

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Như Mai

**NGHIÊN CỨU MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA HORMONE VÀ
KHẢ NĂNG PHÁT SINH HÌNH THÁI THÔNG QUA
KỸ THUẬT NUÔI CÂY LỚP MỎNG TẾ BÀO TRÊN CÂY
CHANH DÂY, ĐỒNG TIỀN VÀ DIỆP HẠ CHÂU**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội - 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: GS.TS. Dương Tấn Nhựt, Viện Khoa học sự sống
2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Hoàng Thanh Tùng, Trường Đại học Đà Lạt

Phản biện 1: PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng

Phản biện 2: PGS.TS. Phạm Bích Ngọc

Phản biện 3: PGS.TS. Trần Thanh Hương

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Phát sinh hình thái là một quá trình sinh học phức tạp, đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của thực vật và có ý nghĩa đặc biệt trong lĩnh vực nuôi cấy mô *in vitro*. Trong bối cảnh ứng dụng công nghệ sinh học ngày càng mở rộng vào nông nghiệp, dược liệu và hoa kiểng, việc làm chủ cơ chế phát sinh hình thái sẽ góp phần nâng cao hiệu quả nhân giống, chọn tạo giống mới và sản xuất cây trồng quy mô lớn trong điều kiện kiểm soát. Một trong những yếu tố then chốt điều khiển quá trình này là hormone nội sinh – các chất điều hòa sinh trưởng có vai trò điều tiết sự phân chia, kéo dài và biệt hóa tế bào thực vật. Tuy nhiên, sự tương tác phức tạp giữa các hormone và ảnh hưởng của chúng đến từng giai đoạn phát sinh cơ quan vẫn còn nhiều điều chưa được làm rõ, đặc biệt trên các loài cây trồng có giá trị kinh tế cao.

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin Cell Layer – TCL) được phát triển nhằm nâng cao hiệu quả tái sinh và giảm thiểu biến dị trong nuôi cấy mô. Ưu điểm của TCL là sử dụng mẫu cấy với số lượng tế bào hạn chế, có tính đồng nhất cao, từ đó giúp phân tích rõ ràng hơn sự ảnh hưởng của các yếu tố sinh lý như hormone nội sinh. Phương pháp này đã được ứng dụng trên một số loài thực vật như lan, cây thuốc và cây rau, nhưng vẫn chưa được khai thác đầy đủ trên các nhóm cây trồng khác như cây ăn trái, cây hoa cắt cành hay cây dược liệu.

Hormone thực vật (phytohormones) như auxin, cytokinin, gibberellin, ethylene và acid abscisic đóng vai trò quan trọng từ giai đoạn hình thành phôi đến già hóa cây. Các hormone này không hoạt động độc lập mà thường tương tác với nhau, có thể kích thích hoặc ức chế sự phát triển. Ngoài hormone nội sinh, chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs), các hợp chất hóa học tổng hợp, cũng được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô để thúc đẩy các quá trình như tạo mô sẹo, hình thành phôi, tái sinh chồi, tạo rễ, và ra hoa. Tuy nhiên, hiệu quả của PGRs phụ thuộc vào sự tương tác tích cực với hormone nội sinh, đòi hỏi phải làm rõ mối quan hệ phức tạp giữa chúng để đảm bảo cây phát triển khỏe mạnh.

Xuất phát từ thực tiễn đó, luận án "*Nghiên cứu mối tương quan giữa hormone và khả năng phát sinh hình thái thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào trên cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu*" được thực hiện với mục tiêu phân tích mối quan hệ giữa sự biến động hàm lượng hormone nội sinh và khả năng phát sinh hình thái *in vitro* trên ba loài thực vật tiêu biểu.

Mục tiêu của đề tài: Xác định mối tương quan giữa hàm lượng hormone nội sinh và khả năng phát sinh hình thái thông qua kỹ thuật nuôi cấy TCL trên cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu.

Đối tượng nghiên cứu: Mối tương quan giữa hormone nội sinh (IAA, CKs, GA₃, ABA, SA, JA, MEL và ET) và khả năng phát sinh hình thái thông qua hệ thống nuôi cấy TCL ở cây chanh dây, hoa đồng tiền và diệp hạ châu.

Những đóng góp mới của luận án: Nghiên cứu này lần đầu tiên áp dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL để đánh giá một cách hệ thống mối tương quan giữa hormone nội sinh, ethylene và hoạt tính hệ thống chống oxy hóa với quá trình phát sinh hình thái (chồi bất định, phôi soma, mô sẹo và rễ bất định) ở ba nhóm cây trồng có giá trị sinh học và kinh tế khác nhau bao gồm cây ăn trái (chanh dây), cây hoa cắt cành (hoa đồng tiền) và cây dược liệu (diệp hạ châu). Trong phạm vi nghiên cứu, luận án đã cung cấp một số dữ liệu khoa học mang tính mới nhất định:

Cấu trúc của luận án: Luận án bao gồm 5 phần chính: Phần *Mở đầu*, Chương 1: *Tổng quan nghiên cứu (24 trang)*, Chương 2: *Nội dung, vật liệu và phương pháp nghiên cứu (15 trang)*, Chương 3: *Kết quả và thảo luận (62 trang)* và phần *Kết luận và kiến nghị (2 trang)*.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Phát sinh hình thái của thực vật

Phát sinh hình thái là quá trình sinh học cơ bản, phản ánh sự hình thành và biệt hóa các cấu trúc của thực vật trong suốt quá trình phát triển, thông qua sự tổ chức và tái tổ chức của tế bào, mô và cơ quan dưới sự chi phối của tiềm năng di truyền và các tín hiệu sinh lý nội tại. Trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, khả năng tái sinh toàn cây chủ yếu diễn ra theo hai con đường là phát sinh cơ quan mới và phát sinh phôi soma, đều dựa trên tính toàn năng của tế bào soma và chịu sự điều hòa của hormone nội sinh, đặc biệt là mối tương quan giữa auxin và cytokinin. Tái sinh có thể diễn ra trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua mô sẹo, là tập hợp các tế bào tăng sinh chưa tổ chức, vẫn duy trì tiềm năng tái sinh các cơ quan hoặc phôi soma tùy theo điều kiện sinh lý và môi trường nuôi cấy. Quá trình phát sinh hình thái *in vitro* chịu ảnh hưởng của kiểu gene, nguồn mẫu cây, điều kiện nuôi cấy và tín hiệu vết thương, do đó nuôi cấy *in vitro* là công cụ hiệu quả để nghiên cứu cơ chế phát sinh hình thái của thực vật trong điều kiện kiểm soát.

1.2. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin Cell Layer – TCL) là một công cụ hiệu quả để nghiên cứu cơ chế phát sinh hình thái *in vitro* do sử dụng mẫu cấy có kích thước nhỏ, cấu trúc mô đơn giản và tính đồng nhất cao. Đặc điểm này giúp giảm sự can nhiễu sinh lý giữa các loại mô khác nhau, qua đó làm nổi bật vai trò điều hòa của hormone nội sinh trong từng con đường phát sinh hình thái cụ thể như tái sinh chồi bất định, hình thành phôi soma, phát sinh mô sẹo và rễ bất định. Thông qua kỹ thuật TCL, mối tương quan giữa sự biến động hormone nội sinh và khả năng phát sinh hình thái có thể được phân tích rõ ràng hơn, góp phần làm sáng tỏ cơ chế điều hòa hormone đặc trưng cho từng đối tượng thực vật và từng quá trình phát sinh hình thái.

1.3. Hormone nội sinh thực vật

1.3.1. Khái niệm

1.3.2. Hoạt động của hormone nội sinh

1.3.3. Sự tương tác của hormone nội sinh trong thực vật

Hormone nội sinh thực vật là các chất hóa học hoạt động ở nồng độ rất thấp, có vai trò điều hòa sự sinh trưởng, phát triển và biệt hóa của tế bào và mô. Không giống động vật, thực vật không có tuyến chuyên biệt để sản xuất và lưu trữ hormone, do đó hormone thường được sinh tổng hợp phân tán, sử dụng tại chỗ hoặc vận chuyển thụ động trong cơ thể thông qua dòng tế bào chất, khuếch tán giữa các tế bào và hệ mô mạch. Không phải tất cả các tế bào đều phản ứng với hormone, mà chỉ những tế bào được lập trình đáp ứng tại các giai đoạn và vị trí sinh lý nhất định. Thực vật có các cơ chế nội tại để điều hòa hàm lượng và tác động của hormone thông qua kiểm soát sinh tổng hợp, vận chuyển, dự trữ, bất hoạt hoặc phân hủy hormone khi không còn cần thiết. Do hormone nội sinh tồn tại ở nồng độ rất thấp (10^{-6} - 10^{-5} mol/L), việc nghiên cứu chúng gặp nhiều khó khăn và chỉ được phát triển mạnh từ cuối những năm 1970, chủ yếu thông qua các nghiên cứu di truyền và nuôi cấy thực vật *in vitro*.

1.4. Sơ lược về đối tượng nghiên cứu

1.4.1. Cây chanh dây

1.4.2. Cây hoa đồng tiền

1.4.3. Cây diệp hạ châu

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu chọn nguồn mẫu cây tối ưu cho quá trình phát sinh hình thái *in vitro* ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu.

Nội dung 2: Nghiên cứu mối tương quan của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái *in vitro* của thực vật.

Nội dung 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên sự tích lũy khí ethylene và hệ thống chống oxy hóa trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu thực vật

Nghiên cứu sử dụng các mẫu lóng thân *in vitro* của cây chanh dây, đế hoa *ex vitro* của cây hoa đồng tiền, và lóng thân *in vitro* của cây diệp hạ châu từ phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (nay là Viện Khoa học sự sống) làm vật liệu ban đầu.

Đối với nghiên cứu phân tích mối tương quan giữa hàm lượng hormone và quá trình phát sinh hình thái, bao gồm chồi tái sinh từ mẫu lóng thân và ITCL lóng thân cây chanh dây, phôi soma tái sinh từ mẫu đế hoa cây hoa đồng tiền, và mô sẹo, rễ bất định tái sinh từ mẫu lóng thân cây diệp hạ châu.

2.2.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

2.2.3. Môi trường nuôi cấy

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.3.1.1. *Nội dung 1:* Nghiên cứu chọn nguồn mẫu cây tối ưu cho quá trình phát sinh hình thái *in vitro* ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu

- Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí mẫu cây và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cây ban đầu lên khả năng tái sinh chồi của mẫu lóng

thân *in vitro* cây chanh dây: Các đoạn lóng thân (10 mm) của chồi *in vitro* cây chanh dây 2 tháng tuổi ở vị trí lóng thân từ 1 đến 4 (tính từ ngọn chồi) (được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi để so sánh khả năng tái sinh chồi tại các vị trí lóng thân khác nhau. Hàm lượng hormone nội sinh (CKs và IAA) có trong mẫu cấy ban đầu và tỷ lệ phát sinh hình thái (%) sau 60 ngày nuôi cấy được ghi nhận trong nghiên cứu này.

- Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tuổi để hoa và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng tái sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền nuôi cấy *in vitro*: Các đế hoa *ex vitro* của cây hoa đồng tiền ở ba giai đoạn phát triển khác nhau (nụ hoa, mở đài hoa, và tia hoa có màu) được khử trùng. Nghiên cứu cũng ghi nhận hàm lượng hormone nội sinh (CKs và IAA) trong các mẫu ban đầu và tỷ lệ phát sinh hình thái (%) sau 90 ngày nuôi cấy.

- Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí mẫu cấy và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng tái sinh mô sẹo của mẫu lóng thân *in vitro* cây diệp hạ châu: Các đoạn lóng thân (10 mm) của chồi *in vitro* cây diệp hạ châu 2 tháng tuổi ở vị trí lóng thân từ 1 đến 3 (tính từ ngọn chồi) được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng mô sẹo để so sánh khả năng phát sinh mô sẹo tại các vị trí lóng thân khác nhau. Hàm lượng hormone nội sinh (CKs và IAA) có trong mẫu cấy ban đầu và tỷ lệ phát sinh hình thái (%) sau 40 ngày nuôi cấy được ghi nhận trong nghiên cứu này.

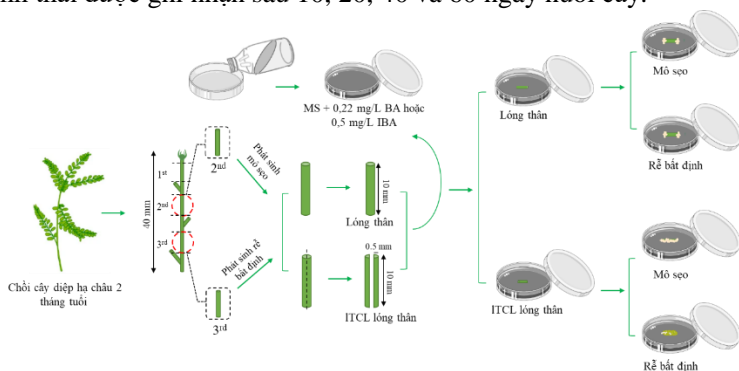
- Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên khả năng phát sinh hình thái của cây chanh dây, hoa đồng tiền và diệp hạ châu:

- Đoạn lóng thân của cây diệp hạ châu 2 tháng tuổi (đoạn lóng thân thứ 3 tính từ trên xuống) được cắt thành 2 phần bằng nhau theo chiều dọc (ITCL) có kích thước $0,5 \times 10$ mm và nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi. Quá trình phát sinh hình thái được ghi nhận sau 10, 30, 60 và 90 ngày nuôi cấy.

Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên khả năng tái sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền nuôi cấy *in vitro*: *Vật liệu thí nghiệm*: Mẫu

đế hoa của cây hoa đồng tiền được cắt thành 4 phần bằng nhau theo chiều dọc (ITCL) có kích thước $0,5 \times 10$ mm và nuôi cấy trên môi trường phát sinh phôi soma. Đối chứng là mẫu đế hoa. Quá trình phát sinh hình thái được ghi nhận sau 30, 60, 90 và 120 ngày nuôi cấy.

Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên khả năng tái sinh mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu nuôi cấy *in vitro*: Đoạn lóng thân của cây diệp hạ châu 2 tháng tuổi (đoạn lóng thân thứ 2 cho quá trình phát sinh mô sẹo và đoạn lóng thân thứ 3 cho quá trình phát sinh rễ bất định) được cắt thành 2 phần bằng nhau theo chiều dọc (ITCL) có kích thước $0,5 \times 10$ mm và nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi/rễ bất định (Hình 2.6). Quá trình phát sinh hình thái được ghi nhận sau 10, 20, 40 và 60 ngày nuôi cấy.



Hình 2.6. Quy trình thực hiện thí nghiệm phát sinh hình thái *in vitro* của mẫu lóng thân cây diệp hạ châu thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

2.3.1.2. Nội dung 2: Nghiên cứu mối tương quan giữa hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái của cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu

- Thí nghiệm 1. Nghiên cứu sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái *in vitro* của cây chanh dây, diệp hạ châu và hoa đồng tiền: Các mẫu tươi (Chồi bất định của cây chanh dây, phôi soma của cây hoa đồng tiền, mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu) thu nhận từ thí nghiệm trước được sử dụng làm nguồn mẫu để phân tích hormone nội sinh.

- Thí nghiệm 2. Nghiên cứu mối tương quan giữa hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thái của cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu: Hàm lượng các chất hormone trong mẫu chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền, mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu nuôi cấy *in vitro* được phân tích ở thí nghiệm trước đó được phân tích mối tương quan và thể hiện bằng biểu đồ heatmap (mối tương quan Pearson) bằng phần mềm OriginPro 2024b.

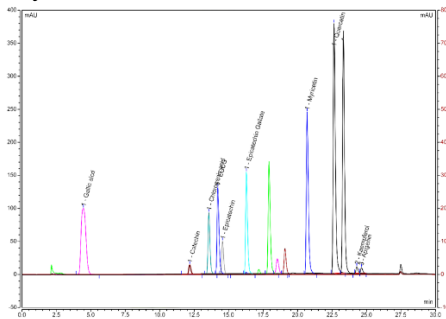
2.3.1.3. *Nội dung 3*: Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên sự tích lũy khí ethylene, hoạt độ của hệ thống chống oxy hóa trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu; sự tổng hợp hợp chất thứ cấp ở rễ bất định cây diệp hạ châu

- Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên sự tích lũy khí ethylene trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu: Để xác định nồng độ ET tích lũy trong hệ thống nuôi cấy, phương pháp sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC/FID) đã được sử dụng trong nghiên cứu này.

- Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên hệ thống chống oxy hóa trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu: Mẫu tươi (0,3g) được nghiền với nitor lỏng và chiết trong đệm phosphat 0,1M (pH 7,4) có chứa EDTA. Dịch chiết sau ly tâm được dùng để xác định hoạt động các enzyme chống oxy hóa như SOD, CAT, APX, cùng với khả năng loại bỏ gốc DPPH, hàm lượng phenolic tổng và vitamin C. Hoạt động SOD được xác định qua khả năng ức chế quá trình oxy hóa pyrogallol tại bước sóng 320 nm; CAT được đo qua phản ứng với H₂O₂ tạo phức màu vàng với amoni molybdate tại 405 nm; APX được đo theo phương pháp Nakano và Asada tại 290 nm. Hoạt động loại bỏ gốc tự do DPPH được tính theo phần trăm RSA. Hàm lượng phenolic tổng được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu và biểu thị theo mg GAE/100g

khối lượng khô. Vitamin C được định lượng bằng phương pháp chuẩn độ với thuốc nhuộm 2,6-dichlorophenol-indophenol.

- Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên sự tổng hợp các hợp chất thứ cấp của rễ bất định cây diệp hạ châu: Chiết xuất ethanol 80% của rễ bất định có nguồn gốc từ các đoạn thân đốt và các đoạn thân đốt ITCL được phân tích bằng hệ thống Thermo-Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific, USA). Các đường chuẩn và sắc ký đồ được sử dụng để định lượng các hợp chất này (Hình 2.10).



Hình 2.10. Sắc ký đồ của 9 hợp chất thứ cấp được phân tích.

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

2.3.2.2. Quan sát hình thái giải phẫu

Những biến đổi tế bào học trong quá trình phát sinh hình thái được theo dõi bằng phương pháp giải phẫu. Việc quan sát mẫu được tiến hành trên kính hiển vi quang học với thị kính 10×, và vật kính 10× và 40×.

2.3.2.2. Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các số liệu sau khi thu nhận ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được nhập vào phần mềm Microsoft Excel 2016, số liệu được xử lý và phân hạng bằng phần mềm SPSS 20.0 với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa $p < 0,05$. Các biểu đồ (\pm SD) được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và heatmap được xử lý bằng OriginPro 2024b (mối tương quan Pearson).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nội dung 1: Nghiên cứu chọn nguồn mẫu cây tối ưu cho quá trình phát sinh hình thái *in vitro* ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu

3.1.1. Ảnh hưởng của vị trí mẫu cây và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cây ban đầu lên khả năng tái sinh chồi của mẫu lóng thân *in vitro* cây chanh dây

Nghiên cứu chỉ ra rằng vị trí mẫu cây trên lóng thân cây chanh dây ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh chồi. Ở lóng thân thứ 1, tỷ lệ tái sinh chỉ đạt 40% với chồi nhỏ. Tỷ lệ này tăng lên 63% ở lóng thân thứ 2 và đạt 93,33% ở lóng thân thứ 3, cho thấy đây là vị trí tối ưu. Ngược lại, lóng thân thứ 4 không có khả năng tái sinh chồi.

Phân tích UHPLC-UV cho thấy nồng độ IAA tăng dần từ lóng thân thứ 1 đến thứ 4 (8,958 $\mu\text{g/g}$ FW đến 23,848 $\mu\text{g/g}$ FW), trong khi nồng độ CKs giảm từ lóng thân thứ 1 đến thứ 4 (6,548 $\mu\text{g/g}$ FW xuống 3,891 $\mu\text{g/g}$ FW). Tỷ lệ IAA/CKs tăng mạnh từ 1,368 ở lóng thân thứ 1 lên 6,129 ở lóng thân thứ 4, chỉ ra sự gia tăng ảnh hưởng của AUX so với CKs ở các vị trí xa gốc cây.

3.1.2. Ảnh hưởng của độ tuổi để hoa và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cây ban đầu lên khả năng tái sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền nuôi cấy *in vitro*

Độ tuổi của để hoa ảnh hưởng lớn đến khả năng tái sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền trong nuôi cấy *in vitro*. Giai đoạn nụ hoa có tỷ lệ tái sinh cao nhất (100%) với số lượng phôi soma đạt 30,67, nhờ tế bào còn trẻ và hoạt động sinh lý mạnh mẽ. Khi hoa phát triển, tỷ lệ tái sinh giảm dần, chỉ còn 12% ở giai đoạn tia hoa có màu.

Hàm lượng hormone CKs cao nhất ở giai đoạn nụ hoa, giúp thúc đẩy sự phân chia tế bào và phát sinh phôi soma. Mức độ CKs giảm dần trong các giai

đoạn sau. Tỷ lệ AUX/CKs ở giai đoạn nụ hoa là 1,923, cho thấy sự cân bằng giữa hai hormone này, điều kiện thuận lợi cho quá trình tái tạo và biệt hóa mô.

3.1.3. Ảnh hưởng của vị trí mẫu cấy và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng tái sinh mô sẹo của mẫu lóng thân in vitro cây diệp hạ châu

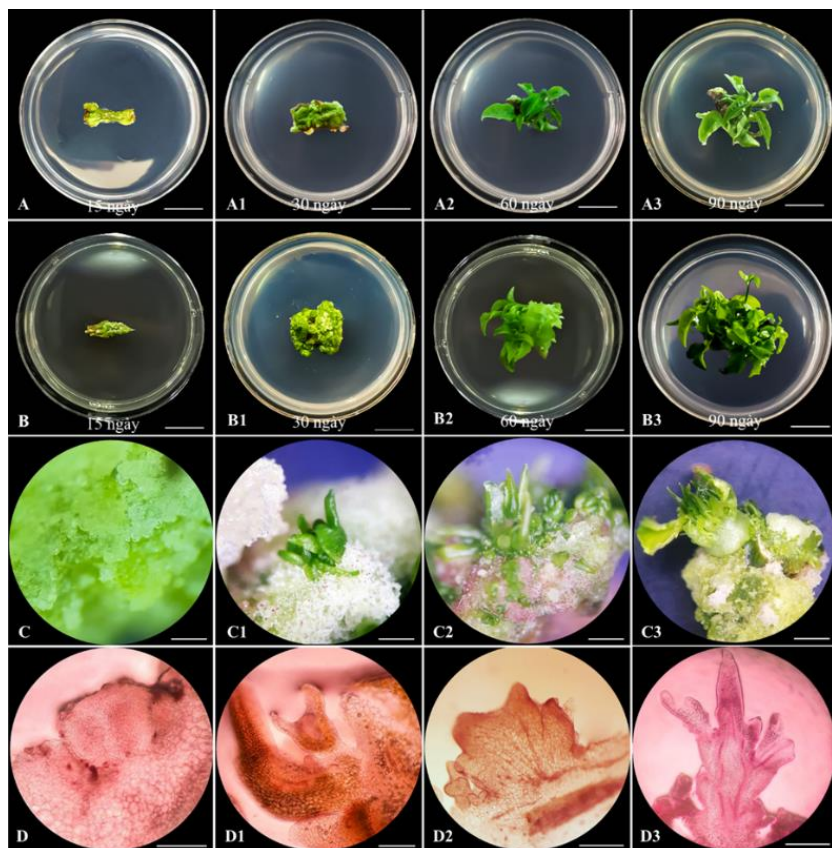
Nghiên cứu chỉ ra sự khác biệt trong khả năng tái sinh mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu ở các vị trí lóng thân khác nhau. Mẫu cấy từ lóng thân thứ 1 và thứ 2 đều hình thành mô sẹo với tỷ lệ 100%, nhưng lóng thân thứ 3 không chỉ hình thành mô sẹo mà còn phát sinh rễ bất định, nhờ vào nồng độ AUX cao và sự biệt hóa tế bào tại vị trí này. Lóng thân thứ 3 gần hệ thống gốc có khả năng tái sinh rễ mạnh mẽ hơn.

Hàm lượng CKs giảm dần khi càng gần rễ, trong khi hàm lượng AUX tăng dần. Tỷ lệ AUX/CKs ở ba vị trí lóng thân đều xấp xỉ hoặc lớn hơn 1, cho thấy khả năng hình thành mô sẹo. Tỷ lệ AUX/CKs thấp nhất ở lóng thân thứ 1 (0,970) và cao nhất ở lóng thân thứ 3 (4,203), phản ánh sự khác biệt trong khả năng phát sinh hình thái. Tỷ lệ AUX/CKs cao ở lóng thân thứ 3 mặc dù có sự bổ sung CKs ngoại sinh, vẫn cho thấy khả năng hình thành rễ bất định.

3.1.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên khả năng phát sinh hình thái của cây chanh dây, diệp hạ châu và hoa đồng tiền

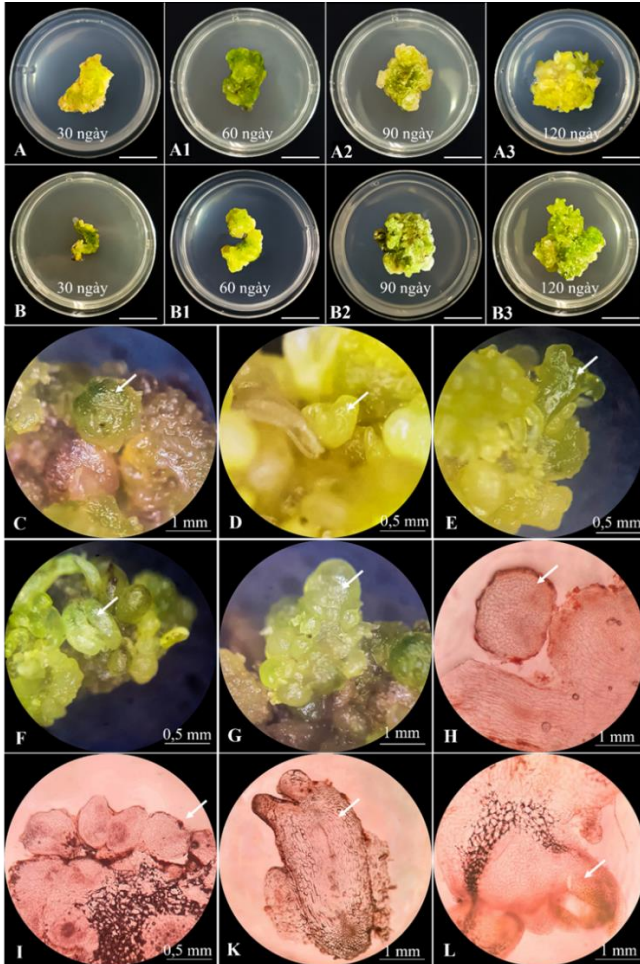
Kết quả nghiên cứu về kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (ITCL) cho thấy sự khác biệt rõ rệt so với mẫu lóng thân trong khả năng phát sinh hình thái của cây chanh dây, diệp hạ châu và hoa đồng tiền.

Đối với cây chanh dây, cả mẫu lóng thân và ITCL lóng thân đều có khả năng tái sinh chồi bất định. Mẫu ITCL lóng thân cho thấy sự tăng trưởng vượt trội, với số lượng chồi tăng từ 2,33 chồi ở ngày 15 lên 12,33 chồi vào ngày 90, cùng với chiều cao chồi phát triển mạnh mẽ hơn (từ 1,54 cm lên 3,45 cm) (Hình 3.11). Hệ số tái sinh của mẫu ITCL lóng thân cũng cao hơn nhiều, đạt 24,67 vào ngày thứ 90, vượt xa mẫu lóng thân (Hình 3.11).



Hình 3.11. Sự hình thành chồi bất định từ mẫu lóng thân và ITCL lóng thân của cây chanh dây. A-A3. Chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân (Bar = 2 cm). B-B3. Chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu ITCL lóng thân (Bar = 2 cm). C-C3. Cảm ứng chồi bất định ở B-B3 quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (Bar = 0,3 cm). D-D3. Chồi bất định ở B-B3 dưới kính hiển vi quang học $\times 10$ (Bar = 40 μm).

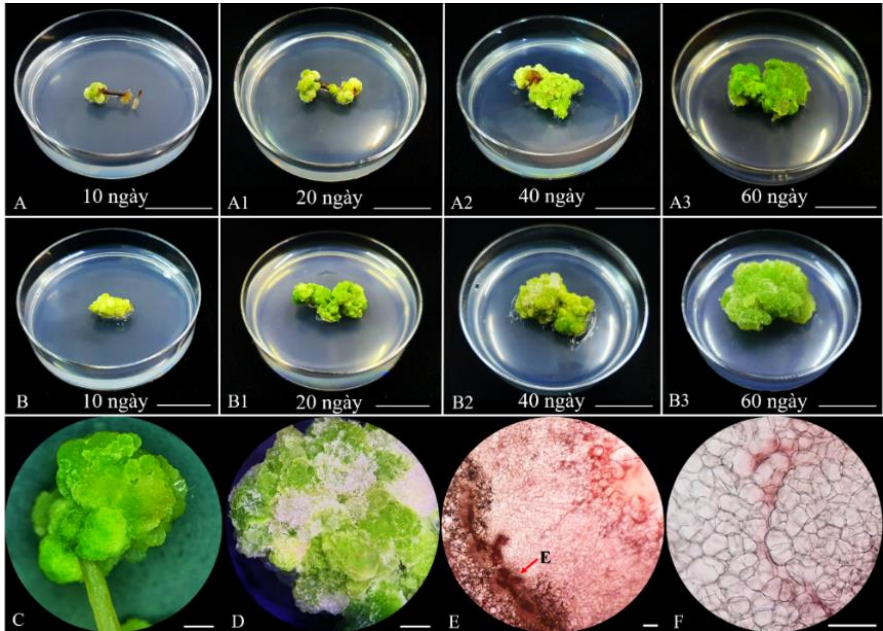
Ở cây hoa đồng tiền, phương pháp ITCL để hoa giúp tăng cường sự hình thành phôi soma so với mẫu để hoa thông thường. Mẫu ITCL để hoa có số lượng phôi soma tăng mạnh từ 19,33 phôi soma/mẫu ở ngày 30 lên 83,67 phôi soma/mẫu vào ngày 120 (Hình 3.13). Sự chuyển đổi từ phôi hình cầu sang phôi hình tim và 2 lá mầm cũng diễn ra nhanh chóng hơn ở mẫu ITCL, đặc biệt là vào ngày thứ 60 (Hình 3.13).



Hình 3.13. Sự hình thành phôi soma từ mẫu đế hoa và ITCL đế hoa của cây hoa đồng tiền. A-A3. Phôi soma có nguồn gốc từ mẫu đế hoa (Bar = 2 cm).

B-B3. Phôi soma có nguồn gốc từ mẫu ITCL đế hoa (Bar = 2 cm). C. Phôi soma ở giai đoạn hình cầu. D. Phôi soma ở giai đoạn hình tim. E. Phôi soma ở giai đoạn hình thủy lô. F. Phôi soma ở giai đoạn lá mầm. G. Phôi soma ở dạng đa phôi. H. Hình giải phẫu của phôi soma hình cầu. I. Hình giải phẫu của phôi soma hình tim. K. Hình giải phẫu của phôi soma hình thủy lô. L. Hình giải phẫu của phôi soma dạng 2 lá mầm.

Đối với cây diệp hạ châu, cả mẫu lóng thân và ITCL lóng thân đều hình thành mô sẹo, nhưng ITCL lóng thân cho kết quả vượt trội. Mô sẹo hình thành nhanh hơn và bao phủ toàn bộ mẫu từ ngày 10 (Hình 3.15). Sự hình thành rễ bất định cũng tối ưu hơn ở mẫu ITCL, với rễ dài hơn và nhiều rễ to hơn sau 60 ngày nuôi cấy, trong khi mẫu lóng thân có ít rễ hơn và đầu rễ có màu vàng.



Hình 3.15. Sự hình thành mô sẹo từ mẫu lóng thân và ITCL lóng thân của cây diệp hạ châu. A-A3. Mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lóng thân (Bar = 2 cm). B-B3. Mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu ITCL lóng thân (Bar = 2 cm). C. Mô sẹo ở A1 quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (Bar = 0,3 cm). D. Mô sẹo ở B1 quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (Bar = 0,3 cm). E. Mô sẹo ở B3 dưới kính hiển vi quang học $\times 10$ (Mũi tên: Mẫu cây - E) và F. $\times 40$ (Bar = 40 μm).

Tóm lại, kỹ thuật ITCL giúp tăng cường khả năng tái sinh hình thái, phát triển mô sẹo, và rễ bất định, mang lại kết quả vượt trội so với mẫu lóng thân ở cả ba loại cây nghiên cứu.

3.2. Nội dung 2: Nghiên cứu mối tương quan của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái *in vitro* của cây chanh dây, hoa đồng tiền và diệp hạ châu

3.2.1. Sự biến động và mối tương quan của hormone nội sinh trong quá trình tái sinh chồi bất định của cây chanh dây

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng các hormone thực vật như CKs, GA3, ABA, IAA, SA và MEL có sự biến động rõ rệt trong quá trình nuôi cấy mô cây chanh dây. Cụ thể, CKs giảm mạnh vào ngày thứ 15, sau đó tăng mạnh vào ngày thứ 30, nhưng lại giảm tiếp vào ngày thứ 60 và 90. Các hormone khác như GA3, ABA và IAA cũng có xu hướng giảm dần trong giai đoạn đầu và có sự biến động rõ rệt trong các giai đoạn sau. Đặc biệt, tỷ lệ các hormone như IAA/CKs, IAA/GA3, CKs/GA3, IAA/ABA, CKs/ABA và GA3/ABA cho thấy sự điều chỉnh và phối hợp trong quá trình phát sinh chồi bất định, giúp kích thích sự phân chia và phát triển tế bào.

Mẫu lông thân và mẫu ITCL lông thân có sự khác biệt về tỷ lệ hormone, với mẫu ITCL lông thân thể hiện sự đối kháng mạnh mẽ giữa CKs và IAA, cũng như sự hiệp đồng giữa GA3 và ET, điều này giúp nâng cao khả năng tái sinh chồi. Ngoài ra, ở mẫu ITCL lông thân, hàm lượng CKs có sự thay đổi mạnh mẽ, cho thấy sự tác động mạnh mẽ của hormone này đến sự phát sinh chồi bất định. Các hormone hỗ trợ như SA và MEL cũng đóng vai trò quan trọng trong việc giảm stress và cải thiện khả năng ra chồi.

Từ kết quả này, nghiên cứu chỉ ra rằng mẫu ITCL lông thân có hiệu suất tái sinh chồi cao hơn so với mẫu lông thân nhờ vào sự điều chỉnh hợp lý của các hormone như CKs, GA3, IAA và ABA, làm cho quá trình phát sinh chồi trở nên hiệu quả và linh hoạt hơn.

3.2.2. Sự biến động và mối tương quan của hormone nội sinh trong quá trình hình thành phôi soma của cây hoa đồng tiền

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự thay đổi rõ rệt của các hormone nội sinh trong quá trình hình thành phôi soma của cây hoa đồng tiền qua các giai đoạn nuôi cấy khác nhau. Trong suốt quá trình nuôi cấy, hầu hết các hormone như CKs, GA3, SA, ABA, JA, IAA và MEL có sự biến động mạnh. Các hormone này thường giảm ở giai đoạn đầu (ngày thứ 30) và tăng dần vào ngày thứ 60, sau đó giảm ở các ngày sau (90 và 120).

Cụ thể, CKs có sự biến động ổn định ở ngày thứ 30 và 60, nhưng lại giảm dần vào các giai đoạn sau đối với mẫu đế hoa. Trong khi đó, mẫu ITCL đế hoa có sự gia tăng mạnh vào ngày thứ 60 nhưng giảm dần vào ngày thứ 90 và 120. Các hormone như GA3 và SA đều có xu hướng tăng vào ngày thứ 60 và 90, sau đó giảm ở ngày thứ 120.

Hormone ABA có sự biến động khác biệt giữa hai mẫu cấy: ở mẫu ITCL đế hoa, hàm lượng ABA tăng vào ngày thứ 60 và giảm dần trong các ngày tiếp theo; trong khi đó, ở mẫu đế hoa, hàm lượng ABA tiếp tục tăng vào ngày thứ 90 rồi giảm mạnh vào ngày thứ 120. Tương tự, hàm lượng JA tăng vào ngày thứ 60 và 90, rồi giảm vào ngày thứ 120 ở cả hai mẫu cấy.

Tỷ lệ giữa các hormone như IAA/CKs, IAA/GA3, CKs/GA3, IAA/ABA, CKs/ABA, GA3/ABA đều có sự thay đổi đáng chú ý trong suốt quá trình nuôi cấy. Tỷ lệ IAA/CKs tăng vào ngày thứ 30 nhưng giảm dần cho đến ngày nuôi cấy cuối. Tỷ lệ CKs/GA3 tăng vào ngày thứ 30, sau đó giảm vào ngày thứ 60 và lại tăng vào ngày thứ 90 và 120 đối với mẫu đế hoa, trong khi tỷ lệ này ở mẫu ITCL đế hoa lại có sự thay đổi ngược lại. Tỷ lệ GA3/ABA ở mẫu ITCL đế hoa tăng mạnh vào ngày thứ 30, sau đó giảm mạnh và tăng trở lại ở ngày thứ 90 và 120.

Nghiên cứu chỉ ra rằng sự thay đổi tỷ lệ hormone như IAA, CKs, GA3, ABA phản ánh sự tương tác phức tạp giữa các yếu tố sinh lý và sinh hóa trong quá trình phát sinh phôi soma. Mối tương quan giữa các hormone ở mẫu đế hoa

và ITCL để hoa cũng có sự khác biệt rõ rệt. Ở mẫu để hoa, sự tương quan giữa các hormone yếu, trong khi ở mẫu ITCL để hoa, các hormone hoạt động đồng bộ và phối hợp chặt chẽ hơn, phản ánh sự thay đổi trong mạng lưới điều hòa hormone tùy thuộc vào nguồn mô cảm ứng. Điều này ảnh hưởng đến hiệu quả và cơ chế phát sinh phôi soma ở từng loại mẫu cây.

3.2.3. Sự biến động và mối tương quan của hormone nội sinh trong quá trình tái sinh mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu

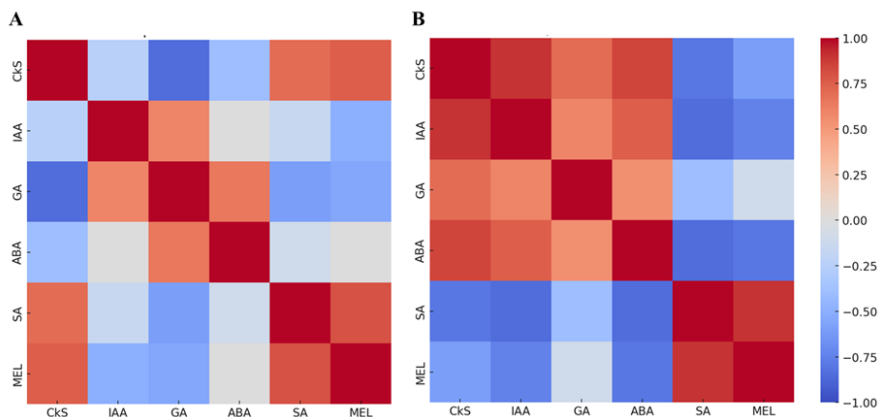
Nghiên cứu này phân tích sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình hình thành mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu từ hai mẫu cấy lóng thân và ITCL lóng thân. Kết quả cho thấy, trong quá trình hình thành mô sẹo, hầu hết các hormone nội sinh giảm mạnh trong 10 ngày đầu nuôi cấy, ngoại trừ CKs trong mô sẹo từ mẫu lóng thân, IAA trong mô sẹo và rễ bất định từ mẫu lóng thân, cùng ABA trong mô sẹo ở cả hai mẫu cấy (Hình 3.28). Nồng độ CKs tăng dần từ ngày đầu đến ngày thứ 20 và giảm dần sau đó, với sự tăng đột biến vào ngày thứ 60 ở mẫu lóng thân (Hình 3.28). Trong khi đó, mẫu ITCL lóng thân cho thấy sự gia tăng hormone vào ngày thứ 20, sau đó giảm dần vào ngày thứ 40 và thứ 60 (Hình 3.28).

Đối với sự hình thành rễ bất định, các hormone đều giảm vào ngày thứ 10, sau đó gia tăng vào ngày thứ 20, ngoại trừ SA. Mẫu ITCL lóng thân có sự tăng mạnh của CKs, IAA, và ABA vào ngày thứ 40, trong khi mẫu lóng thân biểu hiện sự thay đổi không đồng nhất, với sự giảm của SA và tăng dần của MEL.

Sự biến động của tỷ lệ hormone như IAA/CKs, IAA/GA3, IAA/ABA, CKs/GA3, CKs/ABA và GA3/ABA cho thấy sự phân hóa rõ rệt giữa hai mẫu cấy. Mẫu ITCL lóng thân có sự biến động hormone mạnh mẽ hơn, đặc biệt là tỷ lệ CKs/GA3 và IAA/CKs. Mối tương quan giữa các hormone cũng có sự khác biệt rõ rệt, với mẫu lóng thân cho thấy sự tương quan nghịch giữa CKs và IAA,

GA3, ABA, trong khi ở mẫu ITCL lóng thân, CKs có mối tương quan thuận với tất cả các hormone còn lại.

Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu ITCL lóng thân có khả năng cảm ứng mô sẹo và rễ bất định tốt hơn, phản ứng mạnh mẽ với CKs và có thời gian cảm ứng ngắn hơn, đồng thời có khả năng tích lũy sinh khối tốt hơn. Điều này giải thích tại sao mẫu ITCL lóng thân có hiệu quả cao hơn trong việc hình thành rễ bất định và mô sẹo, đặc biệt khi kết hợp với các hormone như ABA và GA3.



Hình 3.28. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lóng thân (A) và ITCL lóng thân (B) của cây diệp hạ châu. Hệ số tương quan được tính toán dựa trên tương quan Pearson. Màu đỏ biểu thị mối tương quan thuận, trong khi màu xanh biểu thị mối tương quan nghịch.

3.2.2. Sự sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp của mẫu mô sẹo và rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu ITCL lóng thân cây diệp hạ châu

Kết quả quá trình tổng hợp hợp chất thứ cấp (hypophyllanthin và phyllanthin) từ mô sẹo và mẫu rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu ITCL lóng thân được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy.

Kết quả cho thấy mô sẹo tạo ra 7,06 $\mu\text{g/g}$ hypophyllanthin, trong khi rễ bất định cho thấy lượng cao hơn đáng kể là 11,54 $\mu\text{g/g}$. Điều này cho thấy rễ bất định thể hiện quá trình tổng hợp hợp chất này mạnh hơn. Sự hiện diện của hypophyllanthin trong cả hai mẫu cho thấy quá trình sản xuất các lignan hoạt

tính sinh học quan trọng, thường liên quan đến nhiều lợi ích sức khỏe khác nhau như đặc tính kháng khuẩn và chống oxy hóa. Bên cạnh đó, có sự tương phản rõ rệt trong việc tổng hợp phylanthin, trong đó phylanthin không thể phát hiện được trong mô sẹo. Trong khi đó, rễ bất định sinh tổng hợp 16,01 $\mu\text{g/g}$. Điều này cho thấy rằng rễ của cây diệp hạ châu là nguồn chính của phylanthin, nhấn mạnh khả năng tổng hợp sinh học cao hơn của chúng đối với lignan đặc biệt này.

3.3. Nội dung 3: Ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên sự tích lũy khí ethylene, hoạt độ của hệ thống chống oxy hóa trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu; sự tổng hợp hợp chất thứ cấp ở rễ bất định cây diệp hạ châu

3.3.1. Ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên sự tích lũy khí ethylene trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu

Nghiên cứu này phân tích sự tích lũy khí ethylene (ET) và mối tương quan của nó với quá trình phát sinh chồi, phôi soma, mô sẹo và rễ bất định ở cây chanh dây, hoa đồng tiền và diệp hạ châu.

Ở cây chanh dây, mẫu ITCL lóng thân có sự tích lũy ET mạnh mẽ hơn mẫu lóng thân, với mức tăng nhanh từ 0,00 ppm lên 6,15 ppm trong 90 ngày nuôi cấy, so với mẫu lóng thân chỉ đạt 3,79 ppm. Mối tương quan giữa ET và số chồi bất định, cũng như chiều cao chồi, rất mạnh mẽ, cho thấy ET đóng vai trò quan trọng trong việc kích thích phân chia tế bào và sự phát triển chồi.

Đối với cây hoa đồng tiền, mẫu ITCL đế hoa có sự tích lũy ET mạnh mẽ hơn mẫu đế hoa, với mức ET đạt 9,76 ppm vào ngày 120, so với 6,98 ppm của mẫu đế hoa. Mối tương quan giữa ET và số phôi soma rất mạnh, đặc biệt là phôi hai lá mầm, cho thấy ET thúc đẩy sự phát sinh phôi và phân hóa phôi.

Ở cây diệp hạ châu, mẫu ITCL lóng thân tích lũy ET cao hơn mẫu lóng thân, với nồng độ ET lần lượt là 9,83 ppm so với 3,41 ppm sau 60 ngày nuôi

cây. Môi tương quan giữa ET và tỷ lệ hình thành rễ bất định là 0,6125, cho thấy một sự tác động vừa phải, trong khi mối quan hệ mạnh mẽ hơn với khối lượng tươi và khối lượng khô, chứng tỏ ET ảnh hưởng trực tiếp đến sự tích lũy sinh khối và có thể gián tiếp thúc đẩy sự hình thành rễ bất định.

Tóm lại, ET có ảnh hưởng tích cực đến quá trình phát sinh chồi, phôi và rễ bất định, với tác động mạnh mẽ hơn trong mẫu ITCL so với mẫu lóng thân, mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng điều chỉnh nồng độ ET để tối ưu hóa quá trình nuôi cấy mô.

3.2. Ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu

Nghiên cứu này đánh giá hoạt động của các enzyme và hợp chất chống oxy hóa trong mẫu cây lóng thân và ITCL lóng thân của cây chanh dây, hoa đồng tiền và diệp hạ châu.

Ở cây chanh dây, mẫu ITCL lóng thân thể hiện hoạt động chống oxy hóa mạnh mẽ hơn mẫu lóng thân, với mức hoạt động cao hơn ở các enzyme như SOD, CAT, APX và khả năng quét gốc tự do DPPH. Mẫu ITCL lóng thân cũng chứa hàm lượng phenolic cao hơn, góp phần vào khả năng chống oxy hóa vượt trội.

Đối với cây hoa đồng tiền, mẫu ITCL để hoa có hoạt độ enzyme chống oxy hóa cao hơn mẫu để hoa, bao gồm SOD, CAT, APX, DPPH và hàm lượng phenolic. Mẫu ITCL để hoa có khả năng trung hòa gốc tự do và bảo vệ tế bào mạnh mẽ hơn, giúp tăng cường sự phát sinh phôi soma.

Ở cây diệp hạ châu, mẫu ITCL lóng thân thể hiện hoạt động chống oxy hóa cao hơn mẫu lóng thân ở tất cả các enzyme như SOD, CAT, APX và DPPH. Mẫu ITCL lóng thân cũng có mức hoạt động cao hơn của các hợp chất chống oxy hóa không enzyme như phenolic và vitamin C, cho thấy cơ chế bảo vệ mạnh mẽ hơn trong quá trình phát sinh rễ bất định.

Tóm lại, mẫu ITCL lóng thân của cả ba cây nghiên cứu đều thể hiện khả năng chống oxy hóa mạnh mẽ hơn, góp phần vào sự phát triển và bảo vệ mô cây trong quá trình nuôi cấy.

3.3. Sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp của rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và ITCL lóng thân cây diệp hạ châu

Hàm lượng các hợp chất thứ cấp giữa hai loại mẫu cây lóng thân và ITCL lóng thân của cây diệp hạ châu đã được ghi nhận (Hình 3.39 và 3.40). Mẫu cây ITCL lóng thân cho thấy sự gia tăng đáng kể nồng độ các chất chuyển hóa thứ cấp so với mẫu cây lóng thân. Cụ thể, các hợp chất như acid gallic, catechin, acid chlorogenic, EGCG, rutin, acid ellagic (EA), quercetin, apigenin và quercitrin đều có nồng độ tăng lên trong mẫu ITCL lóng thân. Các mức tăng này phản ánh sự gia tăng tổng thể của các hợp chất phenolic và flavonoid trong quá trình cấy, với sự thay đổi nồng độ của từng hợp chất từ mức ban đầu đến mức cuối cùng, giúp minh họa rõ nét sự biến đổi trong sự hình thành các chất chuyển hóa thứ cấp (Hình 3.39). Hơn nữa, hàm lượng của hai hợp chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng, hypophyllanthin và phyllanthin, trong rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu ITCL lóng thân (lần lượt là 11,54 và 16,01 $\mu\text{g/g}$) cao hơn đáng kể so với mẫu cây lóng thân (lần lượt là 3,99 đến 9,03 $\mu\text{g/g}$) sau 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.40).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Nội dung 1: Nghiên cứu chọn nguồn mẫu cây tối ưu cho quá trình phát sinh hình thái in vitro ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng vị trí của mẫu cây trên các lóng thân và độ tuổi của mẫu cây có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh hình thái như chồi, phôi soma, mô sẹo và rễ bất định. Cây chanh dây có khả năng tái sinh chồi bất định mạnh mẽ nhất ở vị trí lóng thân thứ 3. Đối với cây hoa đồng tiền, giai đoạn nụ hoa được xác định là thời điểm lý tưởng nhất để tái sinh phôi soma. Trong khi đó, đối với cây diệp hạ châu, lóng thân thứ 2 tối ưu sự hình thành mô sẹo, còn lóng thân thứ 3 lại thúc đẩy quá trình phát sinh rễ bất định.

TCL đã được chứng minh là hiệu quả vượt trội so với các kỹ thuật cấy truyền thống. Trong nghiên cứu này, các mẫu ITCL giúp tăng tỷ lệ và chất lượng chồi, phôi soma, mô sẹo và rễ bất định ở cả ba đối tượng được nghiên cứu.

Nội dung 2: Nghiên cứu mối tương quan giữa hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thái của cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu

Nghiên cứu về sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh chồi bất định, mô sẹo và rễ bất định ở cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu đã chỉ ra rằng các hormone thực vật như IAA, CKs, GA₃, ABA, MEL và SA có vai trò quan trọng trong việc điều hòa các quá trình sinh lý và sinh hóa liên quan đến khả năng phát sinh hình thái của thực vật. Các kết quả cho thấy, sự thay đổi tỷ lệ giữa các hormone này trong suốt quá trình nuôi cấy ảnh hưởng trực tiếp đến phân chia tế bào, và sự hình thành các mô sẹo, phôi soma, chồi và rễ bất định. Ở cây chanh dây, sự phối hợp giữa IAA và CKs quyết định hiệu quả tái sinh chồi bất định. Ở cây hoa đồng tiền, CKs và GA₃ là các hormone chủ đạo liên quan đến quá trình phát sinh phôi soma. Ở cây diệp hạ châu, IAA và ABA chi phối sự hình thành mô sẹo và rễ bất định. Kỹ thuật ITCL góp phần tối ưu hóa

cân bằng hormone nội sinh, qua đó nâng cao hiệu quả phát sinh hình thái so với mẫu cây thông thường.

Nội dung 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu; sự tích lũy hợp chất thứ cấp ở rễ bất định cây diệp hạ châu

Kết quả nghiên cứu cho thấy kỹ thuật nuôi cấy TCL có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tích lũy ET trong quá trình phát sinh hình thái *in vitro*. So với mẫu cây truyền thống, các mẫu TCL thể hiện sự tích lũy ET cao hơn và có mối tương quan chặt chẽ với hiệu quả phát sinh hình thái, bao gồm tái sinh chồi bất định ở cây chanh dây, hình thành phôi soma ở cây hoa đồng tiền và phát sinh rễ bất định ở cây diệp hạ châu. ET không chỉ đóng vai trò là sản phẩm phụ của stress nuôi cấy mà còn tham gia điều hòa quá trình phân chia, biệt hóa tế bào và tương tác với các hormone nội sinh khác trong từng giai đoạn phát sinh hình thái.

Bên cạnh đó, kỹ thuật TCL còn góp phần điều chỉnh hoạt động của hệ thống chống oxy hóa, thể hiện qua sự gia tăng hoạt độ của các enzyme SOD, CAT và APX, cũng như sự thay đổi hàm lượng các hợp chất chống oxy hóa không enzyme. Những kết quả này cho thấy TCL tạo ra trạng thái stress sinh lý có kiểm soát, qua đó thúc đẩy đồng thời quá trình phát sinh hình thái và khả năng thích nghi sinh lý của mô nuôi cấy *in vitro*.

Kiến nghị

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

Tiếp tục nghiên cứu mối tương quan của hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái ở các đối tượng thực vật khác nhau.

Nghiên cứu mối tương quan giữa hàm lượng hormone nội sinh và các gene có liên quan đến sinh tổng hợp các hormone này và các gene liên quan đến phát sinh hình thái.

Nghiên cứu chỉ dừng lại việc ghi nhận bước đầu đánh giá mối tương quan giữa hormone nội sinh và quá trình phát sinh hình thái. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để hiểu rõ hơn về các đặc điểm sinh lý cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái ở thực vật.

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

[1] **Nguyen Thi Nhu Mai**, Truong Hoai Phong, Hoang Dac Khai, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Hoang Thanh Tung, Pham Thi Minh Thu, Hoang Thi Nhu Phuong, Nguyen Quang Vinh, Duong Tan Nhut, Endogenous hormone alteration during callus and adventitious root formation through thin cell layer culture system in *Phyllanthus amarus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2024, 159(2), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02913-3>

[2] **Nguyen Thi Nhu Mai**, Truong Hoai Phong, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Hoang Thanh Tung, Hoang Thi Nhu Phuong, Nguyen Quang Vinh, Hoang Hai Dang, Duong Tan Nhut, The changes of ethylene gas accumulation, antioxidant system activity, and secondary metabolite synthesis during *in vitro* adventitious root formation of *Phyllanthus amarus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2025, 160(1), 11. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02948-6>