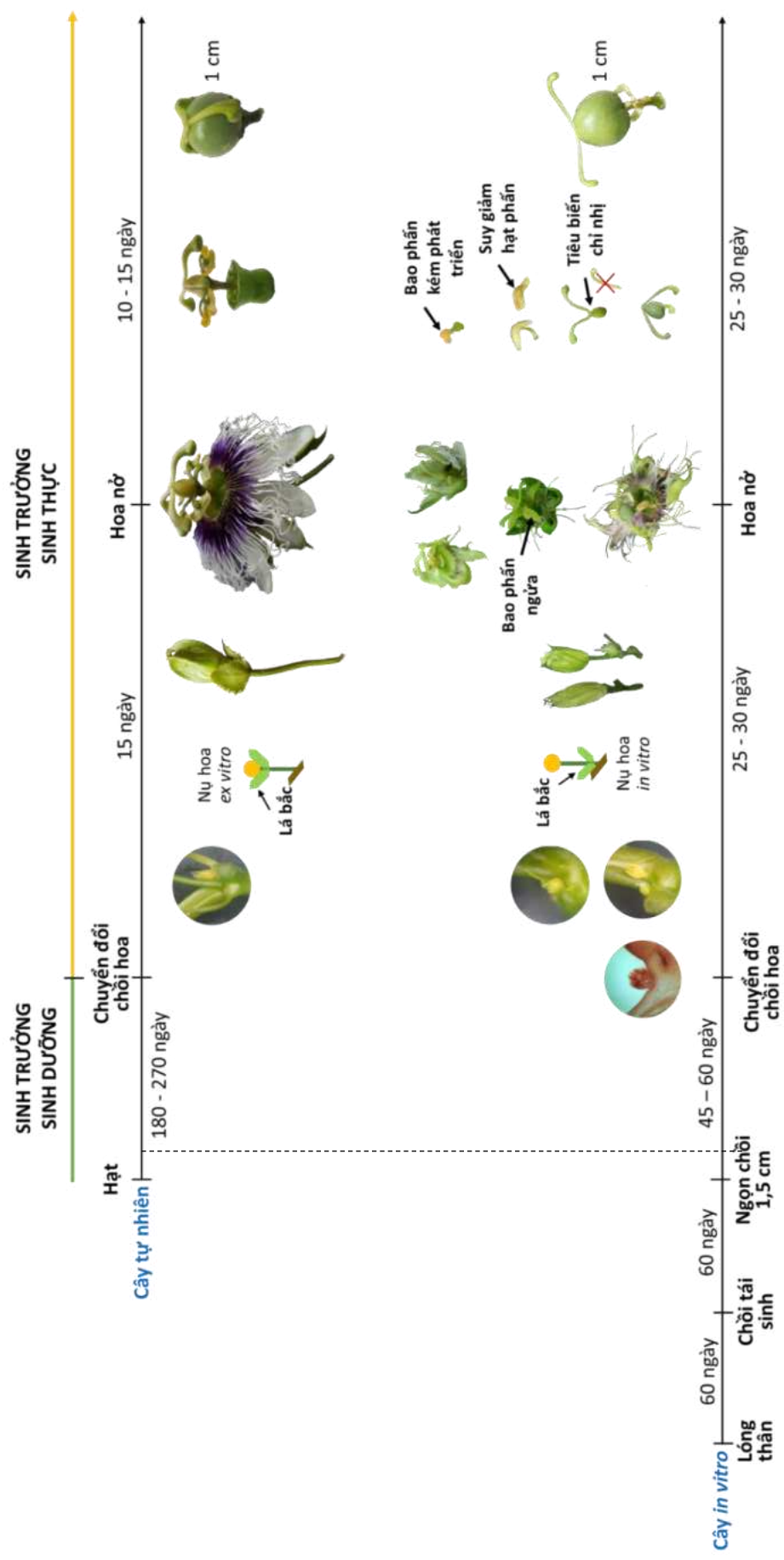
1.1. Sơ đồ thể hiện tóm tắt quy trình ra hoa và tạo quả *in vitro* ở cây chanh dây tím dựa trên AgNPs.



1.2. Khoảng thời gian trung bình của các giai đoạn 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 0,05 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.



Số: 246/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 07 tháng 07 năm 2024

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04/04/2017 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1948/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Quyết định số 2020/QĐ-HVKHCN ngày 10/12/2020 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận nghiên cứu sinh trúng tuyển đợt 2 năm 2020 - Chương trình chất lượng quốc tế;

Xét đề nghị của Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Trương Hoài Phong với 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*

Ngành: Sinh lý học thực vật

Mã số: 9 42 01 12

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận án kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án tiến sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định có hiệu lực tối đa 90 ngày kể từ ngày ký. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và nghiên cứu sinh có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /s/

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ NCS;
- Lưu: VT, ĐT, MT17.

GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lâm

**DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CẤP HỌC VIỆN**



(Kèm theo Quyết định số 845/QĐ-HVKHCN ngày 04/07/2024
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận án của nghiên cứu sinh: Trương Hoài Phong

Về 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*

Ngành: Sinh lý học thực vật

Mã số: 9 42 01 12

Thầy hướng dẫn: 1. GS.TS. Dương Tân Nhựt

- Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Nguyễn Bá Nam

- Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Chức trách trong Hội đồng
1	GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng	Công nghệ sinh học	Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Phản biện 1
3	PGS.TS. Nguyễn Vũ Phong	Công nghệ sinh học	Trường Đại học Nông lâm TP.HCM, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Phản biện 2
4	PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng	Sinh lý học thực vật	Trường Y Dược, Đại học Duy Tân	Phản biện 3
5	TS. Nguyễn Văn Bình	Công nghệ sinh học	Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Ủy viên - Thư ký
6	PGS.TS. Trần Thanh Hương	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Ủy viên
7	PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Ủy viên

(Hội đồng gồm 07 thành viên)./.



ĐANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Nghiên cứu sinh: Trương Hoài Phong

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*

Ngành: Sinh lý học thực vật

Mã số: 9 42 01 12

Thời gian: Bắt đầu từ 08h30, Thứ Bảy ngày 24 tháng 08 năm 2024.

TT	CHỨC DANH KHOA HỌC HỌ VÀ TÊN	ĐƠN VỊ CÔNG TÁC	TRÁCH NHIỆM	CHỮ KÝ
1.	GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng	Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch	
2.	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Phản biện 1	
3.	PGS.TS. Nguyễn Vũ Phong	Trường Đại học Nông lâm TP.HCM, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Phản biện 2	
4.	PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng	Trường Y Dược, Đại học Duy Tân	Phản biện 3	
5.	TS. Nguyễn Văn Bình	Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Ủy viên - Thư ký	
6.	PGS.TS. Trần Thanh Hương	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Ủy viên	
7.	PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Ủy viên	

Danh sách này gồm 07 thành viên./.

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Nguyễn Huy Hoàng

Học hàm, học vị: GS.TS.

Cơ quan công tác: Viện Nghiên cứu hệ gen

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Hoài Phong

Tên đề tài 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* Sim f. *edulis*) nuôi cấy *in vitro*

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Chanh dây (*Passiflora* spp.) là loại cây trồng có nguồn gốc từ Nam Mỹ, được trồng chủ yếu ở các vùng cận nhiệt đới và nhiệt đới trong đó có Việt Nam. Chanh dây có hoa đẹp, quả ăn được, cung cấp nhiều vitamin như: vitamin A, B5 và C và chứa nhiều các hoạt chất có giá trị như flavonoid glycoside và các dẫn xuất của apigenin, luteolin những chất chống ô xy hóa mạnh mẽ với đặc tính chống viêm đã được chứng minh là can thiệp vào chu kỳ sao chép của các tế bào ung thư, do đó ngăn ngừa ung thư phát triển.

Việt Nam là một trong những nước xuất khẩu chanh dây, cây chanh dây đứng vị trí thứ 17 trong số các loại cây ăn quả có quy mô diện tích sản xuất lớn trên 10.000 ha ở nước ta và được xếp hạng ở vị trí thứ 10 thế giới về loại trái cây xuất khẩu. Tuy nhiên hiện nay các giống chanh dây trồng tại Việt Nam chủ yếu là các giống từ Đài Loan, do vậy có thể thấy được việc chúng ta cần nghiên cứu sâu hơn về chanh dây nhằm ổn định nguồn giống nâng cao năng suất chất lượng là vô cùng cần thiết.

Trên thế giới và Việt Nam phần lớn tập trung nghiên cứu quá trình nhân giống, tạo phôi, chuyển phôi, thay đổi về tế bào và phân tử liên quan đến quá trình tạo phôi soma, các khả năng kích thích thúc đẩy sự trưởng thành phôi như nano selen,... Tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu về yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ra hoa và tạo quả của cây chanh dây tím bằng nuôi cấy *in vitro*. Do vậy, đề tài này có ý nghĩa khoa học không chỉ ở Việt Nam mà trên thế giới, nó sẽ góp phần cho sự phát triển nghiên cứu khép kín chu trình trồng các giống cây từ khi nảy mầm đến ra hoa và kết quả. Điều này sẽ giảm thời gian trong tăng thời gian thu hoạch cũng như có thể tăng chất lượng.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Nội dung của luận án không có sự trùng lặp với các nghiên cứu khác trên trong nước và trên thế giới. Nghiên cứu sinh trích dẫn 196 tài liệu tham khảo trong và ngoài nước, có sự kế thừa nghiên cứu trong nước và trên thế giới như kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào, sự ra hoa và tạo quả trên cây chanh dây tím,...

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên luận án phù hợp với nội dung và phù hợp với chuyên ngành Sinh lý học thực vật mã số 9420112: Chuyên về thực vật, nghiên cứu ảnh hưởng sinh trưởng, ra hoa bước đầu tạo quả dưới ảnh hưởng của một số yếu tố bổ sung trong môi trường nuôi cấy

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Các phương pháp nghiên cứu đúng theo chuyên ngành sinh lý thực vật như nuôi cấy chồi từ mẫu cây tế bào lớp mỏng, Ảnh hưởng của nano bạc đến quá trình sinh chồi từ mẫu cây lớp mỏng tế bào; sử dụng một số yếu tố tác động đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy in vitro; các phương pháp hoá sinh như sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPLC); sắc ký đầu dò ion hoá ngọn lửa; giải phẫu tế bào từ quá trình tạo chồi và tạo hoa. Ngoài ra sử dụng các phần mềm tin sinh học để đánh giá và phân tích. Các phương pháp hiện đại có độ tin cậy cao, đáp ứng với các nội dung nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Kết quả nghiên cứu được trình bày bám sát theo 2 nội dung nghiên cứu: 1) nghiên cứu tạo nguồn mẫu cấy in vitro cây chanh dây tím: cho thấy hiệu quả của quá trình phát sinh chồi tối ưu hơn nguồn mẫu từ quá trình phát sinh SE dựa trên hiệu quả tái sinh, đặc biệt sử dụng môi trường MS có bổ sung mT và AgNPs. 2) Khảo sát ảnh hưởng một số yếu tố đến sự ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện in vitro: Tìm ra được nồng độ thích hợp của GA3 cũng như khi bổ sung

bạc dưới dạng nano sẽ tăng kích thích sự ra hoa từ chồi của cây chanh dây tím và một số chất với nồng độ khác nhau không tăng khả năng sinh trưởng của chồi như ABA, AgNO₃ và Spd cho thấy có sự khác biệt với ngoài tự nhiên.

Kết quả này là dẫn liệu khoa học phong phú về ảnh hưởng của một số yếu tố liên quan tới quá trình sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả trên cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy in vitro có thể được sử dụng cho các nghiên cứu khác nhau trên cây chanh dây tím, từ các nghiên cứu cơ bản này có thể áp dụng vào thực tế trong việc tạo ra hệ thống ra hoa, tạo quả nhanh, chất lượng cao.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm của luận án:

Luận án được trình bày 124 trang và phụ lục bao gồm: Mở đầu 3 trang, Chương 1: Tổng quan tài liệu: 31 trang, Chương 2: Nội dung, vật liệu và phương pháp nghiên cứu: 14 trang, Chương 3: Kết quả và thảo luận: 53 trang, Kết luận và kiến nghị 2 trang, 196 tài liệu tham khảo trong và ngoài nước: 66 tài liệu/ 196 từ năm 2019 đến nay, có nhiều tài liệu cập nhật ngay trong năm 2024. Bố cục luận án được trình bày cân đối, theo đúng với các quy định của Học viện Khoa học và Công nghệ. Hình ảnh bảng biểu được chú giải rõ ràng, hình ảnh rõ nét, đẹp, hình ảnh được in màu đã cho thấy rõ kết quả mà NCS cần chỉ ra. Luận án viết khá ngắn gọn, rõ ràng, logic, văn phong khoa học đáp ứng với một luận án tiến sĩ chuyên ngành sinh lý học thực vật.

Nhược điểm của luận án:

Hình thức: Mục lục: Mở đầu không cần thiết phải viết toàn bộ tên các mục tại phần mở đầu (Không có ý nghĩa nhiều về thông tin vì quá ngắn và phần này mang tính giới thiệu).

Nên bổ sung thêm một số từ viết tắt vào trong bảng danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt (Tiên đề danh mục vii nên viết lại bỏ chữ “ký”)

Sau khi đưa ra các thông tin trong phần tổng quan cần đưa ra ý tưởng, định hướng thực hiện các nghiên cứu của mình cũng như rút ra được gì, học được gì từ các nghiên cứu để triển khai nội dung của mình.

Trong phần tổng quan nhiều từ viết chuyên môn không nên viết hoa trong câu vì không phải đầu câu tại trang 7, 8, 9

Không nên sử dụng “Phương pháp bố trí thí nghiệm”

Một số thiết bị lớn trong nghiên cứu cũng nên được bổ sung như HPLC, sắc ký khí. Kết luận nên viết lại với các từ ngữ mang tính khẳng định nghiên cứu đã tiến hành

và đạt được.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Nội dung luận án được đăng trên 3 bài báo quốc tế: 2 bài trên tạp chí Plant cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2022, 2023: Q1, IF>2,8, H-index 98. Một bài trên tạp chí: Scientia Horticulture 2023: Q1, IF> 4,5, H-index 145. NCS đều là tác giả chính của 3 bài báo quốc tế SCIE, các nội dung của bài báo là một phần của kết quả nghiên cứu, đã cho thấy NCS đã thực hiện và làm chủ các kỹ thuật trong các nội dung nghiên cứu.

8. Kết luận chung:

NCS Trương Hoài Phong đã thực hiện nội dung của luận án có khối lượng công việc nghiên cứu khoa học, logic, hợp lý, công việc đồ sộ. Các nội dung của luận án đáp ứng với một luận án tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý học thực vật. Đề nghị Hội đồng cho phép NCS được bảo vệ để nhận học vị TS.

Hà Nội, ngày 26 tháng 7 năm 2024

Người viết nhận xét



Nguyễn Huy Hoàng

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: **Nguyễn Du Sanh**

Học hàm, học vị: **PGS.TS**

Cơ quan công tác: **Trường ĐHKHTN- ĐHQGTPHCM**

Họ và tên nghiên cứu sinh: **Trương Hoài Phong**

Tên đề tài 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* Sim f. *edulis*) nuôi cấy *in vitro*

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Tạo hoa là một chương khó trong chu trình phát triển của thực vật; Có nhiều khảo cứu *in vivo* cũng như *in vitro* với mong muốn đưa ra một chương trình tổng quát về sự tạo hoa nhưng đến nay vẫn còn đang tiếp tục nghiên cứu.

Cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims. f. *edulis*) và chanh dây vàng (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa*) là hai loài du nhập, trong đó chanh dây tím được trồng nhiều vì đem lại giá trị kinh tế cao.

Việc nghiên cứu sự tạo hoa và quả của chanh dây tím là một công trình rất đáng trân trọng vì ở chi *Passiflora* có rất ít thí nghiệm được thực hiện; Đặc biệt là các thí nghiệm trong ống nghiệm. Ngoài ra, những kết quả từ khảo cứu này sẽ cho chúng ta biết đến các yếu tố có thể ảnh hưởng đến quá trình tạo hoa và quả *in vitro* của loài thực vật này.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Luận án gồm có hai phần: Tạo nguồn mẫu cây với số lượng lớn từ cây chanh dây tím (trong đó có việc phát sinh phôi soma) *in vitro* và khảo sát sự tạo hoa và bước đầu tạo quả *in vitro*. Bản thân chưa thấy có sự trùng lặp về nội dung của công trình và luận án được công bố trước đây. Đây là một công trình nghiên cứu khá chi tiết về nuôi cấy tạo nguồn mẫu và tạo phôi cây chanh dây tím *in vitro*. Sau đó, nghiên cứu sự tạo hoa và tạo quả *in vitro* với nguồn mẫu này. Các kết quả thí nghiệm thu nhận được trình bày rõ; Các số liệu có tính thống kê. Các ghi nhận và lý giải có liên quan đến mỗi phần được đề cập đều được trích dẫn đầy đủ với các tài liệu tham khảo có liên quan. Trích dẫn rõ ràng, trung thực, phù hợp với các tài liệu tham khảo đi kèm.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài luận án đã thể hiện đầy đủ qua nội dung nghiên cứu và phù hợp với ngành Sinh lý học thực vật và mã số 9.42. 01.12. Nội dung luận án phù hợp với cách đặt vấn đề (nêu được lý do và mục đích nghiên cứu). Luận án gồm 2 nội dung với 14 thí nghiệm được thực hiện, đã thu thập được các số liệu chứng minh cho mục tiêu đề ra dựa trên các phương pháp được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* xử lý hóa chất để tạo hoa và bước đầu tạo quả *in vitro*. Các thí nghiệm đã đạt được nhiều kết quả rất đáng chú ý.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu trong luận án là các phương pháp thường được sử dụng trong nghiên cứu về sinh lý học thực vật như kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng (TCL), tái sinh chồi trên các (lóng thân), tạo phôi soma từ (mẫu lá) bằng cách sử dụng phytohormone không có và có AgNPs trên cây chanh dây tím *ex vitro*. Khảo sát sự ra hoa *in vitro* cùng sự tạo quả qua sử dụng các phytohormone (GA_3 , ABA) và các ion Bạc, nano Bạc (AgNPs), nano Cobalt (CoNPs), spermidine (Spd) bằng cách quan sát sự thay đổi về hình thái, cấu trúc giải phẫu, định lượng phytohormone chồi của cây chanh dây tím *in vitro*.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Nghiên cứu đã đưa ra được các thông số về tái sinh chồi và tạo phôi soma (phôi sinh dưỡng) để có thể ứng dụng trong quá trình vi nhân giống cây chanh dây tím. Bước đầu đã tạo được hoa và quả của cây chanh dây tím *in vitro* dưới tác động của AgNPs (3- 9 mg/L: trong đó 7 mg/L là tốt nhất) (tr.71, 82), và AgNPs 7 mg/L + spermidine 0,05 mM (93, 98-99). Số liệu được ghi nhận và có phân tích thống kê. Các ghi nhận được trích dẫn đầy đủ và súc tích.

6. Điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Luận án có đầy đủ các phần theo quy định. Luận án trình bày trong 124 trang. Các phần được phân phối hợp lý. **Mở đầu:** (03 trang) với phần đặt vấn đề rõ (nêu được lý do và mục đích nghiên cứu); **Chương 1: Tổng quan nghiên cứu** (32 trang) tương đối đầy đủ (liên quan đến đối tượng, nội dung nghiên cứu qua tham khảo các tài liệu đã xuất bản); **Chương 2: Nội dung, Vật liệu và Phương pháp nghiên cứu:** (14 trang) Tương đối đầy đủ; Gồm 2 nội dung với 14 thí nghiệm được thực hiện trên vật liệu ban đầu là chồi chanh dây *ex vitro* 6 tháng tuổi. **Chương 3: Kết quả và Thảo luận:** (53 trang) được thể hiện qua hình ảnh, bảng, số liệu có tính thống kê; Các kết quả được lý giải (thảo luận) qua các tài liệu tham khảo có liên quan. **Kết luận và Kiến nghị:** (2 trang) Dựa trên kết quả thực nghiệm đã đúc kết lại các nội dung đặt ra và dựa vào đó đề xuất các công việc có liên quan. **Phần công trình đã công bố:** (1 trang) với 03 bài báo đăng trên 2 tạp chí, nhà xuất bản có uy tín ở nước ngoài. **Tài liệu tham khảo:** (20 trang) với 196 tài liệu bằng tiếng Việt và tiếng Anh có liên quan đến nội dung luận án và có tính cập nhật. Luận án cũng có 03 trang **Phụ lục:** gồm sơ đồ thể hiện tóm tắt quy trình ra hoa và tạo quả *in vitro*; So sánh khoảng thời gian ra hoa và bước đầu tạo quả khi có tác động của 7 mg/L AgNPs riêng lẻ hay có kết hợp với 0,5 mM spermidine; So sánh thời gian và đặc điểm của sự tạo hoa bước đầu tạo quả trong điều kiện ngoài tự nhiên và *in vitro*.

Ưu điểm:

Luận án trình bày sạch đẹp, rõ ràng. Ít lỗi in ấn. Nội dung luận án theo một trình tự logic. Các kết quả có hình ảnh với ghi chú, bảng biểu đi kèm nên dễ theo dõi. Tài liệu tham khảo phong phú và có tính cập nhật.

Hạn chế:

Đôi chỗ câu văn diễn đạt chưa rõ (PGR, PA có nhiều chất: tr.3); (đoạn 3 tr.5); đoạn 1 tr.13; *mT* (*meta* Topulin) tr.42 cần phải giới thiệu rõ hơn, có thảo luận để thuyết phục ở phần kết luận (tr.102).

- **Phần tổng quan:** Có mô hình ra hoa (tr.10,11), tự bất hợp (tr.32-33) nhưng chưa thấy thảo luận rõ trên đối tượng nghiên cứu trong tự nhiên và trong ống nghiệm (tr.80- 84 và phụ lục 3); Trong sự tạo hoa *in vitro* ở thực vật dù chưa rõ bức tranh về sự tạo hoa nhưng PGR

(Auxin, Cytokinin, Ethylen) cũng được nhiều tác giả nghiên cứu (bảng 1.1 tr.19-20) lý do gì mà luận án không nghiên cứu? Nghiên cứu về sự ra hoa nhưng trong phần giới thiệu về cây chanh dây tím chưa thấy đề cập đến yếu tố ngoại cảnh nào ảnh hưởng đến sự ra hoa (nhiệt độ, quang kỳ, dinh dưỡng, yếu tố stress,.. là cây tự thụ hay bắt thụ? (tr 23-27). Chưa thấy đề cập đến chu kỳ cảm ứng mà thực vật cần có để ra hoa;

- **Phần Vật liệu:** Vật liệu ban đầu là chồi chanh dây *ex vitro* 6 tháng tuổi tr.36 (có liên hệ gì với TLTK 96: có sạch *virus*?) ... Các TN trong nội dung 1 cần ghi rõ và chi tiết hơn về sự kế thừa (*không nên ghi chung chung: các thông số tối ưu từ thí nghiệm trước được chọn*). Vật liệu từ chồi chanh dây ở ND 1 được chọn làm vật liệu tạo rễ dùng trong nội dung 2 cũng cần mô tả chi tiết hơn (tr.42); Phương pháp tiến hành ở TN 3.2 cũng cần mô tả chi tiết hơn (tr.45);

- **Phần Kết quả và Thảo luận:** Ở phần nội dung 2, thí nghiệm thực hiện với một số yếu tố đã cho kết quả nhưng còn hạn chế về sự ra hoa nói chung (so với tên đề tài). Vai trò của ion bạc, coban và spermidine khi xử lý riêng lẻ không có ảnh hưởng trên sự ra hoa và tạo quả nhưng phần mô tả chưa nhấn mạnh và biện luận lại quá dài. Chỉ có AgNPs và AgNPs phối hợp với spermidine 0,05 mM mới cho kết quả. Kết quả xử lý các yếu tố mới đang được nghiên cứu trên sự ra hoa, tạo quả nên có chỗ sự thảo luận chưa rõ (mà tác giả ghi...*cần được nghiên cứu thêm*).

- **Phần Kết luận và kiến nghị:** Nên viết cô đọng cho đúng với mục tiêu của luận án.

Câu hỏi:

- 1) Vai trò của AgNPs trong quá trình ra hoa, tạo quả ở cây chanh dây tím *in vitro*? Giải thích thêm trong việc nở hoa (tr.78)
 - 2) Vai trò của spermidine trong sự tạo hoa, quả (tr.101 – 102) ở cây chanh dây tím *in vitro*?
 - 3) Theo tác giả sự ra hoa ở cây chanh dây tím *in vitro* do yếu tố nào quyết định?
7. **Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố**

Có 03 bài báo được công bố online trên hai tạp chí chuyên ngành có uy tín ở nước ngoài về sinh học (*Plant cell, Tissue and Organ Culture: NXB Springer và Scientia Horticulturae: NXB Elsevier*) năm 2022 = 01 bài, năm 2023 = 02 bài có liên quan đến nội dung luận án với tên tác giả luận án là người đứng đầu.

8. Kết luận chung

Mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành.

So với yêu cầu thì luận án đáp ứng được đầy đủ yêu cầu của một luận án tiến sĩ.

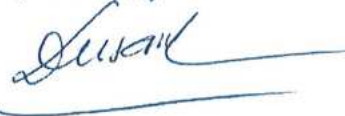
Bản tóm tắt đã thể hiện tương đối đầy đủ và trung thực nội dung của luận án.

Đề nghị luận án được đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng tiến sĩ ngành Sinh lý học Thực vật.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 28 tháng 07 năm 2024

Người viết nhận xét

(Phản biện)



Nguyễn Du Sanh

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Nguyễn Vũ Phong

Học hàm, học vị: Phó giáo sư, tiến sĩ

Cơ quan công tác: Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Hoài Phong

Tên đề tài 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*

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Cảm ứng ra hoa *in vitro* có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu sinh học phát triển thực vật phục vụ công tác lai tạo, chọn giống. Chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) là một loại cây trồng thương mại quan trọng. Nghiên cứu cảm ứng ra hoa và tạo quả *in vitro* cây chanh dây tím sẽ đóng góp dữ liệu khoa học cho nghiên cứu sinh lý và công tác lai tạo giống cây trồng này cũng như các giống cây trồng liên quan.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Luận án có tính mới, không trùng lặp với công bố trước đây.

Tài liệu được trích dẫn rõ ràng, đầy đủ, trung thực có độ tin cậy cao.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài phù hợp với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành Sinh lý học thực vật (mã số: 9420112).

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án đã nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây *in vitro* thông qua phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL) và phát sinh phôi soma (SE); 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*; phân tích hormone nội sinh được thực hiện bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC); định lượng khí ETH tích lũy bằng phương pháp sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa; phương pháp xác định chỉ số diệp lục tố, phương pháp quan sát giải phẫu hình thái mô tạo chồi và tạo hoa. Số liệu trung bình được xử lý

thống kê phù hợp, đáng tin cậy.

Các phương pháp nghiên cứu phù hợp với các nội dung nghiên cứu, được thiết kế hợp lý, rõ ràng, chi tiết.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Kết quả nghiên cứu mới, những đóng góp mới:

Nano bạc ở nồng độ thích hợp đã tăng cường hiệu quả tái sinh và nhân nhanh chồi từ mẫu cấy lớp mỏng lông thân. Sự phát sinh phôi sinh dưỡng thông qua mô sẹo được cải thiện khi bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy có 2,4-D.

AgNPs còn giúp kích thích sự ra hoa trên các chồi *in vitro*. Sự kết hợp AgNPs và spermidine làm chậm sự ra hoa, tỷ lệ ra hoa và số hoa giảm so với môi trường chỉ bổ sung AgNPs. Tuy vậy, sự bổ sung của spermidine làm cho chồi hoa phát triển có cấu trúc gần giống với cấu trúc hoa tự nhiên.

Ý nghĩa khoa học, giá trị thực tiễn của các đóng góp

Việc áp dụng AgNPs vào nuôi cấy chanh dây tím *in vitro* mang lại một số lợi ích cho tái sinh và nhân chồi, cũng như sự ra hoa. Kết quả thu được về sự ra hoa đóng góp dữ liệu khoa học, tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

Độ tin cậy của kết quả: Đáng tin cậy

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm: Kết quả nghiên cứu phong phú, sự sắp xếp các phần cân đối, hợp lý, số liệu đáng tin cậy. Kết quả của đề tài cung cấp dữ liệu khoa học cho nghiên cứu sinh lý và công tác chọn tạo giống chanh dây, có thể tham khảo cho các đối tượng cây trồng khác. Hình thức và nội dung luận án đáp ứng yêu cầu của luận án Tiến sĩ.

Những hạn chế của luận án: Một số hạn chế về hình thức, nội dung và văn phong có thể điều chỉnh, sửa chữa hoàn thiện được đánh dấu trong luận án.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Nội dung luận án đã công bố trong 02 bài đăng ở tạp chí *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (SCIE, Q1) và 1 bài đăng ở tạp chí *Scientia Horticulturae* (SCIE, Q1). Nghiên cứu sinh là tác giả chính của các công bố trong luận án. Các bài báo có nội dung

phù hợp với kết quả đề tài của luận án. Các bài báo công bố trong khoảng thời gian thực hiện luận án.

8. Kết luận chung:

Luận án đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án tiến sĩ ngành Sinh lý học thực vật

Bản tóm tắt phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án

Đồng ý cho NCS trình luận án ra bảo vệ tại hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Học viện đề nhận bằng tiến sĩ.

Tp. HCM, ngày 25 tháng 7 năm 2024

Người viết nhận xét



Nguyễn Vũ Phong

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh Phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Hoàng Thị Kim Hồng

Học hàm, học vị: PGS.TS. (Giảng viên Cao cấp)

Cơ quan công tác: Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Hoài Phong

Tên đề tài 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*

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Trong chu kỳ sống của thực vật có hoa, thì quá trình ra hoa và tạo quả đóng một vai trò rất quan trọng, quyết định năng suất và chất lượng cây trồng. Giai đoạn cây bắt đầu ra hoa thường được sử dụng làm mốc thời gian để xác định ranh giới giữa sinh trưởng dinh dưỡng (ra rễ, thân, lá, cành...) và sinh trưởng sinh sản (ra hoa, tạo quả, kết hạt...) trong chu kỳ sống của cây. Tuy nhiên, quá trình ra hoa và tạo hạt ở thực vật trong điều kiện tự nhiên thường bị chi phối bởi nhiều yếu tố ngoại cảnh, môi trường, mùa vụ... và khó kiểm soát. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào để nghiên cứu các yếu tố ngoại sinh bổ sung vào môi trường nuôi cấy để tác động đến quá trình ra hoa, tạo hạt ở thực vật trong nuôi cấy *in vitro* lớp mỏng tế bào là một phương pháp mới rất hữu hiệu trong nghiên cứu điều khiển ra hoa, tạo hạt *in vitro* ở quy mô phòng thí nghiệm. Kỹ thuật này tốn nhiều thời gian và trải qua nhiều giai đoạn nên thông thường các nghiên cứu được thực hiện trước đây chỉ dừng lại ở mức độ hoàn chỉnh quy trình nhân giống *in vitro* và tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh để đưa ra trồng trong điều kiện tự nhiên. Rất ít nghiên cứu có thể thực hiện cho đến khi cây con *in vitro* chuyển qua giai đoạn sinh trưởng sinh sản để ra hoa, tạo quả, tạo hạt và hoàn chỉnh chu kỳ sống của mình.

Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh (NCS) Trương Hoài Phong được thực hiện nhằm xác định được một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím (*Passiflora edulis Sims f. edulis*) nuôi cấy *in vitro*. Đây là một nghiên cứu hoàn toàn mới và mang tính hiện đại trong lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào. Nghiên cứu này sẽ cung cấp các chứng cứ thực nghiệm và dẫn liệu khoa học về một số yếu tố tác động đến quá trình sinh trưởng sinh sản, ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím nuôi cấy *in vitro*, đồng thời xác định được các đặc điểm ra hoa, tạo quả *in vitro* cây chanh dây và thiết lập được quy trình tạo được cây chanh tím *in vitro* ra hoa và tạo quả ở quy mô phòng thí nghiệm. Do vậy đề tài nghiên cứu trong luận án này là một đề tài rất cần thiết, mang tính thời sự, có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Đề tài nghiên cứu của NCS là công trình đầu tiên ở nước ta đã ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào để nghiên cứu tác động một số yếu tố bổ sung vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím nuôi cấy *in vitro*. Từ kết quả của nghiên cứu này có thể thiết lập một hệ thống ra hoa, tạo quả *in vitro* cây chanh dây ở quy mô phòng thí nghiệm thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Đề tài nghiên cứu trong luận án này là đề tài mới, không trùng lặp với các công trình, luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước.

Nguồn tài liệu tham khảo trong luận án được trích dẫn rõ ràng, đầy đủ và trung thực. Luận án đã tham khảo và trích dẫn từ 196 tài liệu khác nhau, trong đó có khoảng 2% tài liệu tiếng Việt, được trình bày chung với khoảng 98% tài liệu tiếng Anh. Các tài liệu này được công bố từ năm 1973 (Tài liệu số 61) đến năm 2024, trong đó có khoản trên 50 tài liệu mới được công bố trong 5 năm gần đây (từ 2020 đến 2024), chiếm khoản 26% tài liệu tham khảo (TLTK) trong toàn luận án. Nhìn chung, nguồn TLTK này được tác giả tham khảo và trích dẫn tương đối rõ ràng, đầy đủ và trung thực. Tên tài liệu trích dẫn trong luận án phù hợp với nội dung nghiên cứu của đề tài. Các tài liệu được trích dẫn trong luận án đều có nguồn trích dẫn được liệt kê trong phần danh mục TLTK. Có một số lỗi nhỏ trong cách trình bày về trang bài báo và một số lỗi in ấn cần rà soát và chỉnh sửa, ví dụ TL số 25: pp. 570-4, TL số 29: 73-9... TL số 55. *In vitro/in vitro*...

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Tên đề tài của luận án phù hợp với các nội dung được nghiên cứu. Các nội dung nghiên cứu của luận án này phù hợp với chuyên ngành Sinh lý thực vật và mã số chuyên ngành đã được đào tạo. Nội dung và kết quả của đề tài đã giải quyết được các vấn đề trọng tâm đề ra và đáp ứng được mục tiêu của luận án.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

- Luận án này sử dụng các phương pháp nghiên cứu như sau:

* Phương pháp tạo nguồn mẫu cây *in vitro* cây chanh dây tím từ các mẫu cây lớp mỏng tế bào của lóng thân *ex-vitro* 6 tháng tuổi.

* Phương pháp nghiên cứu phát sinh phôi soma từ mẫu cây lá *ex vitro*.

* Phương pháp nhân nhanh nguồn mẫu cây chồi thích hợp bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

* Phương pháp sử dụng các yếu tố ngoại sinh như *GA3*, *ABA*, *AgNO₃*, *AgNPs*, *CoNPs* và spermidine để nghiên cứu tác động của chúng đến sự sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả *in vitro* của cây chanh dây tím ở quy mô phòng thí nghiệm.

Các phương pháp nghiên cứu này hoàn toàn mới, chưa được ứng dụng nghiên cứu trên đối tượng cây chanh dây ở giai đoạn sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả trong nuôi cấy *in vitro*.

- Thiết bị, dụng cụ và hóa chất dùng trong luận án này hầu hết có nguồn gốc từ các hãng cung cấp chuyên nghiệp và uy tín của một số Quốc gia nổi tiếng trên thế giới như Nhật Bản, Singapore, Hà Lan và Mỹ. Hầu hết các hóa chất được sử dụng có độ tinh sạch rất cao (96% – 99,6%).

Nhìn chung, các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong đề tài này là hợp lý, các thí nghiệm được bố trí lặp lại nhiều lần và kết quả thu được đều có xử lý thống kê và tính sai số nên các phương pháp nghiên cứu này có độ tin cậy và có tính hiện đại.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống, ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Trong qua trình thực hiện luận án, NCS đã thu được một số kết quả mới rất có giá trị về mặt khoa học lần thực tiễn và có độ tin cậy cao.

Các kết quả mới nổi bật trong nghiên cứu này gồm (1) Xác định được các điều kiện tối ưu, các yếu tố ảnh hưởng và môi trường thích hợp cho quá trình nuôi cấy tái sinh chồi hoàn chỉnh từ các mẫu cây lớp mỏng tế bào của lóng thân *ex-vitro*, quá trình phát sinh phôi soma từ mẫu cây lá *ex vitro* và quá trình nhân nhanh nguồn mẫu cây chồi thích hợp. Từ đó, tạo được một lượng lớn nguồn mẫu cây *in vitro* cây chanh dây tím. (2) Xác định được nồng độ tối ưu và vai trò của các yếu tố ngoại sinh bổ sung vào môi trường nuôi cấy như GA3, ABA, AgNO₃, AgNPs, CoNPs và spermidine tác động đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. (3) Tạo được cây chanh dây tím *in vitro* ra hoa và bước đầu tạo quả trong bình nuôi cấy *in vitro*.

Luận án đã cung cấp nguồn kiến thức chuyên môn về khoảng thời gian trung bình và đặc điểm ra hoa, bước đầu tạo quả ở cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro* và điều kiện tự nhiên, đồng thời thiết lập được quy trình ra hoa và tạo quả *in vitro* của cây chanh dây tím dựa trên AgNPs. Đây là nguồn tư liệu rất hữu ích có thể tham khảo để cập nhật vào kiến thức chuyên môn trong lĩnh vực nuôi cấy mô lớp mỏng tế bào hoặc ứng dụng trong các nghiên cứu vi nhân giống sản xuất cây giống *in vitro* và điều khiển ra hoa, tạo quả *in vitro* cây chanh dây tím.

Luận án cung cấp các phương pháp nghiên cứu và công bố mới về các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím nuôi cấy *in vitro*. Các kết quả nghiên cứu của luận án là nguồn tư liệu hữu ích có thể tham khảo và định hướng nghiên cứu mới tiếp theo để hoàn chỉnh phương pháp ra hoa và tạo quả cho cây chanh dây tím nuôi cấy *in vitro* và chuyển cây *in vitro* ra ngoài trồng trong điều kiện tự nhiên ở Việt Nam.

Các nghiên cứu trong luận án được bố trí tuần tự, không trùng lặp và được tiến hành lặp lại nhiều lần. Kết quả nghiên cứu được thể hiện đầy đủ, rõ ràng trong các bảng, các hình và phần phụ lục minh chứng. Các bảng số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê trên các phần mềm chuyên dụng. Nội dung và kết quả nghiên cứu của luận án có tính trung thực, chính xác và có độ tin cậy.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm:

Luận án của NCS Trương Hoài Phong có hình thức, nội dung và kết quả phù hợp và đáp ứng mục tiêu đề tài. Hướng nghiên cứu trong luận án là hoàn toàn mới và chưa từng được nghiên cứu trước đây ở Việt Nam.

Về hình thức luận án

Luận án được trình bày khá ngắn gọn, trong 124 trang, gồm 5 phần: Mở đầu (3 trang), Tổng quan tài liệu (31 trang), Vật liệu và Phương pháp nghiên cứu (14 trang), Kết quả và thảo luận (53 trang), Kết luận và kiến nghị (2 trang). Danh mục công trình công bố liên quan đến luận án (1 trang). Phần tài liệu tham khảo (21 trang). Tác giả đã sử dụng 14 bảng, 44 hình và 3 trang phụ lục minh chứng cho kết quả nghiên cứu của luận án. Các hình chụp rõ nét, đẹp và có chú thích chi tiết. Nhìn chung, bản luận án của tác giả được trình bày rõ ràng, bố cục cân đối, hợp lý. Mặc dù, rải rác vẫn còn một vài chỗ có lỗi ngữ pháp, nhưng tổng thể các phần của luận án được trình bày rõ ràng, mạch lạc, theo đúng quy định. Luận án có kết cấu và hình thức phù hợp với yêu cầu của một luận án tiến sĩ.

Về nội dung luận án

Luận án đã giải quyết hai nội dung chính bao gồm (1) Nghiên cứu tạo nguồn mẫu cây *in vitro* cây chanh dây tím (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*. Nhìn chung, nội dung thực

hiện trong luận án phù hợp và đáp ứng mục tiêu đề ra. Các thí nghiệm được thực hiện với số lượng mẫu lớn, trong đó các số liệu từ kết quả có xử lý sai số, các bảng và hình ảnh minh chứng được trình bày trong phần kết quả là rõ ràng, nên kết quả luận án có độ tin cậy. Kết quả nghiên cứu phong phú, sự sắp xếp các phần khá cân đối, hợp lý, chặt chẽ, số liệu đáng tin cậy. Phần kết luận tổng kết được các nội dung nghiên cứu của đề tài. Các kết quả luận án đạt được là rất mới, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Nhược điểm:

Phần trình bày luận án còn một số sai sót, các góp ý sau đây nhằm mục đích giúp cho NCS để chỉnh sửa và hoàn thiện luận án chính thức tốt hơn.

1. Các chữ viết tắt có trong luận án nhằm rút gọn từ hoặc cụm từ cần diễn đạt, tránh lặp lại nhiều lần, vì thế mặc dù các chữ viết tắt này đã được trình bày trong “Danh mục các chữ viết tắt”, tuy nhiên để tiện theo dõi thì khi lần đầu tiên sử dụng chữ viết tắt trong luận án thì NCS cần viết đầy đủ tên của từ hoặc cụm từ đó trước khi dùng dạng viết tắt và từ đó về sau chỉ sử dụng chữ viết tắt đó trong toàn luận án mà không sử dụng lặp lại tên đầy đủ của từ hoặc cụm từ đã được viết tắt này. Ngoài ra do luận án trình bày bằng tiếng Việt nhưng hầu hết các chữ viết tắt lại trình bày bằng tiếng Anh nên trước khi chú thích chữ viết tắt tiếng Anh cho một từ hoặc cụm từ tiếng Việt thì NCS cần phải viết đầy đủ tên tiếng Anh của chữ viết tắt đó rồi mới dùng chữ viết tắt. Ví dụ: PGR là chữ viết tắt của “Plant growth regulator” và nghĩa tiếng Việt là: “Chất điều hòa sinh trưởng thực vật”, do vậy ở phần Mở đầu (trang 1) cụm từ “chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGR)” cần thay bởi: “chất điều hòa sinh trưởng thực vật (Plant growth regulator - PGR) và ở các trang sau chỉ sử dụng PGR trong toàn luận án khi đề cập đến “chất điều hòa sinh trưởng thực vật”. Góp ý này dành chung cho tất cả các chữ viết tắt và cách sử dụng các chữ viết tắt khác trong luận án này.

2. Ở phần “Mục tiêu nghiên cứu” của trang 2, cần lược bỏ từ polyamine mà chỉ dùng một từ spermidine (Spd) bởi vì trong luận án này NCS chỉ nghiên cứu ảnh hưởng của spermidine đơn lẻ hoặc kết hợp đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro* của cây chanh dây tím mà không nghiên cứu thêm ảnh hưởng của bất kỳ chất nào khác trong nhóm polyamine. Lưu ý, góp ý này cần được điều chỉnh tương tự ở các phần: Những đóng góp mới của luận án, nội dung nghiên cứu, phương pháp nghiên cứu và kết quả nghiên cứu của toàn luận án.

3. Ở phần “Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài” ở trang 3 cần điều chỉnh như sau:

* Đối tượng nghiên cứu: Cây chanh dây tím (*Passiflora edulis Sims f. edulis*)

* Phạm vi nghiên cứu: Chuyển phần trình bày ở mục “Đối tượng nghiên cứu” xuống thay cho phần trình bày trong “Phạm vi nội dung”.

* Thay từ “PA” thành “Spd” như đã góp ý ở trang 2.

4. Ở phần “Tổng quan”: cần xem lại hình 1.3 được trích dẫn từ hai nguồn tài liệu tham khảo (TLTK) số 47 và 48 có chính xác không?

Phần tổng quan về cây chanh dây tím nên bổ sung thêm một số kiến thức tổng quan về chu kỳ ra hoa, tạo hạt; thời gian ra hoa; đặc điểm ra hoa, tạo hạt của cây chanh dây tím trong điều kiện tự nhiên để có cơ sở khoa học trong phần thảo luận để so sánh với các kết quả đạt được về sự ra hoa và bước đầu tạo hạt trong nuôi cấy *in vitro*.

Tiêu đề của mục 1.4.3.3 là “Sự ra hoa và tạo quả *in vitro*” nhưng phần trình bày ở mục này chỉ nêu các kiến thức tổng quan về sự ra hoa và thiếu thông tin về sự tạo quả *in vitro* cây chanh dây tím. Một số câu văn trong phần tổng quan còn diễn đạt trùng lặp và không rõ nghĩa ví dụ ở trang 13: “phần lớn các loài thực vật có tính chất ban ngày và phần lớn ra hoa sau một thời gian phát triển dinh dưỡng, bất kể quang kỳ”.

Cách dùng cụm từ “bạc và coban” trong mục 1.2.3.2. và mục “Khảo sát ảnh hưởng của bạc và coban đến sự sinh trưởng, ra hoa, tạo quả *in vitro*” là chưa chính xác vì luận án khảo sát ảnh hưởng của AgNO₃, AgNPs và CoNPs (ở dạng ion chứ không phải nguyên tố).

5. Ở phần “Nội dung, vật liệu và phương pháp nghiên cứu”

Hình 2.1 nên chuyển sang trang 35 ở vị trí trước khi trình bày các nội dung nghiên cứu để người đọc tiện theo dõi.

Ở nội dung 1 có cụm từ “phôi soma (SE), cụm từ này đã được sử dụng lần đầu tiên ở mục 1.4.2.2. do vậy ở mục 1.4.2.2. này thay cụm từ “phôi soma (SE) trong câu “Nghiên cứu phát sinh phôi soma (SE) từ mẫu lá *ex vitro*” thành “Nghiên cứu phát sinh SE từ mẫu lá *ex vitro*”.

Tương tự ở nội dung 2 có cụm từ “chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGR)” đã được sử dụng lần đầu tiên ở mục tiêu nghiên cứu trong phần “Mở đầu”, do vậy cần thay cụm từ này thành PCR (trang 35). Thay từ “polyamine (PA) thành Spd như đã góp ý ở phần “Mục tiêu nghiên cứu”.

Cần thống nhất sử dụng cụm từ “bước đầu tạo quả” hay “tạo quả” trong toàn bộ luận án.

5. Ở phần Phương pháp nghiên cứu cần xem lại cách trình bày tên thí nghiệm để khởi bị trùng lặp giữa hai nội dung. Gợi ý chính sửa như sau:

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

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

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

Thí nghiệm 2. Nghiên cứu phát sinh SE từ mẫu cây lá *ex vitro*

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

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

Thí nghiệm 3. Nghiên cứu nhân nhanh nguồn mẫu cây chồi thích hợp

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*

Thí nghiệm 2.1. Khảo sát ảnh hưởng của PGR ngoại sinh đến quá trình ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của GA3 đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

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

Thí nghiệm 2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của AgNO₃ đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 2.2.3 Khảo sát ảnh hưởng của CoNPs đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

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

Thí nghiệm 2.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của Spd đơn lẻ đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

Thí nghiệm 2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của Spd kết hợp đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*

6. Ở phần Kết quả và Thảo luận

Tiêu đề của mục 3.1.3 (trang 62) là “Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs đến quá trình nhân nhanh chồi”, nhưng lại thiết kế thí nghiệm có 2 yếu tố tác động là 1,0 mg/L mT và AgNPs ở các nồng độ

khác nhau và dựa vào kết quả trình bày ở Hình 3.10 để kết luận “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 chồi của chanh dây tím”. Kết luận này là chưa chặt chẽ vì không đưa ra đối chứng so sánh (cải thiện đáng kể so với môi trường nào), ngoài ra do không có thí nghiệm thăm dò ảnh hưởng của AgNPs đơn lẻ trong môi trường không có 1,0 mg/L mT nên kết quả không rõ ràng do tác động đơn lẻ của AgNPs hay do tác động kết hợp của 1,0 mg/L mT với AgNPs. Vì thế NCS cần phải lưu ý để trình bày kết quả này và đưa ra kết luận rõ ràng và chính xác hơn. Lưu ý kết quả này đã được nêu lên trong phần “Kết luận và kiến nghị” là “Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L mT với 3,0 mg/L AgNPs thích hợp để nhân nhanh chồi”. Kết luận này rất phù hợp với kết quả đã trình bày ở Hình 3.10.

Trang 43 cần thống nhất cách sử dụng các cụm từ “đến quá trình ra hoa và tạo quả *in vitro*” (Thí nghiệm 1) và “đến sự sinh trưởng, ra hoa và tạo quả *in vitro*” (ở các thí nghiệm tiếp theo).

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỹ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Có ba công trình của NCS và cộng sự là các bài báo đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành Quốc tế rất uy tín. Trong đó có 1 bài đăng ở Tạp chí *Scientia Horticulturae* (IP: 3.9; H-index: 145) công bố năm 2023 và 2 bài đăng ở Tạp chí *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (IP: 2.3; H-index: 98) công bố năm 2022 và 2023. Khoản thời gian công bố ba công trình này đều nằm trong khung thời gian thực hiện luận án. Các bài báo đều viết bằng tiếng Anh, có tiêu đề và nội dung phù hợp với kết quả đề tài của luận án. Các bài báo đều công bố các kết quả rất mới của luận án và được đăng tải trên các tạp chí Quốc tế chuyên ngành uy tín thuộc nhóm Q1 và SCIE.

Mặc dù ba công trình đã công bố này không thuộc chỉ riêng của chính tác giả mà còn có sự đóng góp của một tập thể của đồng nghiệp và các thầy hướng dẫn, nhưng đây thực sự là kết quả rất có giá trị và rất đáng khích lệ cho NCS. Kết quả đăng tải trong các bài báo này không những khẳng định năng lực nghiên cứu và công bố Quốc tế của NCS mà còn minh chứng kết quả nghiên cứu của NCS trong luận án này có tính mới, có hàm lượng khoa học cao, được các chuyên gia của các tạp chí chuyên ngành Quốc tế thẩm định và công nhận nên có độ tin cậy cao.

8. Kết luận chung

Bản tóm tắt luận án trình bày bằng tiếng Anh và tiếng Việt phản ánh trung thực các phần cơ bản của luận án, đồng thời tóm tắt được các nội dung và kết quả chính của luận án chính thức.

Bản luận án chính thức có nội dung và hình thức phù hợp, đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án tiến sĩ của chuyên ngành Sinh lý thực vật.

Các công bố của luận án có chất lượng rất tốt, phù hợp với nội dung nghiên cứu và thời gian qui định của luận án Tiến sĩ. Số lượng và chất lượng bài báo khoa học của NCS đáp ứng và vượt yêu cầu công bố của một luận án Tiến sĩ.

Luận án đủ điều kiện đưa ra bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện và tôi đánh giá rất cao về chất lượng và giá trị của luận án này và đồng ý để NCS bảo vệ luận án tiến sĩ cấp Học viện.

Huế, ngày 22 tháng 07 năm 2024



Hoàng Thị Kim Hồng

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Nguyễn Văn Bình

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Cơ quan công tác: Trường Đại học Đà Lạt

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Hoài Phong

Tên đề tài 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*

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Chanh dây là một loài có giá trị kinh tế và thương mại rất cao, hiện đang được trồng phổ biến ở Việt Nam, trong đó vùng Tây Nguyên được xem là rất phù hợp để trồng loài cây này. Việc nhân giống chanh dây phần lớn dùng hạt, ghép, đâm hom, tuy nhiên các phương pháp này thường không đồng nhất về mặt di truyền, bị thoái hoá giống do các mầm bệnh như virus.... Do đó phương pháp nhân giống *in vitro* được xem là một trong những kỹ thuật được áp dụng để giải quyết những hạn chế nêu trên. Hiện tại việc nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Chanh dây cũng như việc ứng dụng kỹ thuật này vào nhân giống còn rất hạn chế. Do vậy việc hoàn thiện được quy trình nhân giống để đưa vào sản xuất thực tiễn có ý nghĩa rất lớn để phát triển loài cây này.

Đối với thực vật có hoa, quá trình ra hoa kết quả là một trong những yếu tố then chốt trong công tác tạo giống và mang lại năng suất, sản lượng cho các cây trồng nói chung và cây Chanh dây nói riêng, do đó việc nghiên cứu tìm ra được các yếu tố điều khiển được quá trình ra hoa và tạo quả có ý nghĩa rất lớn không chỉ cho nhân giống, điều tiết năng suất mà còn giúp ích cho công tác lai tạo giống mới. Do đó 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 đối với sinh lý ra hoa tạo quả *in vitro*, tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu và ứng dụng trong nhân giống, lai tạo giống và điều tiết năng suất đối với cây Chanh dây nói riêng và cây trồng nói chung.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Các nội dung nghiên cứu của luận án không bị trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào ở trong và ngoài nước trước đó, các tài liệu tham khảo được trích dẫn đầy đủ và rõ ràng thể hiện sự trung thực trong nghiên cứu khoa học.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Các nội dung nghiên cứu tương đối phù hợp với tên đề tài đặt ra và hoàn toàn phù hợp

với chuyên ngành và mã số chuyên ngành Sinh lý học thực vật.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong luận án là thường quy, có tính đa dạng và đáng tin cậy, phù hợp với chuyên ngành Sinh lý học thực vật và nội dung của luận án.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Kết quả nghiên cứu của luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên của Việt Nam và trên thế giới về ra hoa và tạo quả *in vitro* của cây Chanh dây tím. Việc tìm ra được các yếu tố có tác động tích cực đến sự ra hoa, đậu quả, cũng như cấu trúc của hoa đóng góp thêm các cơ sở lý luận cho quá trình nghiên cứu ra hoa và tạo quả ở thực vật có hoa. Bên cạnh đó đây cũng là cơ sở để thực hiện các nghiên cứu lai tạo giống trong không gian *in vitro* cho cây Chanh dây tím nói riêng và các loài thực vật có hoa nói chung. Thành công của nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu và ứng dụng trong nhân giống, chọn tạo giống đối với loài Chanh dây. Các thí nghiệm được bố trí với tập hợp mẫu tương đối nhiều và với 3 lần lặp lại, do đó các kết quả thu được là đáng tin cậy.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu Điểm:

Luận án được trình bày chính chu về nội dung và hình thức, kết cấu và bố cục hợp lý. Nội dung nghiên cứu của luận án đa dạng, các kết quả thu được có độ tin cậy cao. Tuy vậy phần tiêu đề chưa phản ánh hết nội dung nghiên cứu của luận án, còn một vài các lỗi nhỏ về chính tả và đánh máy cần xem xét chỉnh sửa cho hoàn thiện hơn.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Trong phạm vi nội dung nghiên cứu, nghiên cứu sinh đã có 03 bài là tác giả chính được đăng trên 2 tạp chí quốc tế uy tín thuộc danh mục SCI/SCIE (Q1). Các nội dung đã công bố hoàn toàn phù hợp với nội dung nghiên cứu của luận án và đáp ứng được yêu cầu đối với luận án tiến sĩ.

8. Kết luận chung:

Nội dung luận án đáp ứng được đầy đủ yêu cầu của một luận án Tiến sĩ.

Bản tóm tắt luận án (tiếng Việt và tiếng Anh) đã thể hiện đầy đủ và trung thực nội dung của luận án.

Luận án đủ điều kiện bảo vệ cấp học viện để nhận bằng Tiến sĩ

Đà Lạt, ngày 24 tháng 07 năm 2024

Người viết nhận xét



TS. Nguyễn Văn Bình

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Trần Thanh Hương

Học hàm, học vị: Phó giáo sư, tiến sĩ

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG Tp. HCM

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Hoài Phong

Tên đề tài 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 fedulis*) nuôi cấy *in vitro*.

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ra hoa là giai đoạn chuyển tiếp quan trọng trong chu trình phát triển của thực vật có hoa. Sự ra hoa góp phần quyết định sự thành công trong sinh sản (tạo quả và hạt) và do đó có tầm quan trọng đặc biệt đối với năng suất và sự duy trì nòi giống của cây trồng. Chanh dây tím (*Passiflora edulis Sims fedulis*) là giống chanh dây tương đối dễ trồng và cho năng suất cao nên là vật liệu thích hợp để nghiên cứu ra hoa, đặc biệt trong điều kiện có kiểm soát (nuôi cấy *in vitro*). Chính vì vậy, 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 fedulis*) nuôi cấy *in vitro*” của nghiên cứu sinh là thật sự cần thiết, vừa có ý nghĩa khoa học, vừa có giá trị thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Chưa thấy có sự trùng lặp với các công trình, luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước. Tài liệu tham khảo được trích dẫn khá rõ ràng và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu và nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành Sinh lý học thực vật.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Nghiên cứu sinh sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* và các phương pháp đo đạc

thường được sử dụng trong các phòng thí nghiệm Sinh lý thực vật, các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và có lặp lại nên có thể tin cậy.

5. **Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.**

Luận án có các kết quả đáng chú ý sau:

- Trong số các nồng độ AgNPs xử lý (1, 3, 5, 7 và 9 mg/L), nồng độ AgNPs 7 mg/L cho tỉ lệ ra hoa và số nụ hoa/chồi cao nhất (tỉ lệ ra hoa đạt 51,72% số nụ hoa trên chồi đạt 2,33).
- Xử lý phối hợp AgNPs 7 mg/L và spermidine 0,05 mM làm giảm tỉ lệ chồi hoa nhưng các hoa hình thành có thêm sự hiện diện của tua cuống.

Các kết quả nghiên cứu của luận án góp phần cung cấp thêm thông tin về ảnh hưởng của các hạt nano bạc (AgNPs) và spermidine lên sự ra hoa và bước đầu tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*. Hầu hết các số liệu trong luận án đều được xử lý thống kê nên có thể tin cậy.

6. **Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án**

Ưu điểm chính của luận án là có nội dung phong phú, thể hiện sự nỗ lực cao trong nghiên cứu của nghiên cứu sinh. Các kết quả nghiên cứu đều được nghiên cứu sinh nhận xét và thảo luận. Kết cấu và cách trình bày luận án nói chung là khá hợp lý với đầy đủ các phần của một luận án tiến sĩ. Tuy nhiên, luận án vẫn còn một vài điểm chưa hoàn thiện như:

- Phần mở đầu: mục tiêu của luận án chưa được trình bày rõ (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 fedulis*) nuôi cấy *in vitro* để làm gì?).
- Phần tổng quan tài liệu liên quan đến sự ra hoa ở thực vật nói chung và cây chanh dây nói riêng chưa được trình bày kỹ.
- Phần vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu:
 - + Cách đánh số thí nghiệm bị trùng lặp giữa các nội dung nên khó theo dõi.
 - + Nguồn gốc của vật liệu (chồi được cô lập từ cây/chồi *in vitro* tăng trưởng trên môi trường nào?) sử dụng trong một số thí nghiệm (thí nghiệm 3 ở trang 42;

1.1 ở trang 43,...) chưa được mô tả rõ. Với cùng thí nghiệm, vật liệu sử dụng trong luận án và trong bài báo đã công bố có giống nhau hay không?

+ Phương pháp xác định hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh và melatonin chưa được mô tả đầy đủ. Ví dụ: các chất chuẩn nào được sử dụng? Cách chuẩn bị chất chuẩn? Cách xác định hàm lượng các chất?...

+ Kiểm tra và ghi chính xác số mẫu ở mỗi nghiệm thức trong các thí nghiệm khảo sát ra hoa và tạo quả.

- Phần kết quả và thảo luận:

+ Cách trình bày các hình mô tả số lượng chưa thống nhất (hình 3.7, 3.8, 3.9, 3.10,...).

+ Đơn vị của chỉ số diệp lục tố (SPAD) chưa được thể hiện trong các bảng kết quả.

+ Có sự trùng lặp giữa các hình (hình 3.30G và 3.31F).

+ Cùng một thí nghiệm nhưng kết quả có vài khác biệt nhỏ giữa số liệu trong luận án và số liệu trong bài báo (?).

+ Dựa vào sự hiện diện của tua cuống để kết luận việc kết hợp bổ sung AgNPs và spermidine cho cấu trúc chồi hoa gắn với cấu trúc chồi hoa ngoài tự nhiên (trang 96, 102) là chưa thuyết phục.

+ Nội dung chính của luận án là khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự ra hoa của cây chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, phần tổng quan tài liệu về sự ra hoa, các phân tích sinh lý học cũng như phân tích ở mức tế bào và phân tử liên quan đến quá trình ra hoa ở cây chanh dây tím còn khá ít. Do đó, cách tác động của một số yếu tố, đặc biệt là chất điều hòa tăng trưởng thực vật, AgNPs và spermidine lên sự ra hoa chưa được làm rõ.

- Phần kết luận và kiến nghị:

+ Các kết luận, đặc biệt là kết luận liên quan trực tiếp đến sự ra hoa và tạo quả của cây chanh dây tím trong điều kiện *in vitro* (nội dung chính của luận án) nên được trình bày cụ thể hơn.

+ Các kiến nghị nên được viết ngắn gọn, không cần diễn giải.

- Phần tài liệu tham khảo: sẽ dễ tham khảo hơn nếu được sắp xếp theo thứ tự ABC.
- Phần phụ lục: vui lòng cung cấp các dữ liệu bổ sung để xác định hàm lượng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh và melatonin.
- Về kết cấu luận án: không thấy có trang tóm tắt luận án tiếng Việt và tiếng Anh.
- Về hình thức: luận án còn một số lỗi như lỗi đánh máy, cách viết chưa thống nhất (GAs, GA₃, GA1...), câu dư thừa (trang 44 “Các nghiệm thức không bổ sung AgNPs được sử dụng làm đối chứng”),...
- ...

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Nghiên cứu sinh cùng các cán bộ hướng dẫn và tập thể nhóm nghiên cứu đã công bố 3 bài báo, bao gồm: 2 bài về sự tạo chồi và phôi soma đăng trên tạp chí “Plant Cell, Tissue and Organ Culture” và 1 bài về sự ra hoa và tạo quả đăng trên tạp chí “Scientia Horticulturae”. Trong hai bài báo liên quan đến sự tạo chồi và phôi, có một phần nội dung bài báo là thuộc nội dung luận án. Trong bài báo về sự ra hoa và tạo quả, hầu hết nội dung bài báo đều thuộc nội dung luận án. Cả 2 tạp chí mà nghiên cứu sinh chọn đăng đều là tạp chí có uy tín, thuộc danh mục SCIE (Q1), được công nhận bởi Hội đồng học hàm.

8. Kết luận chung:

Luận án đáp ứng các yêu cầu về hình thức và nội dung của một luận án tiến sĩ, ngoại trừ một số điểm chưa hoàn thiện như đã được trình bày ở mục 6. Đề nghị cho phép nghiên cứu sinh được bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện.

Tp. HCM, ngày 26 tháng 7 năm 2024

Người viết nhận xét



Trần Thanh Hương

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Trương Thị Bích Phượng

Học hàm, học vị: PGS.TS.

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Hoài Phong

Tên đề tài 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*

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ra hoa và tạo quả là bước chuyển hoá quan trọng trong đời sống thực vật. Sự hình thành hoa là dấu hiệu của việc chuyển tiếp cây từ giai đoạn sinh trưởng phát triển dinh dưỡng sang giai đoạn sinh trưởng phát triển sinh sản (sinh trưởng sinh thực). Các kiến thức về sự ra hoa và tạo quả cung cấp 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. Hệ thống ra hoa *in vitro* là được coi là công cụ thuận tiện để nghiên cứu cảm ứng ra hoa và sự phát triển các cơ quan hoa.

Chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) là một loại cây trồng thương mại quan trọng. Nghiên cứu Ra hoa và tạo quả *in vitro* cây chanh dây tím sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng trong nghiên cứu sinh lý và công tác chọn tạo giống cây trồng trên đối tượng cây trồng này.

Đề tài vì vậy mà có ý nghĩa về lý luận khoa học đồng thời có giá trị thực tiễn cấp thiết.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đã có một số nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây chanh dây tím, nhưng nghiên cứu của tác giả là công bố đầu tiên về ra hoa và bước đầu tạo quả chanh dây tím từ chồi có nguồn gốc khác nhau. Đề tài không trùng lặp với các công trình đã công bố.

Các tài liệu được trích dẫn rõ ràng, đầy đủ và trung thực

Phần tài liệu tham khảo (20 trang) gồm 196 tài liệu có 3 tài liệu tiếng Việt, 193 tài liệu tiếng Anh, trong đó 70/196 tài liệu (35,71%) được xuất bản từ năm 2019 đến nay. Các tài liệu trình bày theo quy định, nội dung phù hợp với nội dung

nghiên cứu của đề tài. Tài liệu được trích dẫn chính xác, rõ ràng và theo quy định. Các trích dẫn trong luận án đầy đủ và theo quy định.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Các nội dung thực hiện của đề tài phù hợp với chuyên ngành và mã số của chuyên ngành Sinh lý học thực vật.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Trên đối tượng cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sim f. *edulis*) 6 tháng tuổi thu tại vườn ươm Viện Nghiên cứu Khoa học Tây nguyên, tác giả đã sử dụng các phương pháp: Phương pháp bố trí thí nghiệm Tạo nguồn mẫu cây chanh dây tím, 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*, Phương pháp xác định chỉ số diệp lục, Phân tích hormone nội sinh bằng HPLC, Phương pháp định lượng ethylene bằng sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa, Phương pháp quan sát giải phẫu hình thái mô tạo chồi và tạo hoa, phương pháp theo dõi thí nghiệm, đánh giá các chỉ tiêu của các thí nghiệm. Số liệu được xử lý thống kê đảm bảo độ tin cậy.

Các phương pháp tác giả sử dụng để nghiên cứu là các phương pháp đã được nhiều tác giả trong và ngoài nước thực hiện cho các nghiên cứu tương tự cho các nghiên cứu theo hướng này. Các phương pháp nghiên cứu phù hợp cho thực hiện các nội dung nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Về hình thức luận án:

Luận án được trình bày trong 124 trang và 3 trang phụ lục, gồm 5 phần: Mở đầu (3 trang), Tổng quan nghiên cứu (31 trang), Nội dung, Vật liệu và Phương pháp nghiên cứu (14 trang), Kết quả và thảo luận (55 trang), Kết luận và kiến nghị (2 trang). Phần tài liệu tham khảo (20 trang). Tác giả đã sử dụng 11 bảng, 33 hình, rõ, đẹp ở phần kết quả được chú thích đầy đủ rõ ràng để biện luận và minh họa cho nghiên cứu của tác giả. Nhìn chung, bố cục luận án cân đối, các phần của luận văn được trình bày rõ ràng, mạch lạc, theo đúng quy định. Các hình, bảng được chú thích theo đúng quy định. Qua đó cho thấy hình thức luận án đáp ứng yêu cầu theo quy định. Kết quả thu được cho thấy tác giả đã thực hiện các nội dung đáp ứng mục tiêu đặt ra của đề tài.

Về Nội dung luận án:

Trên nguồn nguyên liệu là mẫu lá và lóng thân cây chanh dây tím, tác giả đã tiến hành nghiên cứu tạo nguồn mẫu cấy và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

Mở đầu: tác giả giới thiệu sự cần thiết nghiên cứu ra hoa và tạo quả *in vitro*.

Tổng quan tài liệu: Trình bày tổng quan đầy đủ các công bố trong và ngoài nước liên quan với nội dung nghiên cứu của đề tài, gồm: Giới thiệu về cây chanh dây và các nghiên cứu chanh dây tím trong điều kiện *in vitro*; Sự ra hoa và ra hoa *in vitro* ở thực vật; Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự ra hoa ở Thực vật; Một số nghiên cứu ra hoa và tạo quả *in vitro*. Phần tổng quan các vấn đề nghiên cứu của tác giả là cơ sở cho tác giả thực hiện có kết quả nghiên cứu của mình.

Về vật liệu và phương pháp nghiên cứu: Vật liệu nghiên cứu là mẫu lá và lóng thân cây chanh dây tím. Các phương pháp tác giả sử dụng để nghiên cứu là các phương pháp đã được nhiều tác giả trong và ngoài nước thực hiện cho các nghiên cứu tương tự và đó cũng là các phương pháp kinh điển cho các nghiên cứu theo hướng này.

Kết quả nghiên cứu: Qua quá trình nghiên cứu, tác giả đã thu được các kết quả trình bày trong 2 phần có liên hệ mật thiết nhau: nghiên cứu tạo nguồn mẫu cấy và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ra hoa và bước đầu tạo quả của chanh dây tím trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

Kết quả nghiên cứu tác giả đã cho thấy AgNP có tác dụng tăng cường tái sinh chồi từ mẫu cấy ITCL (87,67%) và oTCL (100%). Chồi *in vitro* thu được từ mẫu oTCL được sử dụng để nhân chồi. Việc xử lý với 1,0 mg/L meta-topolin (mT) và 5 mg/L AgNP đã nâng cao khả năng nhân chồi với số lượng chồi cao nhất (13,67 chồi/mẫu), chiều cao chồi (4,33 cm) và chỉ số SPAD (33,93 nmol/cm²). Về cảm ứng ra hoa, chồi ngọn nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 7 mg/L AgNP cho tỷ lệ ra hoa (51,72%) và số hoa/chồi (2,33 hoa) cao nhất sau 60 ngày nuôi cấy. Các chồi nuôi cấy trong môi trường bổ sung 7 mg/L AgNP cho thấy nồng độ hormone nội sinh GA₃, ABA và melatonin thấp hơn đáng kể so với đối chứng. Ở nghiệm thức với 7 mg/L AgNP, tỷ lệ nở hoa là 100% và đường kính hoa lớn nhất đạt 3,43 cm. Hoa phát triển *in vitro* tự thụ tinh và hình thành quả. Môi trường bổ sung 7 mg/L AgNP cho tỷ lệ đậu quả cao nhất là 56,79%, với số quả là 1,67 quả, đường kính quả đạt 1,13 cm sau 90 ngày nuôi. Các chồi chớm ra hoa, tỷ lệ ra hoa và số hoa giảm trên môi trường bổ sung spermidine kết hợp AgNPs, tuy nhiên lại cho cấu trúc chồi hoa gần với cấu trúc chồi hoa ngoài tự nhiên và tác động tích cực đến khả năng hình thành quả non. Môi trường bổ sung ABA, GA₃ và AgNO₃ không có sự hình

thành hoa *in vitro*.

Những phát hiện này mở đường cho nghiên cứu sâu hơn về cơ chế ra hoa và đậu quả trong nuôi cấy *in vitro*, cũng như cải thiện quá trình nhân giống hiệu quả của loại cây này.

Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã thành công trong xác định ảnh hưởng của một số yếu tố gồm chất điều hòa sinh trưởng (acid gibberellic, acid abscisic), AgNO_3 , nano bạc, nano coban và spermidin đến sự sinh trưởng, ra hoa và bước đầu tạo quả *in vitro* chanh dây tím.

Qua kết quả thu được cho thấy tác giả đã thực hiện một khối lượng công việc lớn và kết quả thu được có ý nghĩa về mặt lý luận và có khả năng ứng dụng vào thực tiễn

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Từ các kết quả nghiên cứu của mình tác giả đã rút ra các kết luận tổng kết đầy đủ các nội dung nghiên cứu của đề tài, đáp ứng được mục tiêu nghiên cứu.

Ưu điểm: Mục tiêu và nội dung nghiên cứu phù hợp với tên đề tài luận án và chuyên ngành Sinh lý học thực vật. Kết quả nghiên cứu phong phú, sự sắp xếp các phần cân đối, hợp lý, số liệu đáng tin cậy. Phần kết luận tổng kết được các nội dung nghiên cứu của đề tài. Các kết quả luận án đạt được là rất lớn, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, dung lượng đảm bảo. Kết quả của đề tài cung cấp cơ sở cho nghiên cứu cơ bản và ứng dụng hệ thống ra hoa *in vitro* trong nghiên cứu sinh lý và công tác chọn tạo giống cây trồng và có thể ứng dụng cho nghiên cứu ra hoa và tạo quả *in vitro* trên các đối tượng cây trồng khác. Về hình thức, luận án ít lỗi chính tả, các hình vẽ mô tả rõ và đẹp. Hình thức và Nội dung luận án đáp ứng yêu cầu của luận án Tiến sĩ.

Những hạn chế của luận án:

- Phương pháp xử lý số liệu: Nên cụ thể về loại test và có cách kiểm tra các giả định của test cho từng thí nghiệm.

- Bổ sung theo dõi chỉ tiêu “chiều cao chồi” (trang 40) ở phương pháp đánh giá “Ảnh hưởng AgNPs đến sự tái sinh chồi từ mẫu cây TCL” phù hợp với số liệu phân kết quả (trang 53)

- Phần kết quả:

+ Bổ sung trình bày sai số trên các Bảng để thống nhất với trình bày sai số trên hình trong Luận án

+ Phù hợp các phép Test kiểm định trong phân tích thống kê giữa luận án và các bài báo đã công bố (Bảng 3.1. trang 53; Bảng 3.7 trang 82, Hình 3.14 của Luận án)

- Kết quả xác định hàm lượng diệp lục tổng số (Bảng 2, Hình 3, Bài báo)/chỉ số SPAD (Hình 3.10 trang 62, Bảng 3.6 trang 71,...)?

- Kiểm tra các sai số của các nghiệm thức Hình 3.7. (trang 58), Hình 3.9 (trang 59)

- Số liệu của Bài báo và Luận án: Bảng 3.6 (trang 71), Bảng 3.7 (trang 82) và Hình 3.18 (trang 78)?

- Về hình thức: Viết nghiêng tên khoa học Loài (Tài liệu 128)

- Thống nhất viết nghiên thuật ngữ “*in vitro*” (trang 105, 110, 122)

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Ba công trình đã công bố của NCS năm 2022 và 2023 trên các tạp chí uy tín quốc tế, trong đó có 2 bài đăng ở TC PCTOC (Q1) và 1 bài đăng ở Scientia Horticulturae (Q1). Các bài báo có tên và nội dung phù hợp với kết quả đề tài của luận án. Các bài báo công bố trong khoảng thời gian thực hiện luận án.

8. Kết luận chung

Luận án của NCS. Trương Hoài Phong có nội dung tốt, các kết quả luận án đạt được là rất lớn, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, dung lượng đảm bảo cho một luận án tiến sĩ. Đề tài không trùng lặp với các luận án đã công bố, đúng mã số chuyên ngành. Nội dung và hình thức của luận án đã đáp ứng các yêu cầu của một luận án tiến sĩ nêu ở Quy chế đào tạo Sau đại học, bản tóm tắt luận án phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án. Luận án đủ điều kiện đưa ra bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Học viện để NCS nhận học vị Tiến sĩ.

....., ngày 28 tháng 7 năm 2024

Người viết nhận xét



Trương Thị Bích Phượng

Lâm Đồng, ngày 24 tháng 08 năm 2024

QUYẾT NGHỊ CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên nghiên cứu sinh: **Trương Hoài Phong**

Về 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*”

Chuyên ngành: Sinh lý học thực vật, Mã số: 9 42 01 12

Người hướng dẫn: 1. GS.TS. Dương Tấn Nhật

- Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Nguyễn Bá Nam

- Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo

Số thành viên Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện có mặt: 7/7

Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện của NCS. Trương Hoài Phong đã họp từ 8 giờ 30 đến 12 giờ 10 tại Phòng họp tầng 1, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường 7, Đà Lạt, Lâm Đồng

Sau khi nghe nghiên cứu sinh Trương Hoài Phong trình bày nội dung luận án trong thời gian 30 phút, Hội đồng đã nghe các phản biện phát biểu nhận xét luận án, nghe thư ký Hội đồng đọc bản tổng hợp các ý kiến nhận xét luận án của các thành viên khác trong Hội đồng và nhận xét tóm tắt luận án của các nhà khoa học gửi đến. Hội đồng đã tiến hành thảo luận chung tại Hội trường, sau đó Hội đồng đã họp riêng và nhất trí quyết nghị như sau:

1. Kết quả bỏ phiếu đánh giá luận án của Hội đồng: 7/7 phiếu tán thành, trong đó số phiếu xếp loại xuất sắc là 05
2. Những kết luận khoa học cơ bản, những điểm mới, đóng góp mới của luận án: Luận án có tính mới, các nội dung nghiên cứu của luận án chưa được nghiên cứu trước đó, cụ thể:
 - Nano bạc ở nồng độ thích hợp đã tăng cường hiệu quả tái sinh và nhân nhanh chồi từ mẫu cây lớp mỏng lông thân. Sự phát sinh phôi sinh dưỡng thông qua mô sẹo được cải thiện khi bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy có 2,4-D
 - AgNPs còn giúp kích thích sự ra hoa trên các chồi *in vitro*. Sự kết hợp AgNPs và spermidine làm chậm sự ra hoa, tỷ lệ ra hoa và số hoa giảm so với môi trường chỉ bổ sung AgNPs. Tuy vậy, sự bổ sung của spermidine làm cho chồi hoa phát triển có cấu trúc gần giống với cấu trúc hoa tự nhiên
3. Cơ sở khoa học, độ tin cậy của những luận điểm và những kết luận nêu trong luận án: Các phương pháp nghiên cứu sử dụng trong luận án là thường quy phù hợp chuyên ngành, các kết quả nghiên cứu của luận án là có cơ sở khoa học, không trùng lặp với các nghiên cứu trước đó và có độ tin cậy cao.



4. Ý nghĩa về lý luận, thực tiễn và những đề nghị sử dụng các kết quả nghiên cứu của luận án: Kết quả nghiên cứu của luận án không chỉ có ý nghĩa về mặt lý luận mà còn có thể ứng dụng trong vi nhân giống, chọn tạo giống cây trồng và ứng dụng trong trồng trọt để điều chỉnh quá trình ra hoa tạo quả, cũng như làm nền tảng cho các nghiên cứu về sinh lý học thực vật. Bên cạnh đó đây là tài liệu có giá trị trong giảng dạy và nghiên cứu trong lĩnh vực sinh lý học thực vật và các lĩnh vực liên quan
5. Những thiếu sót về nội dung và hình thức của luận án: Nội dung và hình thức phù hợp, tuy nhiên vẫn còn một số các thiếu sót cần chỉnh sửa và hoàn thiện theo nội dung góp ý của các thành viên trong hội đồng (theo như bản nhận xét).
6. Mức độ đáp ứng các yêu cầu của luận án: Nội dung nghiên cứu đáp ứng yêu cầu của luận án tiến sĩ
7. Những điểm cần bổ sung, sửa chữa (nếu có) trước khi nộp luận án cho Thư viện Quốc gia Việt Nam:
 - Rà soát, chỉnh sửa theo các ý kiến góp ý của các thành viên trong Hội đồng
 - Kết luận cần bám sát theo mục tiêu thể hiện kết quả đã đạt được.
8. Kết luận:
 - Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án Tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý học thực vật
 - Bản tóm tắt của luận án phản ánh trung thành các nội dung cơ bản của luận án
 - Nghiên cứu sinh Trương Hoài Phong xứng đáng nhận học vị Tiến sĩ Sinh lý học thực vật.

Căn cứ kết quả bỏ phiếu, Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đề nghị cấp học vị Tiến sĩ Sinh lý học thực vật cho nghiên cứu sinh Trương Hoài Phong.



THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

TS. Nguyễn Văn Bình

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

Lâm Đồng, ngày 24 tháng 08 năm 2024

BIÊN BẢN HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Nghiên cứu sinh: **Trương Hoài Phong**

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*”

Chuyên ngành: Sinh lý học thực vật, Mã số: 9 42 01 12

Người hướng dẫn: 1. GS.TS. Dương Tấn Nhựt

- Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Nguyễn Bá Nam

- Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo

Quyết định thành lập Hội đồng số: 846/QĐ-HVKHCN ngày 04/07/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ.

Thời gian họp:

Địa điểm: Phòng họp tầng 1, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, Đà Lạt, Lâm Đồng

NỘI DUNG

1. Từ 8 giờ 30 đến 9 giờ 00:

- Đại diện cơ sở đào tạo tuyên bố lý do, đọc Quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận án cấp Học viện. Đề nghị Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi họp.

- Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi họp:

+ Tuyên bố số thành viên Hội đồng có mặt: 07/7 (có danh sách kèm theo)

+ Số khách mời tham dự buổi bảo vệ: 10 người

+ Thư ký hội đồng đọc lý lịch khoa học và kết quả học tập của nghiên cứu sinh

2. Từ 9 giờ 00 đến 9 giờ 30:

- Nghiên cứu sinh **Trương Hoài Phong** trình bày nội dung luận án.

3. Từ 9 giờ 30 đến 11 giờ 30:

- Phản biện 1: PGS. TS. Nguyễn Du Sanh, đọc nhận xét luận án, nêu lên giá trị của nghiên cứu và điểm mới của luận án cũng như các ưu nhược điểm và những điều cần chỉnh sửa bổ sung (kèm theo toàn văn nhận xét).

- Phản biện 2: PGS. TS. Nguyễn Vũ Phong, đọc nhận xét luận án, nhất trí với ý kiến của phản biện 1 (PGS. TS. Nguyễn Du Sanh) về giá trị của nghiên cứu, những điểm mới của luận án, nêu lên các ưu nhược điểm và những điều cần chỉnh sửa bổ sung (kèm theo toàn văn nhận xét).



- Phản biện 3: PGS. TS. Hoàng Thị Kim Hồng, tán đồng với ý kiến của 2 phản biện trước, Nghiên cứu sinh có 3 công bố trên 2 tạp chí quốc tế uy tín do đó đây là nghiên cứu rất xuất sắc. Đọc nhận xét luận án, nêu các ưu nhược điểm và những điều cần chỉnh sửa bổ sung (kèm theo toàn văn nhận xét).

Các câu hỏi của thành viên Hội đồng và câu trả lời của nghiên cứu sinh: (ghi rõ họ tên, học vị, chức danh khoa học của người hỏi)

Câu hỏi:

1. PGS. TS. Nguyễn Du Sanh:

- Vai trò của AgNPs trong quá trình tạo hoa và tạo quả ở cây chanh dây tím *in vitro*?
- Vai trò của spermidine trong sự tạo hoa, tạo quả ở cây chanh dây tím *in vitro*?
- Theo tác giả sự ra hoa ở cây chanh dây tím *in vitro* do yếu tố nào quyết định?

2. PGS. TS. Nguyễn Vũ Phong:

- Giải thích thêm vì sao mẫu lớp mỏng oTCL loại bỏ lỗi tại sao lại tốt hơn?
- Tại sao không khảo nghiệm vai trò của các chất khoáng?

3. PGS. TS. Hoàng Thị Kim Hồng

- Sắc tố tím của hoa *in vitro* và ngoài tự nhiên có giống nhau?
- Hoa nuôi cấy *in vitro* quá trình sinh lý có khác cây tự nhiên?

Trả lời của nghiên cứu sinh Trương Hoài Phong đối với phản biện:

Nghiên cứu sinh cảm ơn và tiếp nhận các ý kiến đóng góp của hội đồng, sẽ nghiêm túc chỉnh sửa theo góp ý.

1. Cũng có nhiều yếu tố liên quan đến ra hoa, tuy nhiên NCS chọn lựa vài yếu tố trong đó để nghiên cứu dựa trên các tài liệu tham khảo và các nghiên cứu trước đó.

- NCS chỉ mới ghi nhận được ảnh hưởng chứ chưa dám khẳng định vai trò của AgNPs đối với sự ra hoa. AgNPs với kích thước nano nên ngoài các thuận lợi trong tương tác hoá học cũng như có vai trò về tác nhân vật lý.

- Spd có rất nhiều vai trò trong các quá trình, ra hoa và tạo quả, và tác động ở các thời điểm cụ thể, trong phạm vi này thì NCS xem xét ảnh hưởng của nó đến sự phát triển của hoa như là yếu tố kích thích sự phát triển của cơ quan hoa.

- Hiện tại nghiên cứu chỉ dừng lại ở mức độ đánh giá ban đầu các yếu tố ảnh hưởng nên chưa thể kết luận được yếu tố quyết định đến sự ra hoa và tạo quả *in vitro*.

2. Các câu hỏi của Thầy Phong NCS cũng trả lời lồng ghép trước đó.

- Giải thích thêm vì sao mẫu lớp mỏng oTCL loại bỏ lỗi tại sao lại tốt hơn?

Việc loại bỏ phần mô khó tái sinh có thể tăng cường sự tiếp xúc của các phần mô dễ tái sinh với yếu tố kích thích, từ đó tăng cường khả năng tái sinh.

- Tại sao không khảo nghiệm vai trò của các chất khoáng?

100
VIỆN
100
NGI
*

Trong các nghiên cứu trước, việc khảo sát sự thay đổi của các chất khoáng đã được khảo sát, do đó trong nghiên cứu này, NCS ưu tiên thực hiện với các nhóm yếu tố khác.

3. PGS. TS. Hoàng Thị Kim Hồng

- Sự tích lũy sắc tố tím của hoa *in vitro* và ngoài tự nhiên có giống nhau không?

Qua quan sát có thể thấy rằng sắc tố tím của hoa *in vitro* có suy giảm so với điều kiện tự nhiên, sắc tố chủ yếu tập trung ở các vòng tua và cánh hoa.

- Quá trình sinh lý ra hoa *in vitro* có khác với cây tự nhiên?

Quá trình ra hoa *in vitro* mang một số đặc điểm khác biệt so với hoa *ex vitro*, chẳng hạn như cấu trúc cơ quan hoa, cấu trúc chồi hoa, tuy nhiên, hiện tại chưa thể so sánh một cách chính xác các yếu tố sinh lý giữa hai quá trình.

Ý kiến nhận xét từ các thành viên khác của hội đồng:

+ PGS. TS. Trần Thanh Hương, nhất trí với các ý kiến nhận xét từ 3 thành viên phản biện, đánh giá rất cao về các công bố của NCS. Đọc bản nhận xét của luận án, nêu lên các ưu nhược điểm và những điểm còn hạn chế cần sửa chữa và làm rõ (kèm theo toàn văn nhận xét).

Câu hỏi: Cơ sở để tiến hành bố trí thí nghiệm về ABA?

+ PGS. TS. Trương Thị Bích Phượng, nhất trí với ý kiến nhận xét của các thành viên hội đồng đã nhận xét, đây là một luận án thể hiện cả về số lượng và chất lượng trong nội dung nghiên cứu. Đọc bản nhận xét luận án, nêu lên các ưu nhược điểm và một số điểm cần bổ sung, chỉnh sửa (kèm theo toàn văn nhận xét).

Câu hỏi: Giải thích thêm về hiện tượng bất thụ của cây chanh tím?

+ GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng, đây là một luận án rất hay về sự tạo hoa và quả, có tính mới và ý nghĩa thực tiễn rất cao. Đọc nhận xét và nêu lên các điểm mạnh, các đóng góp có giá trị của luận án đối với khoa học.

Câu hỏi: Yếu tố nào ảnh hưởng, gây nên sự bất thụ cho sự ra hoa chanh dây tím?

+ TS. Nguyễn Văn Bình, đọc nhận xét và nêu lên các ưu nhược điểm cũng như một số lỗi cần chỉnh sửa để luận án được hoàn thiện hơn (kèm theo toàn văn nhận xét).

Trả lời của nghiên cứu sinh Trương Hoài Phong đối với các thành viên khác:

+ NCS tiếp thu, chỉnh sửa và sẽ làm rõ theo các ý kiến đóng góp của các thành viên của hội đồng

+ Trong tự nhiên, đối với một số chanh dây tím có sự bất tương hợp không hoàn toàn, một số cây có thể tự thụ với tỉ lệ thấp.

+ Một số yếu tố có thể ảnh hưởng đến sự bất thụ của quá trình ra hoa trong điều kiện *in vitro* chẳng hạn thay đổi hàm lượng hormone nội sinh, tuổi và giai đoạn phát triển của mô thực vật.

+ Cây chanh dây tím ra hoa phụ thuộc đáng kể vào độ tuổi, do đó đề tài tiến hành bố trí thí nghiệm về ABA để kỳ vọng các tác động đến một số con đường liên quan đến độ tuổi, từ đó kích thích sự ra hoa.

Ý kiến của Giáo viên hướng dẫn:

GS. TS. Dương Tấn Nhựt: cảm ơn các ý kiến đóng góp của các thành viên hội đồng, nghiên cứu sinh cần tiếp thu và chỉnh sửa một cách nghiêm túc.

4. Từ 11 giờ 30 đến 11 giờ 40: Nghỉ giải lao

5. Từ 11 giờ 40 đến 12 giờ 00: Họp hội đồng riêng

- Thông qua kết luận của Hội đồng (có văn bản kèm theo).
- Ghi phiếu nhận xét luận án.

Kết quả kiểm phiếu 7/7 thành viên tán thành và đề nghị Học viện cấp học vị Tiến sĩ Sinh lý học thực vật cho nghiên cứu sinh Trương Hoài Phong.

6. Từ 12 giờ 00 đến 12 giờ 10

- Chủ tịch Hội đồng đọc kết luận của hội đồng đánh giá luận án.
- Hội đồng kết thúc lúc 12 giờ 10 phút, Thứ bảy, ngày 24 tháng 8 năm 2024.

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG



TS. Nguyễn Văn Bình

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA, BỔ SUNG LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CẤP HỌC VIỆN**

Ngày 24 tháng 08 năm 2024, Học viện Khoa học và Công nghệ đã tổ chức đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Trương Hoài Phong theo Quyết định số 846/QĐ-HVKHCN ngày 04 tháng 07 năm 2024 của Giám đốc Học viện.

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*”

Ngành: Sinh lý học thực vật,

Mã số: 9 42 01 12

Người hướng dẫn khoa học: 1. GS.TS. Dương Tấn Nhựt

2. TS. Nguyễn Bá Nam

Theo Biên bản của Hội đồng, NCS phải bổ sung và chỉnh sửa luận án các điểm sau đây:

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, bổ sung	Nội dung đã được chỉnh sửa, bổ sung (Ghi rõ số trang/chương/mục... đã được chỉnh sửa)
Về nội dung luận án:		
1	Phần tổng quan về cây chanh dây tím nên bổ sung thêm một số kiến thức tổng quan về chu kỳ ra hoa, tạo hạt; thời gian ra hoa; đặc điểm ra hoa, tạo hạt của cây chanh dây tím trong điều kiện tự nhiên để có cơ sở khoa học trong phần thảo luận để so sánh với các kết quả đạt được về sự ra hoa và bước đầu tạo hạt trong nuôi cấy <i>in vitro</i> .	NCS đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng. Một số đặc điểm về chu kỳ ra hoa và tạo quả và hạt được bổ sung trong phần tổng quan nghiên cứu: “Ngoài điều kiện tự nhiên, chanh dây tím có khả năng ra hoa và tạo quả quanh năm. Đối với giống này, sự ra hoa và tạo quả được ghi nhận sau khi trải qua giai đoạn non nhất định, khoảng từ 6 đến 9 tháng hoặc có thể thay đổi tùy theo điều kiện trồng trọt. 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 tím không phụ thuộc lớn vào quang kỳ ngoài điều kiện

		<p>tự nhiên. 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...” (trang 33).</p>
2	<ul style="list-style-type: none"> - (1) Không nên sử dụng “Phương pháp bố trí thí nghiệm” - (2) mT (meta Topolin) tr.42 cần phải giới thiệu rõ hơn, có thảo luận để thuyết phục ở phần kết luận (tr.102). - (3) Các TN trong nội dung 1 cần ghi rõ và chi tiết hơn về sự kế thừa (không nên ghi chung chung: các thông số tối ưu từ thí nghiệm trước được chọn). Vật liệu từ chồi chanh dây ở ND 1 được chọn làm vật liệu tạo rễ dùng trong nội dung 2 cũng cần mô tả chi tiết hơn (tr.42); Phương pháp tiến hành ở TN 3.2 cũng cần mô tả chi tiết hơn (tr.45). - (4) Phương pháp xử lý số liệu: Nên cụ thể về loại test cho từng thí nghiệm. - (5) Bổ sung theo dõi chỉ tiêu “chiều cao chồi” (trang 40) ở phương pháp đánh giá “Ảnh hưởng AgNPs đến sự tái sinh chồi từ mẫu cây TCL” phù hợp với số liệu phân kết quả (trang 53). 	<p>NCS đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng</p> <ul style="list-style-type: none"> - (1) “Phương pháp bố trí thí nghiệm” đã được chỉnh sửa thành “Bố trí thí nghiệm” (trang 39). - (2) Vai trò của mT (meta Topolin) đã được giới thiệu và bổ sung: “Chen và cộng sự (2020) đã báo cáo rằng tại nồng độ 1,0 mg/L meta-Topolin (mT) thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi và cải thiện chất lượng chồi [91]. Trong thí nghiệm này, 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 mT và kết hợp với AgNPs ở các nồng độ khác nhau ...” (trang 42). - (3) Các thí nghiệm kế thừa trong nội dung 1 đã được mô tả rõ về nguồn vật liệu kế thừa và phương pháp tiến hành

	<ul style="list-style-type: none"> - (6) Hình 2.1 nên chuyển sang trang 35 ở vị trí trước khi trình bày các nội dung nghiên cứu để người đọc tiện theo dõi. - (7) Cần thống nhất sử dụng cụm từ “bước đầu tạo quả” hay “tạo quả” trong toàn bộ luận án. - (8) Cần xem lại cách trình bày tên thí nghiệm để khỏi bị trùng lặp giữa hai nội dung. 	<ul style="list-style-type: none"> (trang 39 - 45). - (4) Các loại test đã được bổ sung trong phần Phân tích xử lý số liệu (trang 48). - (5) Chỉ tiêu chiều cao chồi đã được bổ sung vào thí nghiệm tương ứng (trang 40). - (6) Hình 2.1 đã được chuyển lên phía trước theo góp ý (trang 35). - (7) Các từ ngữ liên quan đến tạo quả trong phần phương pháp đã được thống nhất thành “bước đầu tạo quả”. - (8) Các tên thí nghiệm đã được chỉnh sửa và đánh số theo góp ý của hội đồng.
3	<ul style="list-style-type: none"> - (1) Làm rõ các phép Test kiểm định trong phân tích thống kê giữa luận án và các bài báo đã công bố (Bảng 3.1. trang 53; Bảng 3.7 trang 82, Hình 3.14 của Luận án). Số liệu của Bài báo và Luận án: Bảng 3.6 (trang 71), Bảng 3.7 (trang 82) và Hình 3.18 (trang 78). - (2) Kiểm tra các sai số của các nghiệm thức Hình 3.7. (trang 58), Hình 3.9 (trang 59). - (3) Dựa vào sự hiện diện của tua cuống để kết luận việc kết hợp bổ sung AgNPs và spermidine cho cấu trúc chồi hoa gắn với cấu trúc chồi hoa ngoài tự nhiên (trang 96, 102) là chưa thuyết phục. - (4) Tiêu đề của mục 3.1.3 (trang 62) là “Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs đến quá trình nhân nhanh chồi”, nhưng lại thiết kế thí 	<ul style="list-style-type: none"> NCS đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng - (1) Các phép kiểm định thống kê đã được thống nhất trong tất các nghiệm thức. - (2) Sai số của các nghiệm thức hình 3.7 và 3.9 đã được trình bày lại theo góp ý (trang 58 - 59). - (3) NCS đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng, phần kết luận cấu trúc chồi hoa đã được chuyển thành sự hình thành chồi hoa có sự xuất hiện của tua cuốn (trang 96, 102). - (4) NCS đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng, nhận xét kết quả đã được chỉnh sửa cho phù hợp với bố trí thí nghiệm: “Môi trường MS bổ sung 1

	<p>th nghiệm có 2 yếu tố tác động là 1,0 mg/L mT và AgNPs ở các nồng độ khác nhau và dựa vào kết quả trình bày ở Hình 3.10 để kết luận “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 chồi của chanh dây tím”. Kết luận này là chưa chặt chẽ vì không đưa ra đối chứng so sánh (cải thiện đáng kể so với môi trường nào), ngoài ra do không có thí nghiệm thăm dò ảnh hưởng của AgNPs đơn lẻ trong môi trường không có 1,0 mg/L mT nên kết quả không rõ ràng do tác động đơn lẻ của AgNPs hay do tác động kết hợp của 1,0 mg/L mT với AgNPs.</p>	<p>mg/L mT và 3 mg/L AgNPs thích hợp để nhân nhanh chồi” (trang 62).</p>
4	<p>Phần Kết luận và kiến nghị nên viết cô đọng, với các từ ngữ mang tính khẳng định nghiên cứu đã tiến hành cho đúng với mục tiêu của luận án. Các kiến nghị nên được viết ngắn gọn, không cần diễn giải.</p>	<p>NCS đã chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng. Phần kết luận và kiến nghị được trình bày lại một cách ngắn gọn, phù hợp với mục tiêu nghiên cứu (trang 102 - 103).</p>
<p>Về hình thức luận án:</p>		
1	<p>Mục lục: Mở đầu không cần thiết phải viết toàn bộ tên các mục tại phần mở đầu (Không có ý nghĩa nhiều về thông tin vì quá ngắn và phần này mang tính giới thiệu).</p>	<p>NCS đã chỉnh sửa theo góp ý và nhận xét của hội đồng.</p>
2	<p>Tiên đề danh mục vii nên viết lại bỏ chữ “ký”.</p>	<p>NCS đã chỉnh sửa theo góp ý và nhận xét của hội đồng.</p>
3	<p>Trong phần tổng quan nhiều từ viết chuyên môn không nên viết hoa trong câu vì không phải đầu câu tại trang 7, 8, 9.</p>	<p>NCS đã chỉnh sửa theo góp ý và nhận xét của hội đồng.</p>
4	<p>Viết nghiêng tên khoa học Loài (Tài liệu 128). Thống nhất viết nghiêng thuật ngữ “<i>in vitro</i>”.</p>	<p>NCS đã chỉnh sửa theo góp ý và nhận xét của hội đồng. Thuật ngữ “<i>in vitro</i>” đã được viết nghiêng trong toàn bộ luận án.</p>

5	NCS cần viết đầy đủ tên của từ hoặc cụm từ đó trước khi dùng dạng viết tắt và từ đó về sau chỉ sử dụng chữ viết tắt đó trong toàn luận án mà không sử dụng lặp lại tên đầy đủ của từ hoặc cụm từ đã được viết tắt này (PA, PGR,...).	NCS đã chỉnh sửa theo góp ý và nhận xét của hội đồng trong toàn bộ luận án.
6	Trong luận án còn lỗi chính tả và lỗi đánh máy rải rác.	NCS đã rà soát và chỉnh sửa các lỗi chính tả, lỗi đánh máy và lỗi định dạng trong toàn bộ nội dung của luận án.

Nghiên cứu sinh chân thành cảm ơn Quý thầy, cô trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đã góp ý và tạo cơ hội cho NCS hoàn thiện luận án của mình.

Xin trân trọng cảm ơn./.

Hà Nội, ngày 29 tháng 8 năm 2024

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

NGHIÊN CỨU SINH




GS.TS. Dương Tấn Nhựt TS. Nguyễn Bá Nam

Trương Hoài Phong

**XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**




GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng

Nguyễn Thị Trung

