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 CẤY LỚP MỎNG TẾ BÀO TRÊN CÂY CHANH DÂY, ĐỒNG TIỀN VÀ DIỆP HẠ CHÂU

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội - 2025

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 CẤY LỚP MỎNG TẾ BÀO TRÊN CÂY CHANH DÂY, ĐỒNG TIỀN VÀ DIỆP HẠ CHÂU

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện Khoa học và Công nghệ	Thầy hướng dẫn 1	Thầy hướng dẫn 2
	GS.TS. Dương Tấn Nhựt	PGS.TS. Hoàng Thanh Tùng

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan 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, hoa đồng tiền và diệp hạ châu" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. 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. Các 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 26 tháng 12 năm 2025

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Như Mai

LỜI CẢM ƠN

Giai đoạn viết lời cảm ơn này đánh dấu một mốc quan trọng, khi tôi đang tiến gần đến điểm kết thúc của hành trình nghiên cứu. Thời gian thực hiện luận án không chỉ là quãng thời gian đầy niềm vui, hy vọng, mà còn là những lo lắng và thử thách. Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án, tôi đã nhận được sự quan tâm và hỗ trợ quý báu từ nhiều Thầy Cô, gia đình và bạn bè.

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến Thầy GS.TS. Dương Tấn Nhựt, người đã tận tâm hướng dẫn, định hướng và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Thầy PGS.TS. Hoàng Thanh Tùng, với sự nhiệt tình và những đóng góp thiết thực giúp tôi hoàn thiện luận án.

Lời cảm ơn trân trọng cũng xin gửi tới TS. Trương Hoài Phong, TS. Đỗ Mạnh Cường, PGS.TS. Vũ Quốc Luận, TS. Trương Thị Lan Anh, ThS. Hoàng Đắc Khải, ThS. Nguyễn Thị Thanh Thúy và các Thầy Cô, anh chị đã và đang học tập và làm việc tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng đã luôn đồng hành và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn TS. Hoàng Thị Như Phương (giảng viên tại trường Đại học Đà Lạt), PGS.TS. Nguyễn Quang Vinh (giảng viên tại trường Đại học Tây Nguyên) và TS. Phạm Thị Minh Thu (giảng viên tại trường Đại học Nha Trang) đã cho tôi những góp ý chân thành để tôi hoàn thiện các công trình khoa học.

Tôi xin gửi lời biết ơn đến các Thầy Cô tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, những người đã tạo điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành chương trình học.

Đặc biệt, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Ban lãnh đạo và cán bộ nhân viên của Học viện Khoa học và Công nghệ, cũng như Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (nay là Viện Khoa học sự sống), đã luôn đồng hành và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Xin trân trọng cảm ơn đến nguồn hỗ trợ từ dự án của Quỹ Đổi mới sáng tạo thuộc Tập đoàn Vingroup (VINIF) với mã số dự án VINIF.2023.DA075, Quỹ học bổng VINIF cho Thạc sĩ và Tiến sĩ - VINIF.2022.TS072, Quỹ học bổng Odon Vallet

và Quỹ học bổng cựu Sinh viên GS.TS. Dương Tấn Nhựt đã đồng hành cùng tôi trong quá trình thực hiện luận án này.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới gia đình, người thân và bạn bè đã luôn ở bên, chia sẻ và động viên tôi trong từng bước đường nghiên cứu. Sự cảm thông và hỗ trợ của họ chính là nguồn động lực lớn lao giúp tôi hoàn thành luận án này.

Xin trân trọng gửi lời cảm ơn chân thành và hy vọng sẽ tiếp tục gặp lại ở những hành trình mới phía trước.

Trân trọng!

Hà Nội, ngày 26 tháng 12 năm 2025

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Như Mai

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i

LỜI CẢM ƠN ii

MỤC LỤC iv

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT vii

DANH MỤC BẢNG ix

DANH MỤC HÌNH ẢNH x

MỞ ĐẦU 1

Mục tiêu nghiên cứu 2

Ý nghĩa khoa học của đề tài 2

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài 2

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài 3

Đối tượng nghiên cứu 3

Phạm vi nghiên cứu 3

Những đóng góp mới của luận án 3

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 5

1.1. Phát sinh hình thái của thực vật 5

1.2. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào 9

1.3. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật 11

1.4. Hormone nội sinh thực vật 12

1.4.1. Khái niệm 12

1.4.2. Hoạt động của hormone nội sinh 19

1.4.3. Sự tương tác của hormone nội sinh trong thực vật 21

1.5. Sơ lược về đối tượng nghiên cứu 26

1.5.1. Cây chanh dây 26

1.5.2. Cây hoa đồng tiền 26

1.5.3. Cây diệp hạ châu 27

1.5.4. Một số nghiên cứu về ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu 27

CHƯƠNG 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 29

2.1. Nội dung nghiên cứu 29

2.2. Vật liệu nghiên cứu 30

2.2.1. Vật liệu thực vật 30

2.2.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất 31

2.2.3. Môi trường nuôi cấy 32

2.3. Phương pháp nghiên cứu 32

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm 32

2.3.2. Một số phương pháp và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu 42

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 44

3.1. Nội dung 1: Nghiên cứu chọn nguồn mẫu cấy tối ưu cho quá trình phát sinh hình thái *in vitro ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu* 44

3.1.1. Ảnh hưởng của vị trí mẫu cấy và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng tái sinh chồi của mẫu lóng thân in vitro cây chanh dây .44

3.1.2. Ảnh hưởng của độ tuổi đế hoa và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng phát sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền nuôi cấy in vitro 47

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 50

3.1.4. 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 54

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 64

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 64

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.....70

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 78

3.2.4. Sự sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp của mẫu mô sẹo và rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lTCL lóng thân cây diệp hạ châu 89

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 91

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 91

3.3.2. 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 98

3.3.3. Sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp của rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu 103

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....106

KẾT LUẬN.....106

KIẾN NGHỊ.....107

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....108

TÀI LIỆU THAM KHẢO.....109

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	
2iP	N6-isopentenyladenine	
ABA	Abscisic acid	Axit abscisic
APX	Ascorbate peroxidase	
AUX	Auxin	
Ar	Adventitious root	Rễ bất định
BA	6-Benzyladenine	
CAT	Catalase	
CKs	Cytokinins	
Cor	Cortex	Mô giữa
DW	Dry weight	Khối lượng khô
E	Explant	Mẫu cấy
EA	Ellagic acid	Axit ellagic
En	Edodermis	Lớp nội bì
Epi	Epidermis	Lớp biểu bì
ET	Ethylene	
GA_1	Gibberellin acid A1	Axit gibberellic A_1
GA_3	Gibberellic acid A3	Axit gibberellic A_3
GA_4	Gibberellin acid A4	Axit gibberellic A_4
H_2O_2	Hydrogen peroxide	
IAA	Indole-3-acetic acid	Axit indole-3-acetic
IBA	Indole-3-butyric acid	Axit indole-3-butyric
iPA	Indole-3-propionic acid	Axit indole-3-propionic
JA	Jasmonic acid	Axit jasmonic
KIN	Kinetin	
lTCL	Longitudinal thin cell layer	Lớp mỏng tế bào cắt dọc
MS	Murashige and Skoog (1962)	Murashige và Skoog (1962)

mT	6-(3-hydroxybenzylamino) purine/Meta-Topolin	
NAA	1-Naphthaleneacetic acid	
MEL	N-acetyl-5-methoxytryptamine/Melatonin	
PGR	Plant growth regulator	Chất điều hoà sinh trưởng thực vật
ROS	Reactive Oxygen Species	
SOD	Superoxide dismutase	
SA	Salicylic acid	Axit salicylic
SPAD	Soil Plant Analysis Development	Chỉ số diệp lục tố
TCL	Thin cell layer	Lớp mỏng tế bào
TDZ	Thidiazuron	
tTCL	Transverse thin cell layer	Lớp mỏng tế bào cắt ngang
UHPLC-UV	Ultra-high-performance liquid chromatographic coupled with an ultraviolet detector	Sắc ký lỏng siêu hiệu năng kết hợp đầu dò UV
ZEA	trans-Zeatin	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Sự biến động của hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái/sinh trưởng ở một số loài thực vật khác nhau 23

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. 9 nhóm hormone nội sinh chính của thực vật 12

Hình 1.2. Hoạt động của hormone nội sinh.....20

Hình 1.3. Sự tích lũy và tác động của hormone nội sinh ở thực vật 22

Hình 1.4. Khái niệm cho vai trò trao đổi chéo đối kháng và hiệp đồng giữa hai hormone nội sinh giả định A và B 25

Hình 2.1. Sơ đồ thiết lập mẫu cấy lóng thân *in vitro* cây chanh dây.....32

Hình 2.2. Sơ đồ thiết lập mẫu cấy đế hoa *ex vitro* cây hoa đồng tiền 33

Hình 2.3. Sơ đồ thiết lập mẫu cấy lóng thân *in vitro* cây diệp hạ châu.....33

Hình 2.4. Quy trình thực hiện thí nghiệm phát sinh hình thái cây chanh dây nuôi cấy *in vitro* thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào 34

Hình 2.5. Quy trình thực hiện thí nghiệm phát sinh hình thái *in vitro* của mẫu đế hoa cây hoa đồng tiền thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.....35

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 35

Hình 2.7. Đường chuẩn của 10 hormone nội sinh được phân tích.....37

Hình 2.8. Biểu đồ sắc ký khí chuẩn của ET 39

Hình 2.9. Đường chuẩn của phyllanthin và hypophyllanthin 41

Hình 2.10. Sắc ký đồ của 9 hợp chất thứ cấp được phân tích 41

Hình 3.1. Khả năng cảm ứng chồi ở 4 vị trí lóng thân *in vitro* khác nhau của cây chanh dây sau 60 ngày nuôi cấy.....43

Hình 3.2. Sự phát sinh chồi của mẫu cây chanh dây ở các vị trí lóng thân *in vitro* khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy 44

Hình 3.3. Hàm lượng cytokinin, IAA (A) và tỷ lệ IAA/CKs (B) ở 4 vị trí lóng thân in vitro khác nhau của cây chanh dây 45

Hình 3.4. Sự phát sinh hình thái của mẫu đế hoa đồng tiền ở các giai đoạn khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy 47

Hình 3.5. Sự phát sinh hình thái của mẫu đế hoa đồng tiền ở các giai đoạn khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy 47

Hình 3.6. Hàm lượng cytokinin, IAA (A) và tỷ lệ IAA/CKs (B) ở 3 độ tuổi khác nhau của mẫu đế hoa cây hoa đồng tiền 48

Hình 3.7. Tỷ lệ phát sinh mô sẹo và rễ bất định của các vị trí lóng thân khác nhau sau 40 ngày nuôi cấy 50

Hình 3.8. Sự phát sinh hình thái của mẫu cây diệp hạ châu ở các vị trí lóng thân khác nhau sau 40 ngày nuôi cấy 51

Hình 3.9. Hàm lượng cytokinin, IAA (A) và tỷ lệ IAA/CKs (B) ở 3 vị trí lóng thân in vitro khác nhau của cây diệp hạ châu 52

Hình 3.10. So sánh hiệu quả tái sinh chồi bất định từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây 54

Hình 3.11. Sự hình thành chồi bất định từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây.....55

Hình 3.12. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma từ mẫu đế hoa và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền 56

Hình 3.13. Sự hình thành phôi soma từ mẫu đế hoa và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền. 57

Hình 3.14. Sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu. 59

Hình 3.15. Sự hình thành mô sẹo từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu.....60

Hình 3.16. Sự hình thành rễ bất định mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu.....61

Hình 3.17. Mô phỏng sự hấp thu chất dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng thực vật của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu 62

Hình 3.18. Sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành chồi *in vitro* của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây 64

Hình 3.19. Tỷ lệ của các hormone nội sinh trong mẫu chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây 66

Hình 3.20. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân (A) và lTCL lóng thân (B) của cây chanh dây.....67

Hình 3.21. Sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành phôi soma của mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền.....70

Hình 3.22. Tỷ lệ của các hormone nội sinh trong mẫu phôi soma có nguồn gốc từ mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền.....72

Hình 3.23. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong phôi soma có nguồn gốc từ mẫu đế hoa (A) và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền (B). 73

Hình 3.24. Sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành mô sẹo của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu 78

Hình 3.25. Sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành rễ bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu.....80

Hình 3.26. Tỷ lệ của các hormone nội sinh trong mẫu mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu. 81

Hình 3.27. Tỷ lệ của hormone nội sinh trong mẫu rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu 82

Hình 3.28. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lóng thân (A) và lTCL lóng thân (B) của cây diệp hạ châu 84

Hình 3.29. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân (A) và lTCL lóng thân (B) của cây diệp hạ châu.....85

Hình 3.30. Sự tích lũy phylanthin và hypophylanthin của mô sẹo và rễ bất định có nguồn gốc từ lTCL lóng thân cây diệp hạ châu sau 60 ngày nuôi cấy. 88

Hình 3.31. Sự tích lũy khí ethylene trong quá trình cảm ứng chồi bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây. 90

Hình 3.32. Mối tương quan giữa khí ethylene và sự hình thành chồi bất định của mẫu cấy A. lóng thân và B. lTCL lóng thân của cây chanh dây.....91

Hình 3.33. Sự tích lũy khí ethylene trong quá trình cảm ứng phôi soma của mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền.....92

Hình 3.34. Mối tương quan giữa khí ethylene và sự cảm ứng phôi soma của mẫu cấy A. đế hoa và B. lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền.....93

Hình 3.35. Sự tích lũy khí ethylene trong quá trình cảm ứng rễ bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu.....94

Hình 3.36. Mối tương quan giữa khí ethylene và sự hình thành rễ bất định của mẫu cấy A. lóng thân và B. lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu.....95

Hình 3.37. Hoạt độ của SOD, CAT và APX trong mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây sau 90 ngày nuôi cấy 96

Hình 3.38. Hàm lượng DPPH và phenolic trong mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây sau 90 ngày nuôi cấy 97

Hình 3.39. Hoạt độ của SOD, CAT và APX trong mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền sau 120 ngày nuôi cấy 98

Hình 3.40. Hàm lượng DPPH và phenolic trong mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền sau 120 ngày nuôi cấy 98

Hình 3.41. Hoạt độ của SOD, CAT và APX trong mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu sau 60 ngày nuôi cấy 99

Hình 3.42. Hàm lượng DPPH, phenolic và vitamin C trong mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu sau 60 ngày nuôi cấy.....100

Hình 3.43. Sự sinh tổng hợp phyllanthin và hypophyllanthin trong rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu sau 60 nuôi cấy102

Hình 3.44. Sự sinh tổng hợp của 9 hợp chất thứ cấp trong mẫu cấy lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu sau 60 ngày nuôi cấy 103

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Khả năng phát sinh hình thái của mô và tế bào thực vật trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* đã mở ra nhiều ứng dụng trong nghiên cứu thực vật học cơ bản, hóa sinh, nhân giống, chọn tạo giống và phát triển cây trồng chuyển gene. Quá trình này chịu tác động của nhiều yếu tố như môi trường nuôi cấy, ánh sáng, loại mẫu cấy và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs) được bổ sung vào môi trường. Trong đó, mẫu cấy là một trong những yếu tố quan trọng tạo nên sự thành công của quy trình nuôi cấy mô thực vật. Trong nuôi cấy mô thực vật, cả mẫu nhỏ (tế bào, mô) và lớn (toàn bộ cơ quan) đều có thể được sử dụng làm mẫu cấy để tái sinh hoặc hình thành cơ quan *in vitro*. Việc lựa chọn mẫu cấy đóng vai trò quan trọng và cần được tối ưu hóa khi bắt đầu các thử nghiệm nuôi cấy [1], do các mẫu cấy khác nhau có thể phản ứng khác nhau khi nuôi cấy trong cùng môi trường tái sinh và điều kiện nuôi cấy.

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin Cell Layer - TCL) giúp xác định được loại mẫu cấy thích hợp, vì mẫu lTCL (lớp mỏng tế bào theo chiều dọc - Longitudinal thin cell layer) chỉ bao gồm một hoặc hai loại mô (như biểu bì và dưới biểu bì), còn mẫu tTCL (lớp mỏng tế bào theo chiều ngang - Transverse thin cell layer) có thể bao gồm nhiều loại mô khác nhau [2]. Kỹ thuật TCL đã thành công trong việc phát sinh hình thái và tái sinh ở nhiều loài thực vật như cây lan, cây thuốc, cây thân gỗ và cây rau [3], chứng minh tính ưu việt trong nghiên cứu cơ chế hình thái và sự phát triển thực vật [4, 5].

TCL cũng giúp phân tích sự biến động hormone nội sinh nhờ lượng hormone nội sinh trong mẫu thấp. Hormone thực vật nội sinh như auxin, cytokinin, gibberellin, ethylene và abscisic acid 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 trong quá trình kích thích hoặc ức chế sự phát triển [6]. Ngoài hormone nội sinh, 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 soma, tái sinh chồi, tạo rễ và ra hoa [7, 8]. Tuy nhiên, hiệu quả tái sinh của thực vật phụ thuộc vào những thay đổi của hormone nội sinh và kết quả của các quá trình truyền tín hiệu tế bào thông qua việc vận chuyển PGRs từ môi trường đến tế bào/mô đích [9, 10]. Cho dù

hàm lượng PGRs trong môi trường tái sinh *in vitro* cao đến đâu, quá trình phát sinh hình thái xảy ra đều bị giới hạn bởi nồng độ hoặc khả năng sử dụng của hormone nội sinh trong mẫu thực vật [10, 11]. Bên cạnh đó, đã có các báo cáo cho thấy nồng độ hormone nội sinh có hiệu quả hơn trong quá trình tái sinh *in vitro* so với PGRs ngoại sinh [12-14].

Vì vậy, đề tài "**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**" lần đầu tiên tiến hành đánh giá mối tương quan giữa hormone nội sinh và quá trình phát sinh hình thái thông qua kỹ thuật TCL trên ba đối tượng cây trồng là cây ăn trái (cây chanh dây), cây hoa cắt cành (cây hoa đồng tiền) và cây dược liệu (cây diệp hạ châu) nhằm khẳng định vai trò của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái *in vitro* của thực vật.

Mục tiêu nghiên cứu

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.

Ý nghĩa khoa học của đề tài

Cung cấp các dữ liệu khoa học cơ bản về mối tương quan giữa hormone nội sinh và quá trình phát sinh hình thái thông qua sử dụng kỹ thuật TCL ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu.

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Góp phần nâng cao khả năng tái sinh của cây trồng nuôi cấy *in vitro* thông qua việc làm rõ mối tương tác giữa hormone nội sinh và quá trình phát sinh hình thái; từ đó, xác định được loại hormone nào là cần thiết cho từng giai đoạn phát sinh hình thái của thực vật.

Kết quả nghiên cứu có thể được ứng dụng để thiết lập quy trình nhân giống *in vitro* hiệu quả cho các loài cây có giá trị như chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đối tượng nghiên cứu

Mối tương quan giữa hormone nội sinh (IAA, CKs, GA_3, 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.

Phạm vi nghiên cứu

Đề tài tập trung nghiên cứu trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, sử dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL để khảo sát sự biến động và mối tương quan của hormone nội sinh, sự tích lũy của ethylene và hoạt độ của hệ thống chống oxy hóa trong quá trình phát sinh hình thái ở ba loài thực vật: hình thành chồi ở cây chanh dây, phát sinh phôi soma ở cây hoa đồng tiền và phát sinh mô sẹo, rễ bất định ở cây diệp hạ châu. Các nghiên cứu chỉ được tiến hành trong điều kiện phòng thí nghiệm.

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:

Nghiên cứu xác định được nguồn mẫu cấy tối ưu (vị trí lóng, độ tuổi của mẫu cấy) cho từng loài thực vật nhằm nâng cao hiệu quả phát sinh hình thái. Kỹ thuật TCL được chứng minh vượt trội so với kỹ thuật nuôi cấy truyền thống dựa trên hiệu quả tái sinh.

Nghiên cứu cung cấp thông tin khoa học về mối tương quan giữa các hormone nội sinh (IAA, CKs, GA_3, ABA, MEL, SA, JA) và quá trình phát sinh hình thái *in vitro*. Đặc biệt, luận án đã xác định được các tỷ lệ hormone quan trọng có ảnh hưởng điều hòa phân chia tế bào, cảm ứng mô và tái sinh cơ quan. Mối tương quan này khác nhau tùy theo giai đoạn và loại mẫu cấy, phản ánh cơ chế điều hòa hormone mang tính khác biệt theo loài và phụ thuộc điều kiện nuôi cấy.

Trong phạm vi nghiên cứu, các kết quả đã chứng minh vai trò điều hòa của ethylene trong nuôi cấy TCL, với sự tích lũy ethylene tương quan thuận với hiệu quả phát sinh hình thái. Phân tích hệ thống chống oxy hóa (SOD, CAT, APX, DPPH, phenolic) và hợp chất thứ cấp cho thấy TCL không chỉ cải thiện khả năng tái sinh mà còn tăng cường khả năng chống chịu và tích lũy hoạt chất sinh học, đặc biệt ở cây diệp hạ châu. Đây là những minh chứng quan trọng cho tiềm năng ứng dụng TCL trong sản xuất cây dược liệu và cây trồng có giá trị cao.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Phát sinh hình thái của thực vật

Phát sinh hình thái là vấn đề cơ bản và phức tạp của quá trình sinh trưởng của thực vật. Kể từ cuối thế kỷ trước, các định nghĩa khác nhau (không có sự mâu thuẫn) về khái niệm phát sinh hình thái đã được đề xuất: (1) một loạt các thay đổi liên tục trong quá trình phát triển cá thể dẫn đến sự hình thành cấu trúc không gian đặc trưng của loài [15]; (2) quá trình hình thành các cấu trúc khác nhau (không chỉ các cơ quan) ở cấp độ dưới phân tử, phân tử, siêu phân tử, tế bào, mô và toàn bộ cơ thể [16]; (3) quá trình xuất hiện các dạng và cấu trúc mới trong quá trình phát triển của cá thể [17]; (4) tổng hợp các quá trình biệt hóa tế bào diễn ra bên trong một sinh vật đa bào đang phát triển để hình thành và biệt hóa các mô và cơ quan chuyên biệt [18] và (5) sự hình thành và biệt hóa của các mô và cơ quan của một sinh vật đa bào [19]. Marchenko [18] đã đề xuất rằng sự phát triển cá thể của các sinh vật sống, sự tiến hóa vi mô và vĩ mô của chúng, có thể được coi là tiềm năng di truyền hình thái của tế bào. Hai con đường chính dẫn đến tái sinh toàn bộ cây - điều kiện tiên quyết cho hầu hết các ứng dụng tạo giống cây trồng, di truyền và chuyển gene - liên quan đến hình thành phôi soma hoặc tái sinh chồi sau đó là hình thành rễ. Quá trình tái sinh thực vật *in vitro* thông qua hai con đường chính là phát sinh cơ quan mới và phát sinh phôi soma. Hai con đường này chia sẻ một số đặc điểm chung là cả hai đều dựa vào tính toàn năng (totipotency) của các tế bào soma, sự kích thích của hormone nội sinh, trải qua quá trình tăng sinh, lập trình lại gene, phản biệt hóa và hấp thu năng lượng tạo cơ quan hoặc phôi soma, dẫn đến sự phát sinh và phát triển của thực vật [20, 21].

Quan điểm về khả năng tái sinh của tế bào thực vật bắt nguồn từ Haberlandt [22], ông đã đưa ra giả thuyết đầu tiên về thuyết toàn năng "về mặt lý thuyết, tất cả các tế bào thực vật đều có thể tạo ra một cây hoàn chỉnh". Trong khi Haberlandt chỉ thành công trong việc duy trì sự sống của mẫu mô thực vật trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, Hannig [23] đã thành công phân chia tế bào thực vật *in vitro* và Simon [24] là người đầu tiên tái sinh chồi từ mô sẹo. Tuy nhiên, phải mất nửa thế kỷ để kiểm soát quá trình tái sinh cơ quan thực vật: Skoog [25] đã thành công trong việc biệt hóa cơ quan bằng cách thay đổi nồng độ của auxin và cytokinin trong môi trường nuôi cấy. Kể từ đó, dựa trên các thí nghiệm của họ, quá trình tái sinh chồi đã được thiết lập cho

nhiều loại thực vật, với các ứng dụng chẳng hạn như trong vi nhân giống, tạo đột biến và đa bội. Một loạt các sự kiện xảy ra trước khi quá trình tái sinh chồi diễn ra [26] và tùy thuộc vào loài thực vật và mẫu cấy được sử dụng, các phương pháp xử lý khác nhau được áp dụng. Hơn nữa, mặc dù đối với một số cây, quá trình hình thành rễ diễn ra tự nhiên, nhưng đối với những cây khác, quá trình này khó hoặc thậm chí không thể đạt được [27]. Do đó, việc phát triển các giao thức tái sinh rễ và chồi hiệu quả cho nhiều loại cây có tầm quan trọng về mặt kinh tế vẫn còn khó khăn và chủ yếu là vấn đề thử nghiệm và sai sót và do đó, ít hoặc không có gene được chuyển được cho những loại cây này vì hạn chế về quy trình tái sinh hiệu quả.

Tái sinh cơ quan mới

Chồi và rễ có thể giữ lại chức năng mô phân sinh đỉnh của chúng ngay cả sau khi một phần mô phân sinh của chúng bị loại bỏ. Tuy nhiên, khi toàn bộ mô phân sinh bị cắt bỏ, các tế bào thực vật của các mô hoặc cơ quan đã biệt hóa có khả năng tạo ra các chồi và rễ mới thông qua quá trình tái sinh cơ quan mới [28]. Quá trình tái sinh của thực vật trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* bằng quá trình sinh cơ quan là kết quả của quá trình hình thành cơ quan thông qua quá trình phản biệt hóa của các tế bào đã biệt hóa và tổ chức lại quá trình phân chia tế bào để tạo ra các tế bào và mô phân sinh của cơ quan cụ thể sau khi liên kết các mạch dẫn giữa mẫu cấy và cơ quan mới tái sinh [29].

Tái sinh chồi là một quá trình quan trọng liên quan đến sự chuyển đổi số phận tế bào hàng loạt trong các tế bào mô sẹo và sự sắp xếp lại không gian của các đặc tính tế bào [30]. Đối với chồi bất định, đặc trưng cốt lõi là khả năng tái sinh cơ quan mới từ các mô đã biệt hóa. Khi mô phân sinh ban đầu bị loại bỏ hoặc mô thực vật bị tổn thương, các tế bào soma có thể trải qua quá trình phản biệt hóa, sau đó tái tổ chức hoạt động phân chia để hình thành mô phân sinh cơ quan, dẫn đến sự phát sinh chồi hoặc rễ bất định. Về mặt phát triển, các cơ quan tái sinh này thường được hình thành một cách hoàn chỉnh thông qua việc thiết lập hệ thống liên kết mạch dẫn giữa mẫu cấy ban đầu và cơ quan mới, đảm bảo sự vận chuyển nước, dinh dưỡng và tín hiệu điều hòa.

Ở cấp độ điều hòa sinh lý, sự thay đổi cân bằng auxin - cytokinin đóng vai trò quyết định trong định hướng biệt hóa cơ quan: nồng độ auxin cao tương đối thường thuận lợi cho sự hình thành rễ, trong khi cytokinin ưu thế thúc đẩy quá trình hình

thành chồi. Các nghiên cứu hiện đại tiếp tục làm rõ rằng quá trình tái sinh chồi *de novo* không chỉ phụ thuộc vào hàm lượng hormone mà còn chịu chi phối bởi hấp thu, vận chuyển phân cực và mạng lưới tín hiệu hormone trong mô cấy.

Trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, sự khởi đầu và biệt hóa các giai đoạn sinh lý của quá trình ra rễ bất định có thể được khởi đầu bằng sự thay đổi nồng độ auxin nội sinh trong mẫu cấy và việc bổ sung auxin ngoại sinh thích hợp vào môi trường nuôi cấy [31]. Rễ bất định có thể được hình thành thông qua quá trình sinh cơ quan trực tiếp từ các tế bào tầng sinh gỗ và quá trình sinh cơ quan gián tiếp từ các mô sẹo [32]. Bên cạnh đó, tín hiệu vết thương là một đặc trưng phổ biến của hệ thống nuôi cấy *in vitro*. Vết thương cơ học trong quá trình lấy mẫu có thể kích hoạt các đáp ứng phòng vệ sớm, bao gồm sự tích lũy các dạng oxy phản ứng, đồng thời khởi động các quá trình tái khởi động chu kỳ tế bào và tái tạo hệ mạch dẫn. Những đáp ứng này có tác động trực tiếp đến hiệu quả tái sinh chồi và rễ bất định.

Phát sinh phôi soma

Phát sinh phôi soma là phương pháp nhanh chóng và hiệu quả nhất để có thể sản xuất hàng loạt các cây giống với đặc điểm ưu việt nhằm đáp ứng nhu cầu sản xuất [33]. Nhiều yếu tố như nguồn gốc của mô cấy, môi trường nuôi cấy và điều kiện môi trường *in vitro* ảnh hưởng đến sự thành công hay thất bại của quá trình phát sinh phôi soma [34]. Quá trính phát sinh phôi soma là một quá trình phức tạp, trong đó các tế bào soma trải qua sự tái cấu trúc thông qua một loạt các thay đổi về hình thái, sinh lý và phân tử để hình thành các tế bào tạo phôi trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* và sau đó các tế bào tạo phôi này dần phát triển và chuyển hóa thành các mô qua các bước tương tự như quá trình tạo phôi hữu tính [35]. Đối với nhiều loài thực vật, tiềm năng tạo phôi soma giảm dần trong mô sẹo tạo phôi soma qua các lần tái nuôi cấy là vấn đề phổ biến và là một trong những vấn đề quan trọng ngăn cản việc áp dụng thương mại kỹ thuật quá trình phát sinh phôi soma [36].

Phôi soma mang đặc trưng của một cấu trúc phát triển độc lập, có tính lưỡng cực, đồng thời hình thành cực chồi và cực rễ ngay từ giai đoạn đầu. Quá trình phát sinh phôi soma phản ánh sự chuyển đổi trạng thái phát triển sâu sắc của tế bào soma sang chương trình phát triển kiểu phôi, cho phép hình thành cây hoàn chỉnh mà không cần giai đoạn sinh cơ quan trung gian. Về mặt ứng dụng, chồi bất định thường được khai thác trong các hệ tái sinh định hướng cơ quan, trong khi phôi soma đặc biệt phù

hợp cho nhân giống hàng loạt nhờ khả năng tạo số lượng lớn cá thể đồng nhất trong thời gian ngắn.

Tái sinh mô sẹo

Thực vật tạo ra các khối tế bào không có tổ chức, chẳng hạn như mô sẹo hoặc các mô tăng sinh bất thường, để đáp ứng với các căng thẳng, chẳng hạn như vết thương hoặc nhiễm mầm bệnh. Sự hình thành mô sẹo ở thực vật đã được mô tả cách đây hơn 200 năm [37]. Thuật ngữ "mô sẹo" bắt nguồn từ tiếng Latin là callum, có nghĩa là cứng và trong y học, nó ám chỉ sự dày lên của mô da. "Mô sẹo" trong những ngày đầu của sinh học thực vật đề cập đến sự phát triển mạnh của các tế bào và sự tích tụ mô sẹo liên quan đến vết thương. Ngày nay, cùng một từ này được sử dụng rộng rãi hơn và các khối tế bào không có tổ chức được gọi chung là mô sẹo. Mô sẹo có thể được tạo ra từ một tế bào biệt hóa duy nhất và nhiều tế bào mô sẹo là toàn năng, có khả năng tái tạo toàn bộ cơ thể thực vật [38].

Cả quá trình phát sinh cơ quan mới và phát sinh phôi soma đều có thể diễn ra có hoặc không có giai đoạn trung gian (thông qua mô sẹo) và có thể xảy ra một cách tự phát (không có chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh - PGRs) hoặc được kích thích bởi PRGs. Trong một số điều kiện nhất định, các tế bào mô sẹo cũng trải qua quá trình phôi soma, một quá trình trong đó phôi được tạo ra từ các tế bào soma trưởng thành [39]. Do đó, ít nhất một số dạng hình thành mô sẹo được cho là liên quan đến sự mất biệt hóa tế bào. Tuy nhiên, người ta cũng thừa nhận rằng mô sẹo rất đa dạng và có thể được phân loại thành các phân nhóm dựa trên các đặc điểm vĩ mô của chúng. Ví dụ, mô sẹo không có sự tái sinh cơ quan rõ ràng thường được gọi là mô sẹo xốp hoặc mô sẹo cứng. Các mô sẹo khác thể hiện một số mức độ tái sinh cơ quan được gọi là mô sẹo rễ, mô sẹo chồi hoặc mô sẹo phôi, tùy thuộc vào cơ quan mà chúng tạo ra [40]. Người ta cũng biết rằng các loại mô sẹo khác nhau ở *Arabidopsis thaliana* có hồ sơ biểu hiện gene riêng biệt [41]. Do đó, thuật ngữ mô sẹo bao gồm các tế bào có nhiều mức độ biệt hóa khác nhau.

Để nghiên cứu sự phát sinh hình thái của thực vật, nhiều phương pháp tiếp cận khác nhau đang được phát triển, bao gồm các phương pháp tiếp cận cấu trúc, sinh lý - sinh hóa. Phương pháp nuôi cấy *in vitro* có thể giúp nghiên cứu một cách chi tiết các quá trình phát sinh hình thái phức tạp và cơ chế điều chỉnh của chúng trong các

điều kiện thí nghiệm có kiểm soát, góp phần tìm hiểu các mô hình và đặc điểm của quá trình phát sinh hình thái ở thực vật [42].

Sự tái sinh của thực vật sau khi mô bị tổn thương được gọi là sự hình thành cơ quan mới, trong đó các cơ quan như chồi và rễ được tái sinh từ vị trí vết thương và các cơ quan bị tách ra. Một trong những yếu tố quan trọng tác động lên sự tái sinh của thực vật là mạng lưới tín hiệu vết thương, vì vết thương cơ học là hệ quả tất yếu của các thao tác trong quá trình nuôi cấy *in vitro*. Tín hiệu vết thương kích hoạt các phản ứng phòng vệ, chẳng hạn như sản xuất các gốc oxy hóa (Reactive Oxygen Species – ROS) làm ảnh hưởng đến quá trình tái sinh của thực vật [43], cũng như các phản ứng chữa lành vết thương bao gồm quá trình phân chia, kích hoạt lại chu kỳ tế bào và tái tạo mạch dẫn [44]. Do đó, vết thương có thể kích thích cảm ứng SE [45] và SD [46]. Mặt khác, hình dạng của mỗi tế bào thực vật còn phụ thuộc vào hướng mở rộng của tế bào, được quy định bởi các đặc tính của thành tế bào và đặc biệt là do hướng của các vi sợi cellulose trong thành tế bào [47, 48]. Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái của thực vật như môi trường nuôi cấy, loại PGRs bổ sung vào môi trường nuôi cấy, ánh sáng, …; trong đó mẫu cấy là một trong những yếu tố quan trọng tạo nên sự thành công của quy trình nuôi cấy mô thực vật. Một số yếu tố sinh học bao gồm kiểu gene (loài và cây trồng), mô hoặc cơ quan mà nó được tạo ra, tuổi của mô hoặc cơ quan mẹ, kích thước và hình dạng của nó đều dẫn đến sự thành công hay thất bại của quá trình phát sinh hình thái *in vitro* [49].

1.2. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin cell layer - TCL) là một phương pháp tiên tiến trong lĩnh vực nuôi cấy mô và tế bào thực vật, được phát triển với mục đích tối ưu hóa hiệu quả vi nhân giống. Không giống như các phương pháp cấy thông thường, TCL sử dụng các mẫu cấy siêu mỏng, thường có độ dày từ 0,1 đến 2 mm, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tái sinh nhanh chóng và hiệu quả. Phương pháp này lần đầu tiên được áp dụng thành công bởi Van vào năm 1973 trên cây thuốc lá. Kể từ đó, TCL đã được mở rộng ứng dụng thành công cho hơn 77 loài thực vật và cây lai khác nhau [48].

TCL không chỉ được đánh giá cao vì hiệu quả vi nhân giống mà còn bởi khả năng kiểm soát và lập trình các phản ứng hình thái khác nhau trong môi trường nuôi

cấy. Các nghiên cứu của Teixeira da Silva và Dobránszki [49] cùng Tung và cộng sự [50] đã nhấn mạnh tiềm năng vượt trội của TCL trong việc tái sinh thực vật. Một trong những lợi ích nổi bật của kỹ thuật này là khả năng tối ưu hóa các thông số nuôi cấy, bao gồm độ dày mẫu, vị trí lấy mẫu và tuổi của mẫu cấy, thông qua các thử nghiệm dọc theo trục mẫu cấy. Đối với các mặt cắt ngang (tTCL), kỹ thuật mô học giúp nghiên cứu chi tiết vai trò của từng loại tế bào và mô trong quá trình tái tạo. Trong khi đó, các mẫu cắt dọc (lTCL) cung cấp cái nhìn sâu hơn về sự phân bố và chức năng của các mô trong quá trình phát sinh hình thái.

Một ưu điểm khác của TCL là tính ổn định trong điều kiện nuôi cấy, với biến đổi thấp và thời gian phản ứng nhanh. Điều này đặc biệt quan trọng trong việc nhân giống các loài thực vật có giá trị kinh tế và sinh học cao như lan, cây thuốc, cây thân gỗ và rau màu. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng TCL có thể điều khiển quá trình hình thành các cấu trúc hình thái khác nhau như mô sẹo, chồi, rễ, hoa hoặc phôi soma thông qua việc kiểm soát môi trường nuôi cấy và bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs) [2].

Việc thực hiện TCL bắt đầu bằng khâu lấy mẫu từ các cơ quan hoặc mô thích hợp, đảm bảo xử lý khử trùng bề mặt nhanh chóng để tránh nhiễm khuẩn. Sau đó, mẫu được cắt thành các lớp mỏng hoặc siêu mỏng. Độ dày tối ưu của mẫu cấy, thường từ 0,1 - 2 mm, được xác định dựa trên mục tiêu tái sinh và loại cây trồng. Môi trường nuôi cấy được bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (PGRs) nhằm kích thích phản ứng tái sinh nhanh và hiệu quả. Đặc biệt, nhờ hàm lượng hormone nội sinh thấp, các mẫu TCL dễ dàng đánh giá sự biến động hormone trong quá trình tái tạo, cung cấp thêm hiểu biết về cơ chế kiểm soát hình thái và sự phát triển của thực vật [5]. Ngoài ra, các phương pháp mô học được áp dụng để nghiên cứu vai trò của các tế bào và mô chịu trách nhiệm trong quá trình tái tạo. Việc cắt mẫu lTCL hoặc tTCL giúp làm sáng tỏ các cơ chế sinh học phức tạp, từ đó mở ra cơ hội nghiên cứu và ứng dụng mới.

Kỹ thuật TCL đã được áp dụng thành công trên nhiều loài thực vật, từ các giống lan quý hiếm đến các loại rau màu và cây thân gỗ có giá trị kinh tế cao. Khả năng kiểm soát chặt chẽ các phản ứng hình thái, cùng với hiệu quả nhân giống vượt trội, đã chứng minh TCL là một công cụ mạnh mẽ trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực

vật. Các nghiên cứu gần đây tiếp tục khẳng định tính ưu việt của TCL trong việc tạo ra các giống cây trồng mới với tốc độ nhanh chóng và chi phí thấp.

Ngoài ra, TCL còn cho thấy tiềm năng lớn trong việc nghiên cứu cơ chế kiểm soát sự hình thành và phát triển của thực vật. Đặc biệt, khả năng tái sinh nhanh, cùng với tính ổn định và độ biến đổi thấp, giúp TCL trở thành một mô hình lý tưởng cho các thí nghiệm khoa học và các ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp [5].

1.3. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGR) có thể được định nghĩa là các hợp chất tự nhiên hoặc tổng hợp có tác động đến quá trình phát triển hoặc trao đổi chất ở thực vật bậc cao, chủ yếu ở liều lượng thấp [51]. PGR không có giá trị dinh dưỡng và thường không gây độc cho thực vật [51]. PGR được sử dụng trong nông nghiệp để đạt được những lợi ích cụ thể, chẳng hạn như giảm khả năng bị ảnh hưởng bởi stress sinh học và phi sinh học, cải thiện cấu trúc hình thái, tạo điều kiện thuận lợi cho việc thu hoạch, tăng năng suất về số lượng và chất lượng, và biến đổi các thành phần thực vật [51].

Ở nồng độ thấp, PGRs có khả năng ảnh hưởng đến sự phân chia, tăng sinh, cấu trúc và chức năng của tế bào. Việc ứng dụng trực tiếp vào rễ, chồi, lá, nụ và hoa của cây đã được chứng minh có khả năng làm tăng khả năng phục hồi đối với stress phi sinh học và sinh học, phá vỡ trạng thái ngủ đông của hạt, cải thiện khả năng chịu hạn, cải thiện khả năng chịu nhiệt, cải thiện hiệu quả sử dụng nitơ, thúc đẩy sự kéo dài và tạo ra chồi, tăng khối lượng chồi và rễ, kích thích sự phát triển của rễ và sự phát triển của rễ bên và thúc đẩy quá trình quang hợp [52]. PGRs thường được sử dụng trong nông nghiệp để cải thiện sự phát triển và năng suất cây trồng trong điều kiện đất và môi trường không lý tưởng [52]. Việc sử dụng PGRs có thể cải thiện quá trình cải tạo bằng cách tăng cường sự phát triển của các loài thực vật bản địa phát triển chậm và cây giống và giâm cành được cấy ghép; thúc đẩy sự tái phát triển của các hệ vi khuẩn đất (bao gồm cả vi khuẩn rễ); tăng cường sự phát triển của thực vật trong điều kiện stress, tăng khả năng thích nghi và phục hồi trong quá trình biến đổi khí hậu.

1.4. Hormone nội sinh thực vật

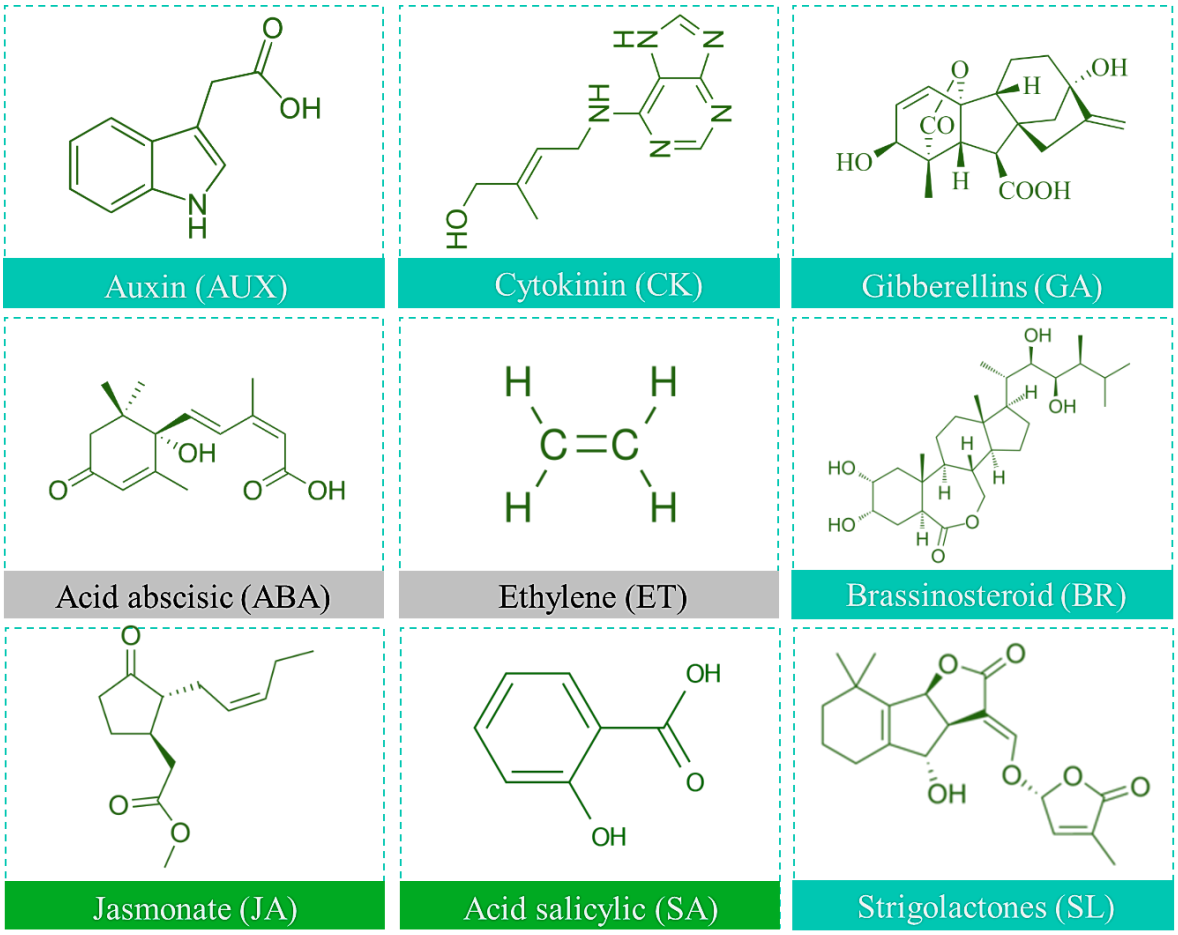
1.4.1. Khái niệm

Hormone nội sinh thực vật là các chất điều hòa quan trọng đối với sự tăng trưởng, phát triển của thực vật và các phản ứng với môi trường. Kiến thức về cơ chế truyền tín hiệu hormone nội sinh cho phép phát triển các công cụ di truyền để điều chỉnh sự phát triển của cây trồng, năng suất, khả năng thích nghi với môi trường, giải quyết các câu hỏi hiện tại trong sinh học thực vật và phát triển các khái niệm cho những thách thức của nông nghiệp trong tương lai. Phân tích và theo dõi hormone nội sinh trong cơ thể thực vật và tín hiệu của chúng cho phép khám phá các chức năng của hormone nội sinh dành riêng cho từng loại mô; tuy nhiên những nghiên cứu về quá trình vận chuyển và động lực của hormone nội sinh vẫn còn chưa được làm rõ [53].

Hormone nội sinh thực vật là các phân tử tính hiệu, có thành phần hóa học đa dạng: hợp chất indol, tecpen, dẫn xuất adenin, steroid, hydrocacbon béo và dẫn xuất của carotenoid hoặc acid béo [54], được tạo ra bên trong thực vật và xuất hiện ở nồng độ cực kỳ thấp. Hormone nội sinh kiểm soát tất cả các khía cạnh của quá trình sinh trưởng và phát triển của cây, từ hình thái phôi soma [55], điều chỉnh kích thước cơ quan, chống lại các mầm bệnh [56] khả năng chống lại các stress [57] và cả quá trình sinh sản [58]. Không giống như ở động vật, việc sản xuất hormone bị giới hạn ở các tuyến chuyên biệt, mỗi tế bào thực vật đều có khả năng sản xuất hormone. Went và Thimann [59] đã đưa ra thuật ngữ "phytohormone" và sử dụng nó trong tiêu đề cuốn sách của họ. Hormone nội sinh xuất hiện trên toàn bộ giới thực vật, thậm chí ở tảo và các hormone này có các chức năng tương tự như ở thực vật bậc cao [60]. Một số hormone nội sinh cũng xuất hiện ở vi sinh vật, chẳng hạn như nấm đơn bào và vi khuẩn; tuy nhiên trong những trường hợp này, chúng không đóng vai trò là hormone nội sinh mà có thể được coi là chất chuyển hóa thứ cấp [61].

Các hormone nội sinh thực vật khác nhau có thể được sắp xếp thành các lớp khác nhau, tùy thuộc vào cấu trúc hóa học của chúng. Trong mỗi lớp hormone, cấu trúc hóa học có thể khác nhau, nhưng tất cả các thành viên của cùng một lớp đều có tác dụng sinh lý tương tự nhau. Nghiên cứu ban đầu về hormone nội sinh thực vật đã xác định được 5 lớp chính: auxin (AUX), cytokinin (CKs), gibberellins (GA),

ethylene (ET) và abscisic acid (ABA) [62] (Hình 1.1). Danh sách này sau đó đã được mở rộng và bổ sung thêm brassinosteroids, jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA) và strigolacton hiện cũng được coi là các hormone nội sinh thực vật chính [53] (Hình 1.1). Ngoài ra, có một số hợp chất khác có các chức năng tương tự như các hormone chính, nhưng chúng có được xem là hormone thực vật hay không đang còn là vấn đề đang được tranh cãi. Hormone nội sinh thực vật gần như được chia thành hai nhóm dựa trên chức năng của chúng, chứ không phải tính chất hóa học của chúng; một nhóm là các hormone có liên quan đến các hoạt động thúc đẩy tăng trưởng, chẳng hạn như phân chia tế bào, kéo dài tế bào, biệt hóa tế bào, ra hoa, phát triển quả và hạt; các hormone trong nhóm còn lại đóng vai trò quan trọng trong việc cảm ứng của thực vật đối với vết thương, các stress sinh học và phi sinh học [54].



Hình 1.1. 9 nhóm hormone nội sinh chính của thực vật.

Auxin

Indole-3-acetic acid (IAA) là auxin (AUX) chính và đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh lý thiết yếu của thực vật [63]. Hormone này tham gia vào

việc điều chỉnh sự phát triển và tăng trưởng của thực vật thông qua các cơ chế phức tạp. Một trong những hoạt động nổi bật của IAA là cảm ứng sự phân chia tế bào, thúc đẩy sự phát triển của các mô và cơ quan thực vật. Đồng thời, IAA cũng kích thích sự kéo dài tế bào trong thân cây, hỗ trợ sự phát triển chiều cao của cây. IAA có vai trò điều hòa sự phân hóa tế bào, quyết định sự phát triển của các mô chuyên biệt, cũng như tối ưu hóa sự hấp thu và vận chuyển dinh dưỡng trong cây. Một cơ chế sinh lý quan trọng khác liên quan đến IAA là ưu thế ngọn, trong đó hormone này kiểm soát sự phát triển ưu tiên của chồi ngọn so với các chồi bên. Ngoài ra, IAA còn ảnh hưởng đến các giai đoạn phát triển sau này của cây, bao gồm lão hóa và ra hoa, đóng vai trò trong chu kỳ sống toàn diện của thực vật [64]. Nhờ vai trò đa dạng và thiết yếu, IAA là một thành phần trung tâm trong các nghiên cứu về sinh lý và điều hòa tăng trưởng của thực vật.

Cytokinins

Cytokinin (CKs) là các hormone nội sinh có cấu trúc dựa trên dẫn xuất adenine với nhóm thế N6, được biết đến chủ yếu nhờ khả năng kích thích phân chia tế bào trong nuôi cấy mô sẹo thực vật [25]. Tuy nhiên, ngoài vai trò cơ bản này, CKs còn tham gia vào nhiều quá trình sinh lý phức tạp trong các loại cây và mô khác nhau. Một trong những tác dụng quan trọng của CKs là khả năng làm chậm quá trình lão hóa, giúp kéo dài tuổi thọ của tế bào và mô thực vật. Chúng cũng có thể ức chế sự phát triển của rễ, điều chỉnh sự phân nhánh và hỗ trợ hình thành hạt, tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh sản của thực vật [65]. CKs còn đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng chống chịu với các loại stress từ môi trường, chẳng hạn như khô hạn, mặn và nhiệt độ cao, giúp cây thích nghi và phát triển trong điều kiện bất lợi. Về phân loại, CKs được chia thành hai nhóm chính: nhóm isoprenoid (bao gồm N6-2-isopentenyl và dihydrozeatin và nhóm có mùi thơm (bao gồm N6-benzyladenine, kinetin và meta-topolin) [66].

N6-furfuryladenine (Kinetin - KIN) lần đầu tiên được tách từ DNA tinh trùng cá herring hấp khô và được cho là sản phẩm tái tổ hợp DNA nhân tạo vào năm 1955 [67, 68]. Mặc dù KIN là CK đầu tiên được xác định nhưng phải mất hơn 40 năm mới tìm thấy nó trong thực vật như cùi dừa [69] cũng như nội nhũ của cây dừa tươi (*Cocos nucifera* L.) [70]. Zeatin (ZEA) là CK tự nhiên đầu tiên được biết đến, ZEA được

chiết xuất từ nội nhũ của cây ngô (*Zea mays*) [71]. N^6-(Δ^2-Isopentenyl)adenine (2iP) có vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự phân chia tế bào, sự phát triển và quá trình hấp thụ dinh dưỡng ở thực vật. 2iP được xác định là một CK nội sinh khi được phát hiện trong cánh hoa hồng [72].

N^6-(3-hydroxybenzyl) adenine (meta-topolin, mT) là một cytokinin thơm tự nhiên, lần đầu tiên được phân lập từ lá cây *Populus robusta*. Kể từ khi được phát hiện, đặc biệt trong hai thập kỷ qua, mT và các dẫn xuất của nó đã trở thành đối tượng nghiên cứu rộng rãi trên toàn thế giới. Nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc ứng dụng mT để phát triển các quy trình vi nhân giống, khắc phục các hạn chế trong nhân giống *in vitro* và so sánh hiệu quả của nó với các cytokinin khác. Các nghiên cứu cho thấy mT có hiệu quả vượt trội trong việc khởi đầu và tăng sinh chồi bất định so với các cytokinin phổ biến khác như KIN, 2iP và ZEA [73]. mT đã được ứng dụng trên nhiều loài thực vật nhằm cải thiện hiệu suất tái sinh, cảm ứng chồi bất định, tăng sinh cũng như nâng cao chất lượng chồi. Đồng thời, nó còn có vai trò quan trọng trong việc duy trì sự ổn định mô học và giảm thiểu các rối loạn sinh lý trong nuôi cấy [74].

Gibberellins

Gibberellins (GA) là nhóm hormone thuộc loại acid carboxylic diterpenoid, bao gồm các hợp chất có hoạt tính sinh học được tổng hợp bởi nhiều vi sinh vật như nấm và vi khuẩn, cũng như bởi thực vật bậc thấp và bậc cao. Trong thực vật, GA hoạt động như một chất điều hòa sinh trưởng nội sinh, đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh các quá trình phát triển và sinh lý [75]. Các GA có hoạt tính sinh học, chẳng hạn như Gibberellin acid A1 (GA_1) và Gibberellin acid A4 (GA_4), được biết đến với nhiều tác dụng nổi bật. Một trong những vai trò chính của GA là cảm ứng ra hoa, đặc biệt ở các loài thực vật cần xử lý lạnh hoặc ánh sáng dài ngày để kích thích quá trình này. Ngoài ra, GA cũng thúc đẩy sự nảy mầm của hạt thông qua việc kích hoạt enzyme và phá vỡ trạng thái ngủ đông của phôi. GA còn có khả năng kích thích sự kéo dài thân, hỗ trợ cây đạt chiều cao tối ưu, cũng như làm chậm quá trình lão hóa ở lá và trái cây có múi, giúp kéo dài thời gian bảo quản và tăng giá trị kinh tế.

Gibberellic acid A3 (GA_3) là một cacboxylic diterpenoid acid thuộc nhóm gibberellin và hoạt động như một hormone tăng trưởng thực vật tự nhiên [76]. Thực vật và một số vi sinh vật, chẳng hạn như nấm và vi khuẩn, sản xuất ra GA_3. GA_3 có

những ứng dụng đầy hứa hẹn trong lĩnh vực nông nghiệp công nghiệp nhờ các đặc tính liên quan đến sự phát triển của thực vật [76]. GA_3 được áp dụng cho cây trồng, vườn cây ăn quả và cây cảnh. Nó đóng vai trò trong quá trình nảy mầm của hạt [77], phản ứng với stress phi sinh học [78], tăng cường sinh trưởng của quả [79], kéo dài thân [80], ra hoa [81] và các tác động sinh lý khác xảy ra trong quá trình tương tác của nó với các hormone nội sinh khác [82].

Abscisic acid

Abscisic acid (ABA) được phát hiện vào đầu những năm 1960 khi nó được nhận diện có liên quan đến việc kiểm soát sự chết của hạt và hoại tử các cơ quan thực vật [83]. Nghiên cứu sau đó đã làm rõ rằng vai trò chính của ABA là điều chỉnh trạng thái ngủ của hạt và kiểm soát hoạt động mở khí khổng, một cơ chế quan trọng giúp thực vật duy trì cân bằng nước và khí [84]. Ngoài những vai trò này, ABA tham gia vào nhiều quá trình sinh lý khác, đặc biệt là sự trưởng thành của hạt, giúp cây hoàn thành chu kỳ phát triển và chuẩn bị cho giai đoạn sinh sản. ABA cũng đóng vai trò trung tâm trong phản ứng thích nghi với stress phi sinh học, chẳng hạn như khô hạn, mặn và nhiệt độ khắc nghiệt, giúp cây tồn tại trong điều kiện môi trường bất lợi [85]. Ngoài ra, ABA ảnh hưởng đến sự kéo dài chồi, điều chỉnh hình thái của cây trong điều kiện ngập nước [86] và duy trì sự phát triển của rễ, đặc biệt trong môi trường thiếu nước [87].

Ethylene

Ethylene (ET) là một hydrocarbon khí không no dễ cháy với trọng lượng phân tử là 28,05 g/mol. Gane [88] xác định ET là một sản phẩm thực vật tự nhiên và được Crocker và cộng sự [89] cho thấy ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và phát triển của cây. ET được hình thành trong tất cả các tế bào, nhưng thường nhiều nhất ở quả và các mô bị thương, khuếch tán qua các mô và cuối cùng được giải phóng vào bầu khí quyển xung quanh. ET là một hormone nội sinh ảnh hưởng đến hầu hết các giai đoạn phát triển của thực vật. Trong suốt vòng đời của thực vật, ethylene ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt, sự kéo dài của tế bào, sự hình thành giới tính, sự chín của quả, sự già đi và khả năng tổng hợp chất dinh dưỡng của quả. ET cũng là một chất gây ra các stress sinh học và phi sinh học [90].

Brassinosteroid

Brassinosteroid (BR) là một nhóm tương đối mới của hormone thực vật nội sinh [91]. Cho đến nay, hơn 70 chất tương tự BR đã được xác định trong gần 60 loài thực vật [92]. Về mặt sinh lý, BR tham gia cùng với các hormone thực vật khác trong việc điều hòa nhiều quá trình phát triển, bao gồm sự phát triển chồi, phát triển rễ, phân hóa mạch dẫn, khả năng sinh sản và nảy mầm của hạt [93]. BR cũng có tác dụng chống lại stress, tức là chúng tham gia vào các phản ứng cải thiện đối với các stress khác nhau, chẳng hạn như nhiệt độ thấp và cao, hạn hán và nhiễm trùng. Giống như GA, BR có xu hướng tích tụ trong các mô thực vật sinh sản, chẳng hạn như phấn hoa, hoa và hạt chưa trưởng thành, nhưng hàm lượng của chúng cực kỳ thấp trong các mô soma khi so sánh với các hormone thực vật khác [63].

Jasmonic acid

Jasmonic acid (JA) và các chất chuyển hóa của nó, được gọi chung là jasmonates (JAs), là các hợp chất cyclopentanone có chung cấu trúc và chức năng tương tự prostaglandin được tìm thấy ở động vật [94]. Trong những năm 1990, JA được đề xuất là các hợp chất liên quan đến stress, tích tụ trong thực vật để phản ứng với các stress khác nhau, chẳng hạn như vết thương hoặc sự tấn công của mầm bệnh [95], trong nuôi cấy mô hoặc nuôi cấy tế bào thực vật [96] và các mô chịu các tác nhân gây stress phi sinh học như bức xạ UV, nhiệt độ thấp và cao, stress thẩm thấu và tiếp xúc với ozone [97]. JA dường như có mặt ở hầu hết các cơ quan của hầu hết các loài thực vật [98].

Salicylic acid

Salicylic acid (SA) là một phân tử tín hiệu quan trọng trong các phản ứng phòng vệ của thực vật đối với mầm bệnh và điều hòa các quá trình phát triển khác nhau. SA có thể điều chỉnh sự tổng hợp các protein phòng thủ, bao gồm các enzyme phân hủy vi khuẩn và các phân tử kháng sinh tự nhiên, qua đó giúp thực vật đối phó với sự tấn công của nấm, vi khuẩn và côn trùng. Bên cạnh đó, SA còn tham gia vào quá trình ra hoa của thực vật. Nó có tác dụng điều chỉnh sự hình thành các chồi hoa và sự phát triển của hoa, thường xuyên thông qua tác động lên các con đường tín hiệu tế bào liên quan đến hormone nội sinh khác như auxin và gibberellin. Một số nghiên cứu đã chỉ

ra rằng SA có thể tác động lên sự thay đổi của các gene liên quan đến quá trình phân hóa mô hoa, làm tăng khả năng ra hoa ở một số loài thực vật, đặc biệt trong điều kiện căng thẳng hoặc thiếu dinh dưỡng [99].

Strigolactones

Strigolactones là loại hormone thực vật được mô tả gần đây nhất. Ban đầu chúng được coi là một họ các chất chuyển hóa thứ cấp từ thực vật có nguồn gốc từ carotenoid [100] với vai trò trong việc truyền tín hiệu giữa các sinh vật (chất hóa sinh). Cho đến nay, strigolactones đã được xác định là chịu trách nhiệm cho 3 quá trình sinh lý khác nhau: thứ nhất, chúng thúc đẩy sự nảy mầm của các sinh vật ký sinh phát triển trong rễ cây chủ, chẳng hạn như *Striga lutea* và các cây khác thuộc chi Striga [101, 102]; thứ hai, strigolactones là cơ sở để các loại nấm cộng sinh nhận biết cây, đặc biệt là nấm rễ arbuscular, bởi vì chúng thiết lập mối quan hệ tương hỗ với những cây này, đồng thời cung cấp photphat và các chất dinh dưỡng khác cho đất [101, 102]; thứ ba, strigolactones đã được xác định là hormone ức chế phân nhánh ở thực vật; khi có mặt, các hợp chất này ngăn chặn sự phát triển chồi dư thừa ở các đầu thân, ngăn chặn cơ chế phân nhánh ở thực vật [101, 102].

Melatonin – Một hormone nội sinh mới

Những nghiên cứu đầu tiên về vai trò của phytomelatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) chủ yếu tập trung vào khả năng chống oxy hóa mạnh mẽ của nó. Về mặt hóa học, phytomelatonin được đánh giá là một chất chống oxy hóa vượt trội, có tiềm năng cao hơn nhiều lần so với các chất chống oxy hóa truyền thống như axit ascorbic và vitamin E [103]. Tuy nhiên, khả năng điều hòa biểu hiện gene của phytomelatonin đã mở ra những hướng nghiên cứu mới về vai trò của nó như một hormone thực vật. Để một phân tử được công nhận là hormone thực vật, cần có đầy đủ thông tin về con đường sinh tổng hợp, phân hủy, vận chuyển, thụ thể, cơ chế truyền tín hiệu và tác động sinh lý của nó. Mặc dù nhiều điều kiện tiên quyết này đã được làm sáng tỏ, nhưng việc xác định thụ thể chuyên biệt của phytomelatonin vẫn là một thách thức. Mãi đến năm 2018, nhóm của Tiến sĩ Chen mới lần đầu tiên phát hiện và mô tả thụ thể phytomelatonin PMTR1, được xác định trong màng tế bào của cây *Arabidopsis thaliana* [104].

Thụ thể PMTR1 có cấu trúc tương tự các thụ thể hormone thực vật khác và có khả năng tương tác với tiểu đơn vị G-protein α (GPA1). Khi phytomelatonin liên kết với PMTR1, nó kích hoạt sự phân ly của Gγb và Gα, từ đó thúc đẩy sản xuất H_2O_2 thông qua enzyme NADPH oxidase (RBOH), tăng cường dòng Ca^{2+} vào tế bào và kích thích dòng K^+ ra ngoài, cuối cùng dẫn đến quá trình đóng khí khổng. Đây là một bước tiến quan trọng trong việc công nhận phytomelatonin như một hormone thực vật. Tuy nhiên, để củng cố kết luận này, cần có thêm nhiều nghiên cứu nhằm xác định thụ thể phytomelatonin ở các loài thực vật khác [105].

Melatonin không chỉ là một hormone quan trọng ở động vật mà còn được tìm thấy trong thực vật, nơi nó đóng vai trò như một chất điều hòa sinh trưởng và bảo vệ tế bào. Được tổng hợp từ tryptophan, melatonin có mặt trong nhiều bộ phận của cây như lá, rễ, hạt và quả, giúp điều hòa sự phát triển, bảo vệ thực vật khỏi stress oxy hóa và cải thiện khả năng chống chịu với điều kiện môi trường khắc nghiệt [106]. Nó kích thích nảy mầm, thúc đẩy sự phát triển của rễ, thân, hỗ trợ quá trình ra hoa, tạo quả và có thể thay thế hoặc phối hợp với auxin để điều chỉnh sinh trưởng. Bên cạnh đó, melatonin hoạt động như một chất chống oxy hóa mạnh, giúp cây giảm thiểu tác động từ ánh sáng mạnh, nhiệt độ cao, hạn hán, mặn và kim loại nặng bằng cách quét sạch các gốc tự do và tăng cường hệ thống phòng vệ nội sinh [107].

1.4.2. Hoạt động của hormone nội sinh

Tổng hợp và tích lũy

Sự tổng hợp hormone nội sinh thực vật được điều chỉnh chặt chẽ và thường bị ảnh hưởng bởi sự tương tác giữa các hormone khác và các yếu tố môi trường. Sau khi tổng hợp, nhiều hormone còn trải qua các biến đổi hóa học ảnh hưởng đến hoạt động của chúng; trong một số trường hợp, hormone không hoạt động có thể được tích lũy và dễ dàng giải phóng dưới dạng hoạt động thông qua việc đảo ngược các biến đổi này [108] (Hình 1.2).

Vận chuyển

Hormone có thể ảnh hưởng tại nơi chúng tác động, di chuyển khắp cơ thể thực vật thông qua hệ thống vận chuyển xylem hoặc phloem, hoặc di chuyển một khoảng

cách ngắn giữa các tế bào nhờ các protein vận chuyển, hoặc trong một số trường hợp, có thể khuếch tán tự do qua màng tế bào [108] (Hình 1.2).

Thụ thể

Hormone nội sinh phát huy tác dụng của mình trên các tế bào đích thông qua việc kết nối với các thụ thể protein. Một số hormone nội sinh liên kết với các thụ thể xuyên màng nằm ở màng plasma hoặc mạng lưới nội chất. Các thụ thể này sẽ kết nối với phân tử hormone tại một vị trí và truyền tải thông tin tới một vị trí khác và thường liên quan đến việc kích hoạt hoạt động của kinase thụ thể. Các thụ thể xuyên màng có thể coi như là các điểm chuyển tiếp thông tin; sự hiện diện của hormone khởi động một quá trình tại một vị trí xa hơn so với chính hormone đó, thông qua những thay đổi allosteric trong protein [108] (Hình 1.2).

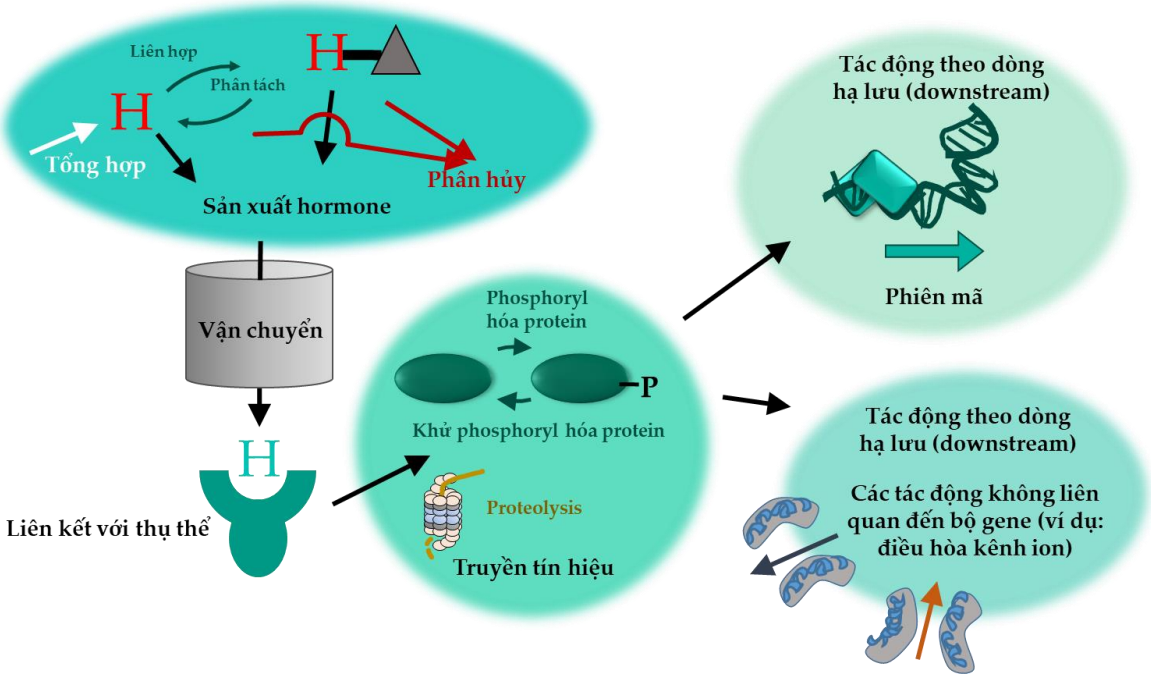
Truyền tín hiệu

Các tác động hạ lưu của tín hiệu hormone bao gồm sự thay đổi trong mô hình biểu hiện gene (Hình 1.2). Trong hầu hết các trường hợp, nhiều yếu tố phiên mã có sự thay đổi hoạt động theo tín hiệu hormone đã được xác định. Các bước từ việc hormone kết nối với thụ thể cho đến việc kích hoạt yếu tố phiên mã có thể đơn giản hoặc phức tạp và khi biết được, thường sẽ bao gồm tín hiệu thông qua protein kinase và phosphatase, hệ thống phosphorelay, hoặc sự phân hủy protein mục tiêu thông qua hệ thống phân hủy ubiquitin 26S [108].

Các protein kinase liên kết một nhóm phosphate vào các protein. Việc bổ sung nhóm phosphate (phosphorylation) có thể kích hoạt hoặc vô hiệu hóa một protein và quá trình này có thể bị đảo ngược bằng cách loại bỏ nhóm phosphate qua hoạt động của protein phosphatase. Các mục tiêu của kinase và phosphatase bao gồm chính các protein thụ thể (tự phosphoryl hóa), các protein kinase và phosphatase khác, kênh ion, TFs và các protein khác. Hình thức điều chỉnh protein này rất nhanh và có thể đảo ngược, có nguồn gốc từ thời kỳ xa xưa và rất phổ biến [108].

Một số tín hiệu hormone được truyền tải qua việc phân hủy có điều kiện một protein mục tiêu, thông qua việc ubiquitin hóa protein mục tiêu và sự phân hủy của nó bởi proteasome 26S. Ubiquitin là một protein nhỏ được liên kết với các protein khác qua hoạt động của một phức hợp ubiquitin ligase. Sau khi bị ubiquitin hóa, protein được chuyển đến phức hợp proteasome 26S lớn, nơi nó sẽ bị phân hủy. Quá

trình phân hủy protein ức chế đóng vai trò trung tâm trong một số con đường tín hiệu hormone, bao gồm AUX, GA và JA [108].



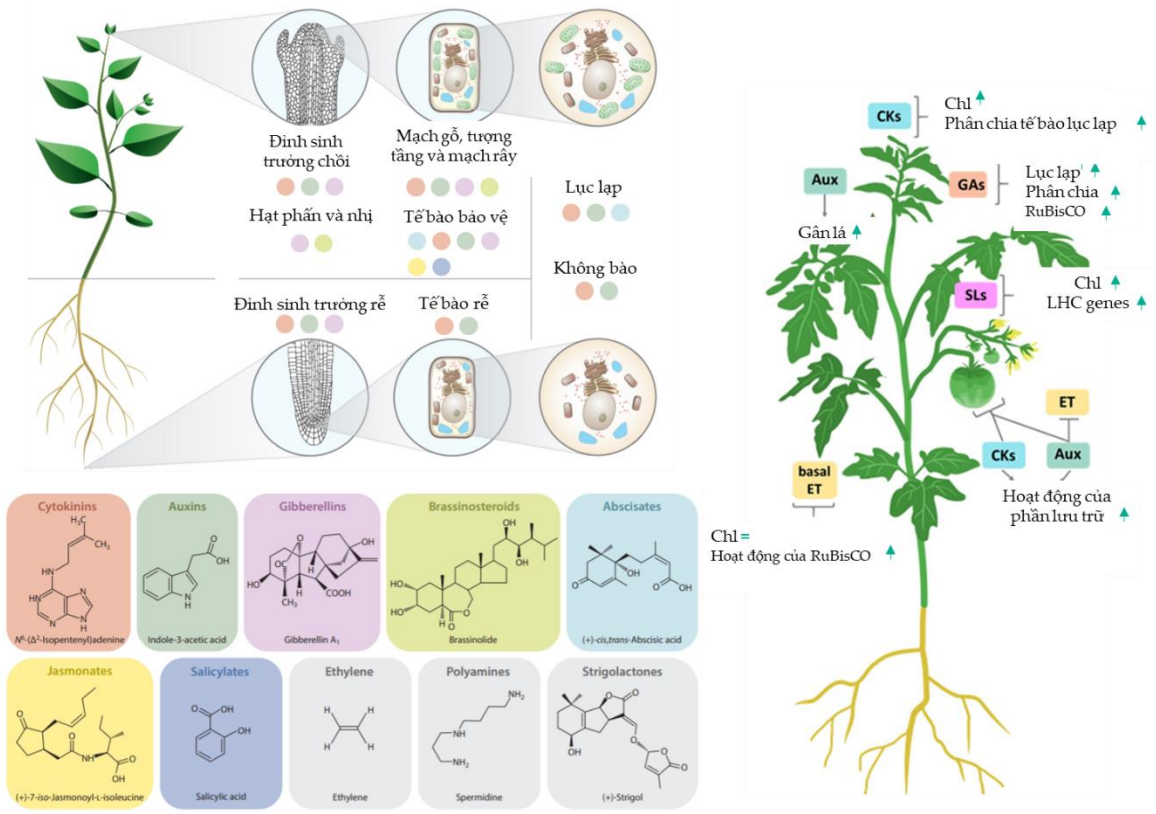
Hình 1.2. Hoạt động của hormone nội sinh trong thực vật [108].

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

Hormone nội sinh thực vật không phải là chất dinh dưỡng mà là các chất hóa học với một lượng nhỏ có khả năng thúc đẩy và ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, sự phát triển và sự biệt hóa của các tế bào và mô [109]. Quá trình sinh tổng hợp các hormone nội sinh trong các mô thực vật thường mang tính khuếch tán và không phải lúc nào cũng khu trú tại một vị trí nhất định. Không giống như động vật (có 2 hệ tuần hoàn để vận chuyển hormone khắp cơ thể), thực vật không có các tuyến chuyên biệt để sản xuất và lưu trữ hormone nên thực vật sử dụng nhiều phương pháp thụ động hơn để di chuyển các chất xung quanh cơ thể của chúng. Thực vật sử dụng các hóa chất đơn giản làm hormone để dễ dàng vận chuyển các chất qua các mô của chúng; ngoài ra, hormone thường được sản xuất và sử dụng tại chỗ trong cơ thể thực vật (Hình 1.3). Các hormone được vận chuyển trong cây bằng cách sử dụng 4 loại chuyển động. Để di chuyển cục bộ, dòng tế bào chất trong tế bào, sự khuếch tán chậm của các ion và phân tử giữa các tế bào được sử dụng. Các mô mạch được sử dụng để di chuyển hormone từ bộ phận này sang bộ phận khác của cây; chúng bao gồm mạch

rây dùng để di chuyển chất dinh dưỡng từ lá đến rễ và hoa, mạch gỗ dùng để di chuyển nước và các chất khoáng hòa tan từ rễ đến lá.

Tuy nhiên, không phải tất cả các tế bào thực vật đều phản ứng với hormone, nhưng những tế bào đó được lập trình để phản ứng tại các điểm cụ thể trong chu kỳ sinh trưởng của chúng. Các tác động lớn nhất xảy ra ở các giai đoạn cụ thể trong vòng đời của tế bào và các tác động giảm dần trước hoặc sau giai đoạn này. Thực vật cần hormone nội sinh vào những thời điểm rất cụ thể trong quá trình phát triển của cây và tại những vị trí cụ thể; vì vậy cần loại bỏ những ảnh hưởng của hormone khi chúng không còn cần thiết. Việc sản xuất các hormone diễn ra rất thường xuyên tại các mô phân sinh, trước khi các tế bào biệt hóa hoàn toàn. Sau khi sản xuất, chúng đôi khi được di chuyển đến các bộ phận khác của cây, nơi chúng ảnh hưởng ngay lập tức; hoặc chúng có thể được lưu trữ trong các tế bào để sử dụng sau này [110]. Thực vật sử dụng các con đường khác nhau để điều chỉnh hàm lượng bên trong và tác động của hormone; chúng có thể điều chỉnh lượng hóa chất được sử dụng để sinh tổng hợp hormone. Thực vật có thể lưu trữ hormone trong tế bào, bất hoạt hoặc làm tiêu biến các hormone đã được hình thành bằng cách liên hợp chúng với carbohydrate, amino acid hoặc peptit. Thực vật cũng có thể phá vỡ các hormone về mặt hóa học, phân hủy chúng một cách hiệu quả. Các hormone thực vật có bên trong cơ thể thực vật thường xuyên điều chỉnh nồng độ và tác động lẫn nhau [111]. Thực vật cũng di chuyển các hormone xung quanh cơ thể để làm loãng nồng độ và lượng hormone cần thiết cho các phản ứng của cây là rất thấp (10^{-6} - 10^{-5} mol/L). Do nồng độ thấp nên rất khó để nghiên cứu các hormone nội sinh thực vật và chỉ từ cuối những năm 1970, các nhà khoa học mới có thể bắt đầu kết hợp các tác động và mối quan hệ của chúng với sinh lý thực vật [54]. Phần lớn các nghiên cứu ban đầu về hormone nội sinh thực vật liên quan đến việc nghiên cứu các cây bị thiếu gene hoặc được sử dụng trong nuôi cấy thực vật *in vitro* với nồng độ hormone khác nhau.



Hình 1.3. Sự tích lũy và tác động của hormone nội sinh trong thực vật.

Các PGRs chẳng hạn như AUX, CKs, GA, ET và ABA được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô [7, 112]. Sự tăng trưởng và sự khác biệt trong nuôi cấy mô thực vật được kiểm soát bởi sự tương tác giữa các hormone nội sinh và ngoại sinh [113]. Nồng độ hormone nội sinh có ảnh hưởng quan trọng đến các quá trình sinh lý, cấu trúc thực vật [66] và sự khởi đầu của các trung tâm tăng sinh trong mẫu cấy [114]. Chúng thường được sử dụng để kiểm soát sự phân chia tế bào [115]. Các hormone nội sinh tham gia vào việc phát sinh hình thái và nồng độ của chúng được điều chỉnh theo thời gian và không gian để đáp ứng với các điều kiện nuôi cấy bên ngoài [116].

Trong vi nhân giống thực vật, hầu hết các nghiên cứu chỉ quan tâm đến ảnh hưởng của PGRs đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu mà không chú trọng tới tác động, vai trò của hormone nội sinh; trong khi đó, hiểu rõ về tác động, cơ chế truyền tín hiệu và mối tương tác của các hormone nội sinh cho phép phát triển các công cụ dược lý và di truyền để điều chỉnh sự phát triển của cây trồng, năng suất và khả năng thích nghi với môi trường nhằm hỗ trợ cho nông nghiệp. Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu về ảnh hưởng của hormone nội sinh đến sự phát sinh hình thái. Grossmann và cộng sự [117] đã nghiên cứu ảnh hưởng của IAA, ZEA, dihydrozeatin, Indole-3-propionic acid (iPA), GA_1 và ABA nội sinh đến sự hình thành cây đậu nành

hoàn chỉnh. Montalbán và cộng sự [113] đã chỉ ra ảnh hưởng của 43 loại cytokinin và IAA nội sinh đến khả năng hình thành chồi ở cây *Pinus radiate*. Ảnh hưởng của ethylene, JA và ABA đến sự hình thành rễ bất định [118], sự ra hoa [119], hình dạng của lá [120] cũng đã được nghiên cứu. Kępczyńska và Orłowska [121] đã nghiên cứu sự ảnh hưởng của ABA, GA và IAA nội sinh đến sự hình thành phôi soma ở cây *Medicago truncatula* Gaertn. Đến nay cũng đã có một số nghiên cứu về hàm lượng hormone nội sinh trong mẫu cấy ở các quá trình phát sinh hình thái/sinh trưởng khác nhau của một số loài thực vật khác nhau (Bảng 1).

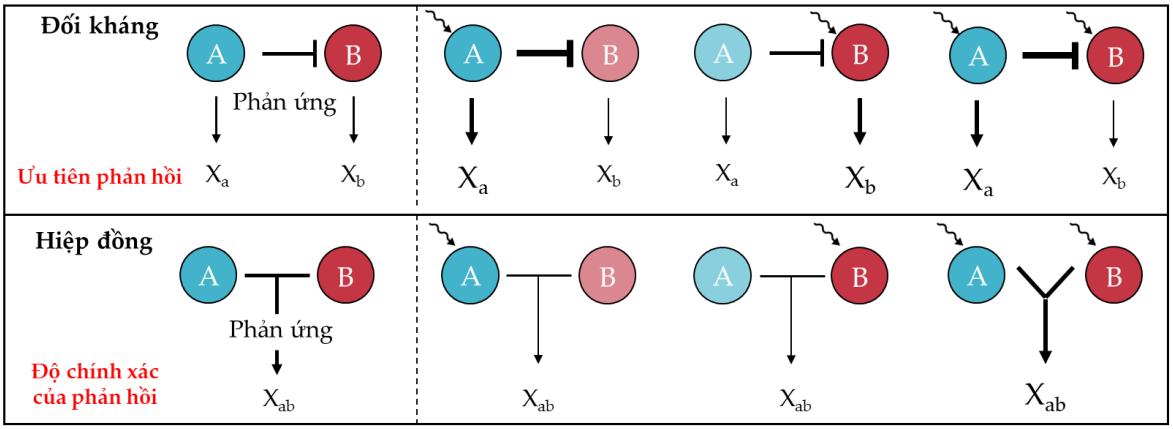
Bảng 1.1. Một số nghiên cứu ghi nhận hàm lượng hormone nội sinh trong mẫu cấy ở các quá trình phát sinh hình thái/sinh trưởng khác nhau của một số loài thực vật khác nhau.

STT	Phát sinh hình thái/sinh trưởng	Hormone nội sinh	Đối tượng nghiên cứu	Nguồn
1	Chồi	IAA, ZEA, GA_3, ABA	Thiên sơn tuyết liên	[122]
2	Quả	IAA, ZEA, GA_3, ABA	Cà chua	[123]
3	Sinh trưởng của cây	JA, SA, ZEA, ET	Cà chua	[124]
4	Rễ	IAA, ABA, ZEA, GA_3, JA, SL	Dâu tằm trắng	[125]
5	Sinh trưởng của cây	IAA, ABA, CKs, GA_3	Tử đinh hương	[126]
6	Phôi soma	IAA, CKs, GA, ABA	Thu hải đường	[127]
7	Phôi soma	IAA, CKs, GA_3, ABA, MEL	Sâm Lang Bian	[128]
8	Phôi soma	IAA, GA_3, ZEA, ABA, BR, MeJA	Thông Hàn Quốc	[129]
9	Rễ	IAA, CKs, GA_3, ABA	Chanh dây	[130]
10	Chồi bất định	IAA, CKs, GA_3, ABA	Chanh dây	[131]

Tuy nhiên, tỷ lệ hormone nội sinh thúc đẩy sự sinh trưởng thực vật quan trọng hơn nồng độ của một loại hormone đơn lẻ và có thể đóng vai trò then chốt [132]. Cây sâu keo mùa thu ăn lá đã kích thích rễ cộng sinh tổng hợp nhiều IAA, GA, ZEA và

JA hơn và làm tăng tỷ lệ IAA/ABA, GA/ABA, ZEA/ABA, IAA + GA + ZEA/ABA và ZEA/IAA ở thực vật rễ cộng sinh. Sự thay đổi tỷ lệ hormone này có thể có lợi cho sự sinh trưởng, phục hồi tổn thương, khắc phục thiệt hại do sâu bệnh và khả năng kháng sâu bệnh của cây, mặc dù các cơ chế cơ bản và ý nghĩa của các tỷ lệ hormone này cần được xác định.

Mạng lưới phức tạp của các con đường truyền tín hiệu hormone nội sinh cho phép thực vật kích hoạt các phản ứng phòng vệ thích hợp và hiệu quả chống lại các tác nhân gây bệnh và cân bằng khả năng phòng vệ và phát triển của thực vật [133]. Một trong những vấn đề thú vị nhất trong sinh học hormone thực vật là sự kết hợp của các hormone nội sinh, tương tác chéo hoặc điều hòa chéo [133]. Các con đường truyền tín hiệu được trung gian bởi các hormone nội sinh này tương tác chặt chẽ theo hướng đối kháng hoặc hiệp đồng (Hình 1.4). Sự điều hòa này quyết định kết quả của các phản ứng hạ lưu được kích hoạt bởi hormone nội sinh. Các tương tác hormone cùng nhau tạo thành mạng lưới truyền tín hiệu hormone, có chức năng truyền tín hiệu miễn dịch cũng như phản ứng tăng trưởng và căng thẳng phi sinh học [134]. Tầm quan trọng của mạng lưới truyền tín hiệu hormone trong phòng thủ được phản ánh bởi thực tế là nhiều tác nhân gây bệnh can thiệp vào tín hiệu hormone hoặc sản xuất hormone làm tăng độc lực [135]. Các nghiên cứu trên các mô hình thực vật, chẳng hạn như *Arabidopsis thaliana* đã phát hiện ra rằng các hormone nội sinh là chất điều hòa trung tâm của khả năng phòng vệ của thực vật. Ngoài ra, hầu hết các hormone nội sinh không tác động riêng lẻ lên một khía cạnh cụ thể của sự tăng trưởng hoặc phát triển; do đó, sự cân bằng giữa các hormone nội sinh trong nuôi cấy có thể là điều cần thiết. Tuy nhiên, các nghiên cứu hiện tại thường chỉ tập trung vào tác động của một hoặc một số ít hormone nội sinh đối với sự tăng trưởng và phát triển của thực vật mà không chú ý đến mạng lưới truyền tín hiệu của các nhóm hormone có trong mẫu cấy. Chính vì vậy, nghiên cứu này sẽ đánh giá mối tương quan giữa hormone nội sinh với quá trình phát sinh hình thái *in vitro* thông qua sử dụng kỹ thuật TCL trên 3 đối tượng cây trồng khác nhau (cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu).



Hình 1.4. Khái niệm cho vai trò trao đổi chéo đối kháng và hiệp đồng giữa hai hormone nội sinh giả định A và B [133]. Trao đổi chéo đối kháng có thể làm trung gian ưu tiên phản hồi Xa hơn Xb. Ngược lại, trao đổi hiệp đồng đảm bảo cảm ứng chính xác của phản hồi Xab chỉ khi cả A và B được kích hoạt. Hình minh họa cho thấy kết quả trong ba điều kiện kích thích khác nhau (chỉ A, chỉ B và cả A và B).

1.5. Sơ lược về đối tượng nghiên cứu

1.5.1. Cây chanh dây

Cây chanh dây (*Passiflora edulis*) là loài dây leo lâu năm, có thân bán gỗ, lá ba thùy, hoa lưỡng tính. Quả chanh dây hình bầu dục, đường kính 5-7 cm, trọng lượng từ 80-110 gam, chứa 100-180 hạt mỗi quả [136]. Cây phát triển tốt trong khí hậu cận nhiệt đới, cần ít nhất 900 mm mưa mỗi năm và ưa đất thịt pha cát với pH 6,5-7,5. Chanh dây có thể sinh trưởng trên nhiều loại đất và môi trường khác nhau, từ rừng ẩm nhiệt đới đến vùng khô hạn, với độ cao từ 0 đến 4.500 m.

Passiflora chủ yếu phân bố ở Trung và Nam Mỹ, trong đó Colombia có sự đa dạng loài cao nhất [137]. Các giống chanh dây thương mại chính là chanh dây tím và vàng. Quả được ăn tươi, ép nước hoặc chế biến thành các sản phẩm khác. Chanh dây chứa nhiều alkaloid, glycosid, flavonoid, cùng khoáng chất và protein [138]. Nó còn được sử dụng trong y học dân gian để giảm đau, chống viêm, ổn định huyết áp và hỗ trợ điều trị các bệnh lý như rối loạn thần kinh, bệnh tim mạch và ung thư [139]. Hạt chanh dây cung cấp chất xơ, protein và có thể chiết xuất dầu [140].

1.5.2. Cây hoa đồng tiền

Hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) là loài thảo mộc lâu năm, cao đến 75 cm, với lá dài 15-42 cm và hoa có đường kính 4-5 cm, thường màu đỏ cam, đôi khi vàng,

hồng, hoặc trắng. Hoa nở từ tháng 9 đến tháng 12 và sinh sản vô tính. Chi *Gerbera* gồm khoảng 100 loài, phân bố từ Châu Phi đến Châu Á [141, 142]. Cây này được trồng phổ biến như cây cảnh hoặc cắt cành, với giống chủ yếu là sự lai ghép giữa *G. jamesonii* và *G. viridifolia*, tạo thành giống Gerbera hybrida. Các giống hoa đồng tiền có nhiều màu sắc và hình dáng đa dạng.

Hoa đồng tiền hiện xếp thứ 5 trong ngành công nghiệp hoa cắt cành, nổi bật nhờ vẻ đẹp, màu sắc phong phú và độ bền cao. Việc trồng hoa đồng tiền đơn giản và hiệu quả kinh tế cao, do đó diện tích trồng và nhu cầu tiêu thụ đang tăng [143]. Loài hoa này chứa các hợp chất như coumarin, alkaloid, flavonoid, terpenoid và phenolic, có tác dụng kích thích tiêu hóa, điều trị táo bón, viêm dạ dày và các bệnh về gan. Cúc đồng tiền cũng được dùng để chữa viêm bàng quang, đau bụng kinh và các vấn đề đường tiết niệu [144].

1.5.3. Cây diệp hạ châu

Cây diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*), hay còn gọi là cây Chó đẻ, thuộc họ Phyllanthaceae, là cây thân thảo một năm, cao tới 60 cm, mọc thẳng đứng hoặc bò, lá có phiến tròn dài (5 - 11 × 3 - 6 mm). Cây mọc hoang ở Việt Nam, đặc biệt ở Thái Nguyên, Bắc Ninh, Nghệ An, Hà Giang và phân bố rộng rãi ở các quốc gia Châu Á và Châu Mỹ như Trung Quốc, Ấn Độ, Malaysia, Philippines, Indonesia, Myanmar, Thái Lan, Brazil, Argentina [145, 146].

Diệp hạ châu là cây thuốc dân gian, có nhiều hợp chất như acid, triterpen, alkaloid, phenol và lignan, trong đó phyllanthin và hypophyllanthin đặc biệt hữu ích trong điều trị bệnh gan. Các hợp chất này bảo vệ tế bào gan khỏi các tác nhân gây tổn thương như paracetamol, CCl_4, ethanol, aflatoxin B1, galactosamin và hỗ trợ giảm đau, tăng cường đào thải uric acid, ức chế virus viêm gan B và HIV (thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*) [145-148].

1.5.4. Một số nghiên cứu về ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu

Nhân giống *in vitro* ở cây chanh dây tím hiện nay chủ yếu dựa trên con đường tái sinh chồi. Trong số các phương pháp được áp dụng, kỹ thuật TCL được xem là một yếu tố quan trọng góp phần nâng cao hiệu quả tái sinh chồi ở cây chanh dây tím. Hiếu và cộng sự (2022) báo cáo rằng các mẫu lóng thân ex vitro chỉ hình thành mô

sẹo mà không phát sinh chồi khi nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* [149]. Ngược lại, Phong và cộng sự đã tái sinh thành công chồi từ các mẫu lóng thân *ex vitro* thông qua việc áp dụng kỹ thuật oTCL, đặc biệt trên mẫu lóng thân thứ ba.

Ở hoa đồng tiền, bên cạnh con đường nhân chồi từ đỉnh sinh trưởng, TCL được khai thác mạnh cho cảm ứng chồi bất định từ các mô hoa (đế hoa/cụm hoa) và các cơ quan khác; nhiều nghiên cứu cho thấy tTCL từ mô receptacle/capitulum là một hệ mẫu quan trọng để tạo chồi với tần suất cao và có thể tối ưu theo kiểu gen, vị trí - kích thước mẫu cấy và công thức môi trường.

Đối với diệp hạ châu, kỹ thuật TCL được báo cáo như một hệ thống nuôi cấy có tính ứng dụng cao trong tái sinh và vi nhân giống, với các thiết kế mẫu cấy TCL (đặc biệt từ lóng/thân) nhằm gia tăng hệ số nhân và đồng thời giảm hiện tượng bất thường hình thái. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chủ yếu tập trung vào yếu tố kỹ thuật và môi trường nuôi cấy, trong khi vai trò của hormone nội sinh trong mẫu cấy đối với khả năng tái sinh của thực vật vẫn chưa được đánh giá.

Trong bối cảnh nhu cầu nhân giống cây trồng có giá trị ngày càng cao, các phương pháp truyền thống bộc lộ nhiều hạn chế như hệ số nhân thấp, phụ thuộc mùa vụ và dễ nhiễm bệnh. Nhân giống *in vitro* là giải pháp quan trọng, nhưng nhiều quy trình vẫn mang tính thử nghiệm, thiếu cơ sở khoa học giải thích cơ chế sinh lý - sinh hóa. Việc nghiên cứu sâu hơn về biến động hormone nội sinh, kết hợp với phân tích vai trò của ET, hệ thống chống oxy hóa và hợp chất thứ cấp sẽ tạo nền tảng để xây dựng quy trình nhân giống hiệu quả, ổn định và có tính ứng dụng thực tiễn cao.

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu về tái sinh *in vitro* chủ yếu dừng ở việc khảo sát riêng lẻ từng loại hormone hoặc tối ưu môi trường nuôi cấy, việc phân tích đồng thời cơ chế tương tác giữa hormone nội sinh, ethylene, hệ thống chống oxy hóa và hợp chất thứ cấp vẫn còn hạn chế. Ở Việt Nam, chanh dây, hoa đồng tiền và diệp hạ châu là những loài có giá trị kinh tế và dược liệu cao, song nghiên cứu về vai trò toàn diện của hormone nội sinh trong nhân giống *in vitro* hầu như chưa được triển khai. Do đó, luận án này hướng tới việc sử dụng kỹ thuật TCL như một phương pháp tối ưu để khảo sát biến động hormone, làm rõ mối tương quan sinh lý - sinh hóa và ứng dụng kết quả nhằm xây dựng cơ sở khoa học cho tối ưu hóa quy trình nhân giống ba đối tượng nghiên cứu quan trọng này.

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 cấy tối ưu cho quá trình phát sinh hình thái *in vitro ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu*

Mục đích: Xác định được vị trí mẫu cấy, độ tuổi tối ưu và ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên quá trình phát sinh hình thái của cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu.

Nội dung tiến hành:

Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí lóng thân và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng tái sinh chồi của cây chanh dây nuôi cấy *in vitro*

Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tuổi mẫu cấy đế hoa và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng phát sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền nuôi cấy *in vitro*

Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí lóng thân và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng tái sinh mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu nuôi cấy *in vitro*

Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên khả năng tái sinh chồi của mẫu lóng thân cây chanh dây nuôi cấy *in vitro*

Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên khả năng phát sinh phôi soma của mẫu đế hoa cây hoa đồng tiền nuôi cấy *in vitro*

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 mẫu lóng thân cây diệp hạ châu nuôi cấy *in vitro*

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, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu

Mục đích: Nghiên cứu sự biến động và mối tương quan của hàm lượng hormone nội sinh trong trình phát sinh hình thái của cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu

Nội dung tiến hành:

Nghiên cứu sự biến động và mối tương quan giữa các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái của cây chanh dây thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

Nghiên cứu sự biến động và mối tương quan giữa các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái của cây hoa đồng tiền thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

Nghiên cứu sự biến động và mối tương quan giữa các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái của cây diệp hạ châu thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

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

Mục đích: Nghiên cứu sự biến động và mối tương quan của ET, hệ thống chống oxy hóa trong quá trình phát sinh hình thái của cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu.

Nội dung tiến hành:

Xác định sự tích lũy khí ethylene trong quá trình phát sinh hình thái của cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

Xác định hoạt độ của hệ thống chống oxy hóa trong quá trình phát sinh hình thái của cây chanh dây, cây hoa đồng tiền và cây diệp hạ châu thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

Xác định hợp chất thứ cấp trong rễ bất định của mẫu lóng thân cây diệp hạ châu nuôi cấy *in vitro*.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu thực vật

Đối với nội dung phát sinh hình thái *in vitro*, các mẫu lóng thân *in vitro* của cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*), đế hoa *ex vitro* cây hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii* Revolution Yellow) và lóng thân *in vitro* cây diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) hiện đang có tại 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) được sử dụng làm vật liệu ban đầu.

Đối với nội dung nghiên cứu mối tương quan giữa hàm lượng hormone và quá trình phát sinh hình thái, chồi tái sinh từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây, phôi soma tái sinh từ mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền, mô sẹo và rễ bất định tái sinh từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu được sử dụng để làm vật liệu phân tích.

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 cân kỹ thuật Precisa (Nhật Bản), cân điện tử, tủ an toàn sinh học ESCO (Singapore), tủ sấy MOV-112, hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng kết hợp đầu dò UV (Ultimate 3000 – Thermo Scientific, Mỹ), hệ thống sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-CP 3380).

Các dụng cụ sử dụng bao gồm dao cấy, đĩa cấy, panh cấy, kéo, ống nghiệm thủy tinh, đĩa petri nhựa (đường kính 6 cm), 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, 15 psi trong 30 phút.

Hóa chất

Các PGR bao gồm 6-Benzyladenine (BA, Sigma-Aldrich, Mỹ), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA, > 98%, Duchefa Biochemie, Hà Lan), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, > 96%, Duchefa Biochemie, Hà Lan), Indole-3-butyric acid (IBA, > 98%, Duchefa Biochemie, Hà Lan).

Các chất chuẩn được sử dụng trong phân tích hormone nội sinh bao gồm N6-isopentenyladenine (2iP, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Mỹ), kinetin (KIN, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Mỹ), Trans-Zeatin (ZEA, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Mỹ), N-acetyl-5-methoxytryptamine (MEL, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Mỹ), GA_3 (≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Mỹ), abscisic acid (ABA, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Mỹ), salicylic acid (SA, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Mỹ), 6-(3-hydroxybenzylamino) purine/Meta-topolin (mT, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Mỹ) và indole-3-acetic acid (IAA, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich,

Mỹ). Các chất khác bao gồm agar (Việt Xô, Việt Nam) và sucrose (Biên Hòa, Việt Nam).

2.2.3. Môi trường nuôi cấy

Môi trường Murashige và Skoog (MS) [150], được 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 được bổ sung vào môi trường MS tùy theo yêu cầu của từng thí nghiệm cụ thể, như đã được mô tả trong phần Phương pháp nghiên cứu. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về mức 5,8 trước khi tiến hành hấp tiệt trùng trong 30 phút ở nhiệt độ 121°C (15 psi).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

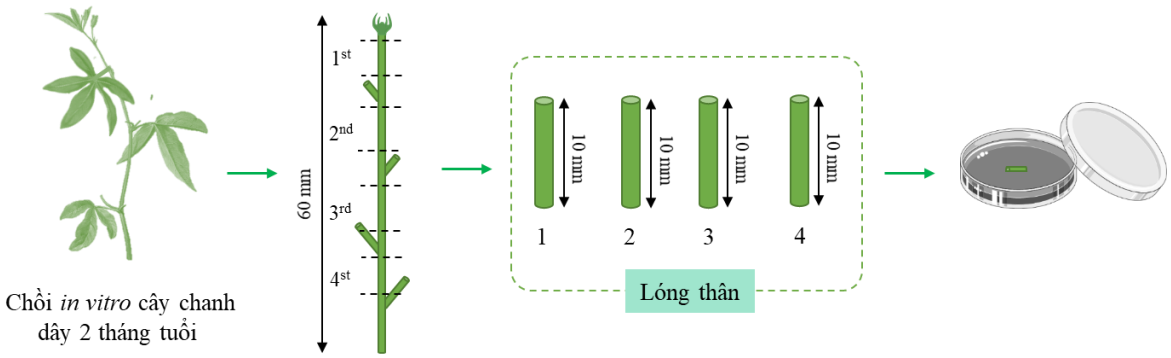
2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

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

Thí nghiệm 1.1: 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 chồi của mẫu lóng thân in vitro cây chanh dây

Phương pháp tiến hành:

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) (Hình 2.1) được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 8 g/L agar; 30 g/L sucrose; 1,5 mg/L BA và 1,0 mg/L NAA 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.



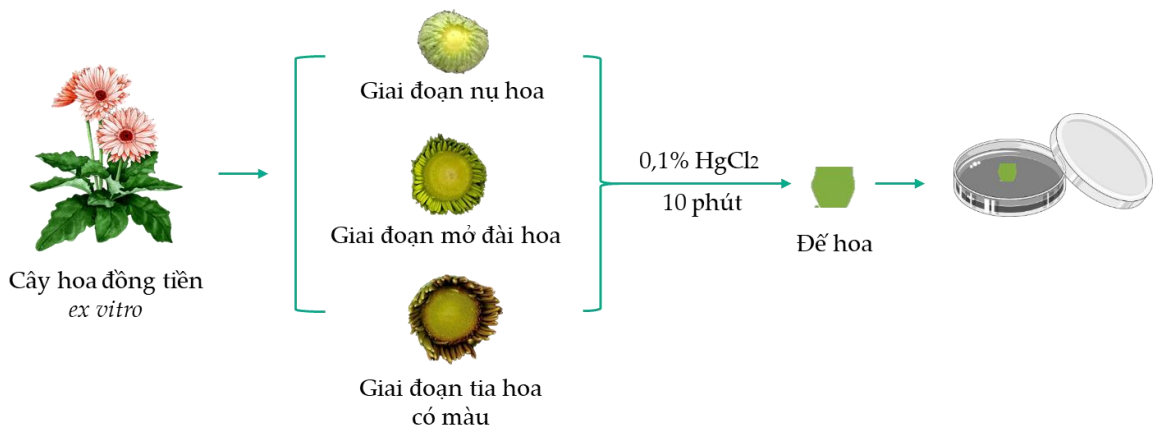
Hình 2.1. Sơ đồ thiết lập mẫu cấy lóng thân *in vitro* cây chanh dây.

Thí nghiệm 1.2: Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tuổi đế hoa và hàm lượng CKs và AUX trong mẫu cấy ban đầu lên khả năng phát sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền nuôi cấy in vitro

Phương pháp tiến hành:

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 tương ứng với 10, 12 và 14 tuần tuổi) được khử trùng theo quy trình của Masoud và cộng sự [151] (Hình 2.2). Đầu tiên, các nụ hoa được rửa dưới vòi nước chảy trong 15 phút. Sau đó, các mẫu nụ hoa được ngâm trong dung dịch xà phòng 0,01% trong 15 phút, rửa lại bằng nước máy ba lần và tiếp tục rửa dưới vòi nước chảy ít nhất 30 phút. Sau khi xử lý sơ bộ, các mẫu được chuyển vào tủ cấy, khử trùng bằng cồn 70° trong 30 giây và sau đó rửa sạch ba lần bằng nước cất vô trùng. Tiếp theo, các mẫu được khử trùng bằng dung dịch 0,1% $HgCl_2$ trong 10 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng ba lần.

Các mẫu đã chuẩn bị được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L TDZ, 0,8 mg/L adenin, 10% nước dừa, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [152] để đánh giá khả năng phát sinh phôi soma. Nghiên cứu cũng ghi nhận hàm lượng hormone nội sinh (CKs và IAA) trong các mẫu ban đầu (sau khi đã được khử trùng bề mặt) và tỷ lệ phát sinh hình thái (%) sau 90 ngày nuôi cấy.

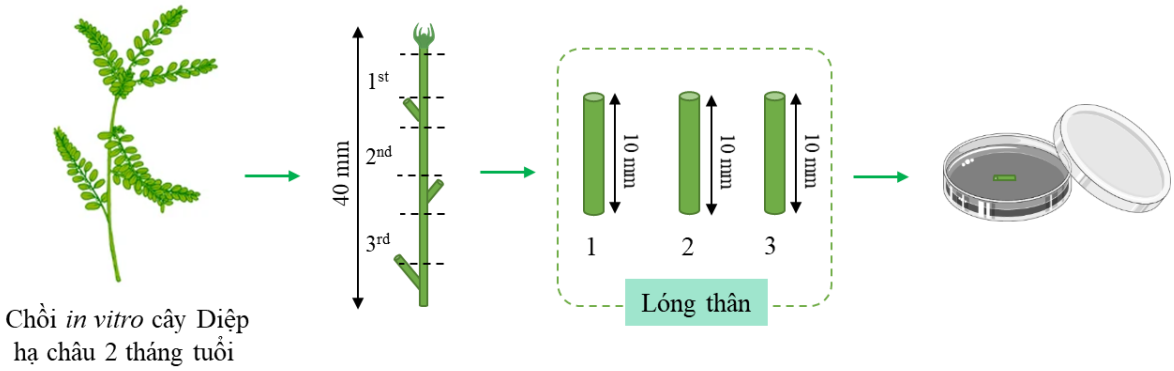


Hình 2.2. Sơ đồ thiết lập mẫu cấy đế hoa *ex vitro* cây hoa đồng tiền.

Thí nghiệm 1.3: 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

Phương pháp tiến hành:

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) (Hình 2.3) được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L sucrose và 0,22 mg/L BA 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.

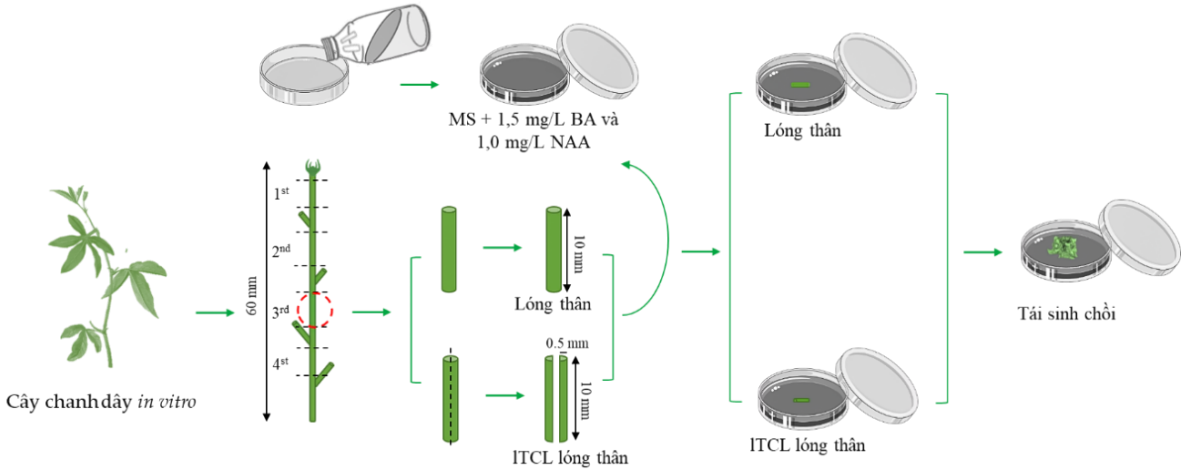


Hình 2.3. Sơ đồ thiết lập mẫu cấy lóng thân *in vitro* cây diệp hạ châu.

Thí nghiệm 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, hoa đồng tiền và diệp hạ châu

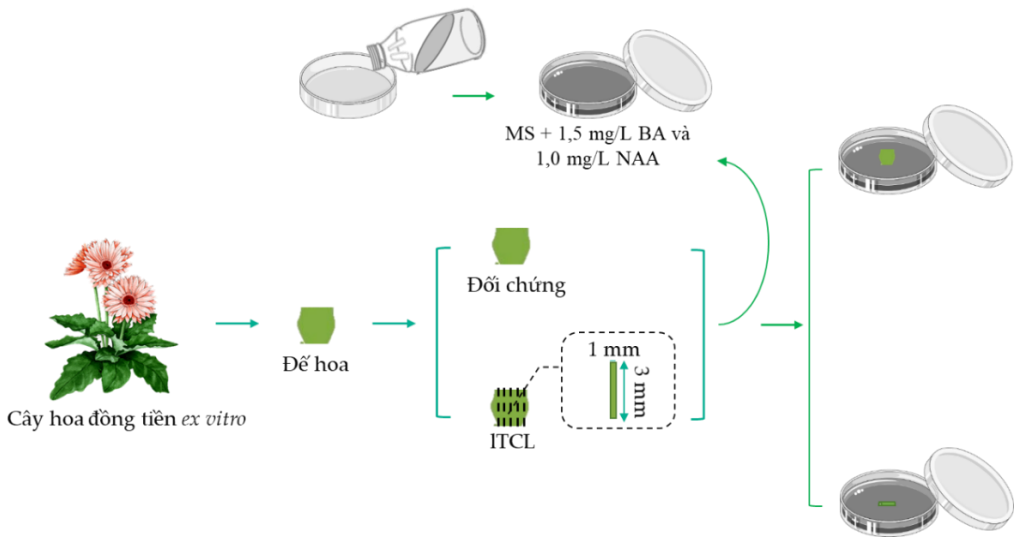
Phương pháp tiến hành:

Đoạn lóng thân của cây chanh dây 2 tháng tuổi (đoạn lóng thân thứ 3 tính từ trên xuống) dài 10 mm và đường kính khoảng 1 mm được cắt thành 2 phần bằng nhau theo chiều dọc (lTCL) có kích thước 0,5 × 10 mm và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L sucrose, 1,5 mg/L BA và 1,0 mg/L 1-Naphthaleneacetic acid (NAA). Đối chứng là mẫu lóng thân (1 × 10 mm) (Hình 2.4). Số chồi và chiều cao chồi (cm) được ghi nhận sau 15, 30, 60 và 90 ngày nuôi cấy.



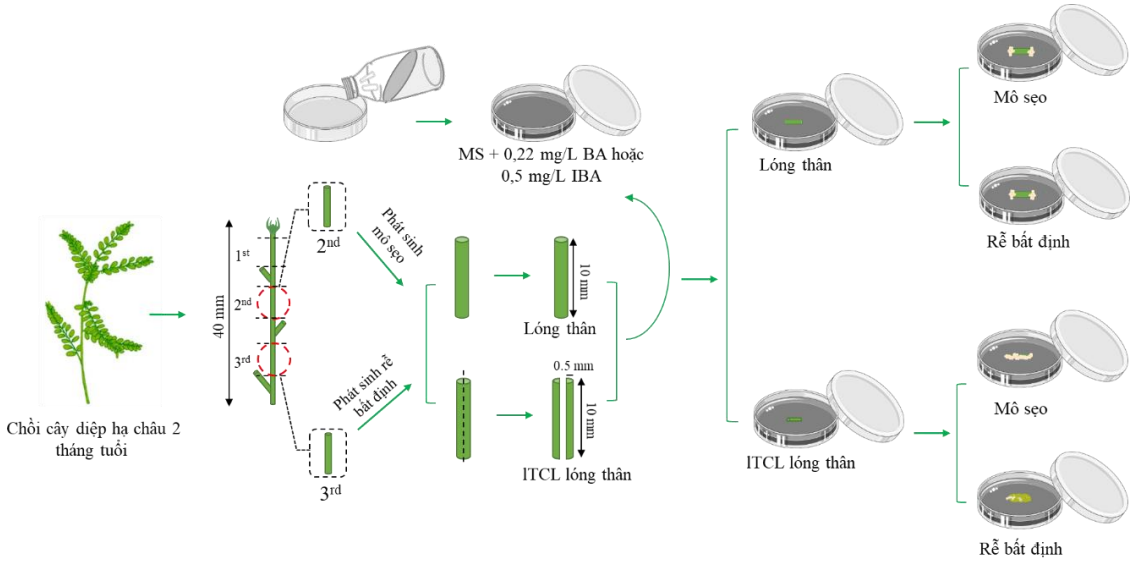
Hình 2.4. Quy trình thực hiện thí nghiệm phát sinh hình thái cây chanh dây nuôi cấy *in vitro* thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

Mẫu đế hoa của cây hoa đồng tiền (chiều dài khoảng 10 mm và đường kính xấp xỉ 20 mm) được cắt dọc thành bốn phần bằng nhau để tạo mẫu lớp mỏng tế bào (lTCL) với kích thước khoảng 0,5 × 10 mm. Các mẫu lTCL được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L TDZ, 0,8 mg/L adenine, 10% (v/v) nước dừa, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar. Đối chứng là mẫu đế hoa (Hình 2.5). Các chỉ tiêu như số phôi soma, tỷ lệ phát sinh phôi soma (%) được ghi nhận sau 30, 60, 90 và 120 ngày nuôi cấy.



Hình 2.5. Quy trình thực hiện thí nghiệm phát sinh hình thái *in vitro* của mẫu đế hoa cây hoa đồng tiền thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

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) có chiều dài 10 mm và đường kính khoảng 1 mm được cắt thành 2 phần bằng nhau theo chiều dọc (lTCL) có kích thước 0,5 × 10 mm và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,22 mg/L BA (đối với phát sinh mô sẹo) hoặc 0,5 mg/L IBA (đối với phát sinh rễ bất định), 30 g/L sucrose và 8 g/L agar. Đối chứng là mẫu lóng thân (1 × 10 mm) (Hình 2.6). Thời gian cảm ứng mô sẹo (ngày), khối lượng tươi của mô sẹo (g), Thời gian cảm ứng rễ bất định (ngày) và khối lượng tươi của rễ bất định (g) 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

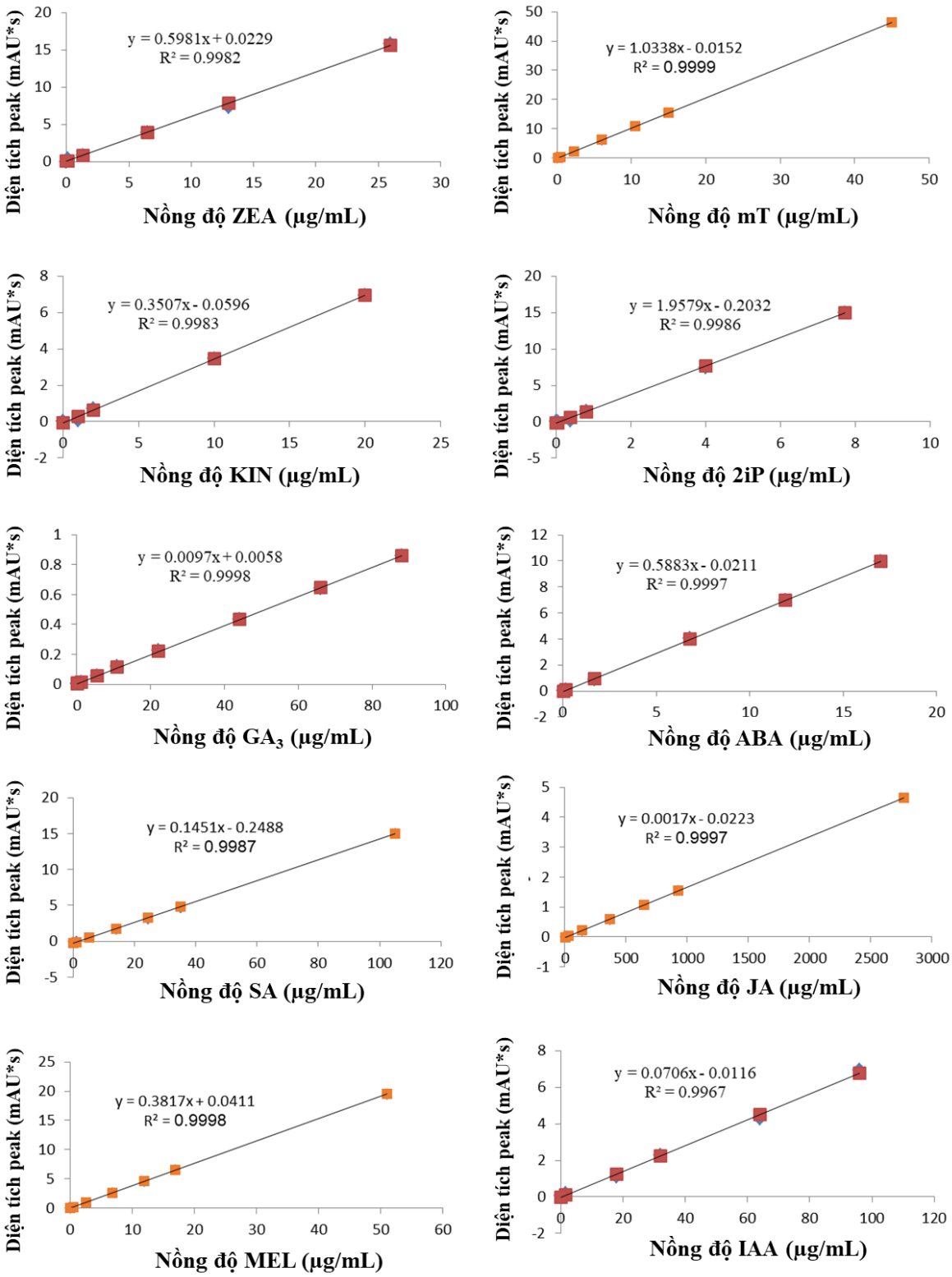
Thí nghiệm 2.1: Nghiên cứu sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái in vitro của cây chanh dây, hoa đồng tiền và diệp hạ châu

Phương pháp tiến hành:

1 g mẫu chồi của cây chanh dây, phôi soma của cây đồng tiền. mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu có nguồn gốc từ thí nghiệm 4 nội dung 1 được sử dụng làm vật liệu thực vật để phan tích hàm lượng hormone nội sinh.

Các mẫu tươi được nghiền trong dung dịch Bieleski gồm $CHCl_3$:MeOH:HCOOH:H_2O (25:60:5:10, v/v/v/v) với tỷ lệ 0,1 g nguyên liệu thực vật trên 1 mL dung dịch. Sau đó, hỗn hợp được chiết ở -30°C dưới điều kiện tối trong 4 giờ (mẫu được chia thành 2 phần; một phần được giữ nguyên và phần còn lại được bổ sung chất chuẩn ở các nồng độ đã biết). Mỗi mẫu sau đó được ly tâm ở 10000 g trong 10 phút ở 4°C và dịch nổi phía trên được chuyển vào một ống sạch. Phần kết tủa được chiết lại trong 4 mL metanol 80% trong 1 giờ ở 4°C trên máy lắc xoay và được ly tâm lại. Phần nổi phía trên được gộp lại và được nạp vào ống chiết Sep-Pak C18, đã được cân bằng với 1 mL metanol 100%, sau đó là 1 mL metanol 80%. Ống chiết được tráng bằng 500 µL 80% metanol. Dịch chiết tinh khiết được làm khô trong thiết bị bay hơi chân không ở 50°C để loại bỏ dung môi và hoàn nguyên bằng 1 - 2 mL nước có pH = 2 (điều chỉnh bằng formic acid). Dung dịch được lọc qua màng 0,45 µm trước khi bơm vào hệ thống UHPLC. Các hormone được phân tách bằng hệ thống Thermo-Ultimate 3000 HPLC (Thermi Scientific, USA) có kích thước hạt 25 mm × 4,6 mm, 0,5 mm (cột BDS Hypersil C18) và được kết nối với máy dò UV theo dõi ở các bước sóng khác nhau. Một hệ thống dung môi nhị phân đã được sử dụng; nó bao gồm (A) axetonitril (B) nước Milli-Q được acid hóa bằng formic acid 0,5%. Quá trình phân tách được thực hiện bằng cách sử dụng các thang độ phân đoạn 0 - 10 phút A từ 100% đến 75%, tiếp theo là 11 - 17 phút A từ 75% đến 50% và cuối cùng là 18 - 25 phút A từ 50% đến 75% với tốc độ dòng chảy là 0,7 mL/phút. Định lượng các hormone dựa vào quy trình đường chuẩn của các chất chuẩn ở cùng điều kiện

(Hình 2.7). Phân tích hormone nội sinh được tiến hành tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên.



Hình 2.7. Đường chuẩn của 10 hormone nội sinh được phân tích.

Thí nghiệm 2.2: 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

Phương pháp tiến hành:

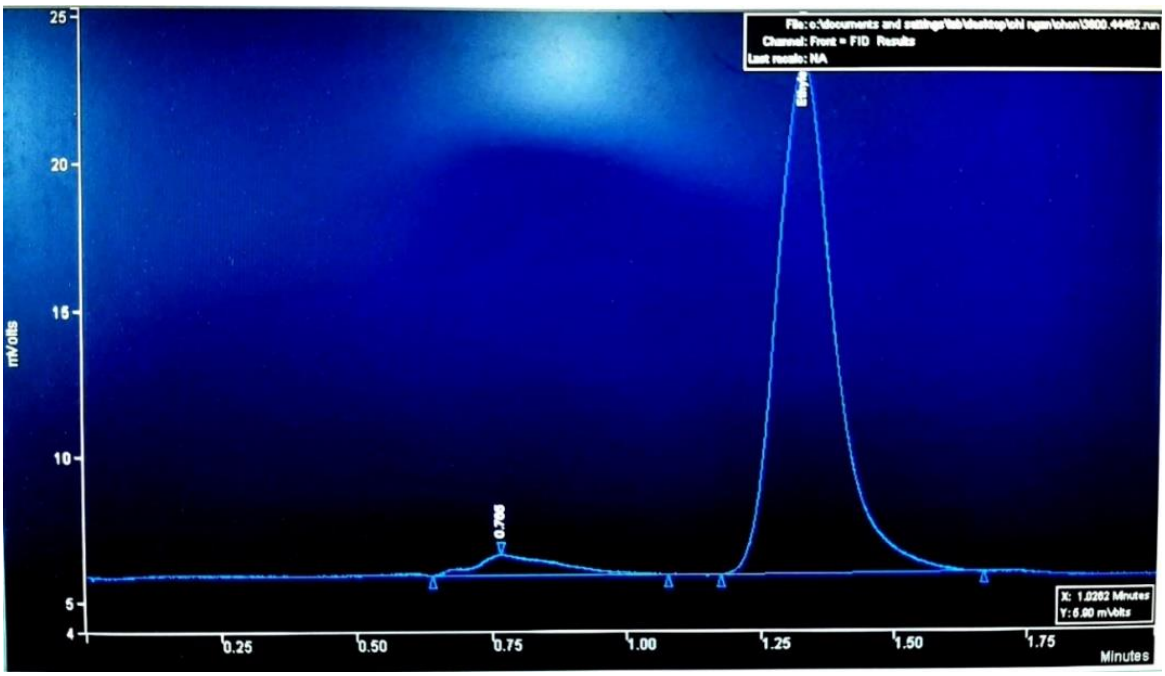
Hàm lượng các chất hormone trong mẫu chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền, mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu nuôi cấy *in vitro* được phân tích ở thí nghiệm trước đó được phân tích môi tương quan và thể hiện bằng biểu đồ heatmap (mối tương quan Pearson) bằng phần mềm OriginPro 2024b.

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 3.1: 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

Phương pháp tiến hành:

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. Khí trong hệ thống nuôi cấy được thu vào ống tiêm không rò rỉ 1 mL và được tiêm thủ công vào hệ thống GC-CP 3380. Một cột t hép không gỉ dài 3 m, đường kính 1,5 mm được nhồi Porapak P (lưới 80-100) đã được sử dụng. Nhiệt độ được đặt ở mức 60°C cho cột và 90°C cho cả ống tiêm và đầu dò ion hóa. Nitơ với lưu lượng 55 mL/phút đóng vai trò là khí mang để vận chuyển mẫu qua cột sắc ký [153]. Đường cong hiệu chuẩn được sử dụng để định lượng ET (Hình 2.8). Phân tích ET được tiến hành tại Viện cây ăn quả miền Nam.



Hình 2.8. Biểu đồ sắc ký khí chuẩn của ET

Thí nghiệm 3.2: 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

Phương pháp tiến hành:

0,3 g của các mẫu cấy tươi (mẫu chồi của cây chanh dây, phôi soma của cây đồng tiền, mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu ở các mốc thời gian nuôi cấy khác nhau có nguồn gốc từ thí nghiệm 4 nội dung 1) được nghiền thành bột với nitơ lỏng và đồng nhất trong 2 mL đệm phosphate 0,1 M (pH 7,4) có chứa 0,1 mM EDTA. Dịch đồng nhất được ly tâm ở tốc độ 15.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Phần dịch nổi được thu thập và bảo quản trong đá để xác định hoạt động của các enzyme chống oxy hóa bao gồm superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), DPPH và tổng hàm lượng phenolic. Các phân tích được thực hiện tại Đại học Y Dược TP. HCM.

Hoạt động SOD được đo bằng cách ngăn chặn quá trình oxy hóa pyrogallol trong môi trường kiềm với độ hấp thụ ở 320 nm. Một đơn vị (U) hoạt động SOD được định nghĩa là lượng cần thiết để ức chế quá trình tự oxy hóa pyrogallol xuống 50% [154].

Đơn vị enzyme (U/g prot) = (% ứng chế/50) × hệ số pha loãng

Hoạt động CAT được đánh giá bằng cách cho mẫu phản ứng với 100 µL hydrogen peroxide (H_2O_2) 65 mM trong 2 phút. Phần H_2O_2 còn lại phản ứng với amoni molybdate để tạo thành phức hợp màu vàng ở 405 nm. Một đơn vị (U) hoạt động catalase bằng thủy phân 1 µmol H_2O_2 mỗi phút [155].

Hoạt động APX được xác định bằng phương pháp của Nakano và Asada [156]. Enzyme khử ascorbate, đo ở 290 nm khi có 0,5 mM H_2O_2. Một đơn vị (U) hoạt động APX oxy hóa 1 µm ascorbate mỗi phút trong điều kiện thử nghiệm.

Hoạt động dọn gốc DPPH được đo dựa trên sự tương tác giữa chất chống oxy hóa và DPPH trong mẫu cấy. Chất chống oxy hóa khử DPPH (màu tím) thành dạng khử (màu vàng nhạt), dẫn đến giảm hấp thụ [157]. Tỷ lệ phần trăm loại bỏ gốc DPPH (RSA) được tính bằng công thức sau:

$$RSA\ (\%) = (Ak - Am)/Ak \times 100$$

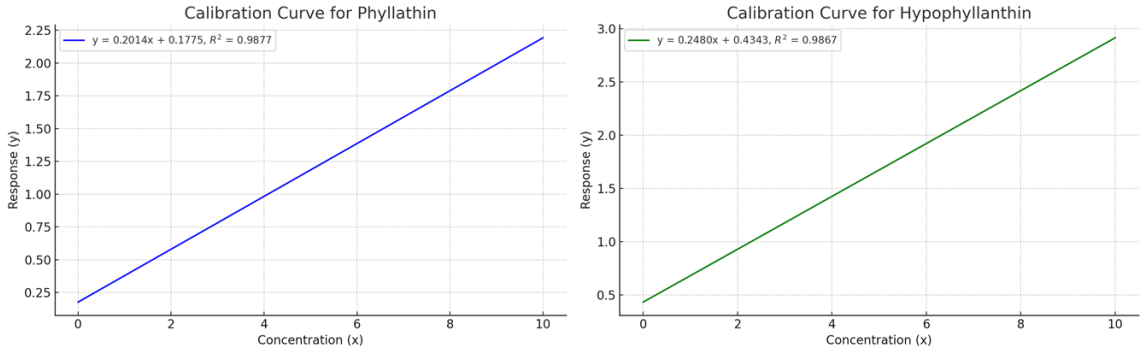
Trong đó: RSA là hoạt động loại bỏ gốc, được biểu thị bằng phần trăm (%); Ak là mật độ quang của mẫu trắng; Am là mật độ quang của mẫu cấy thử nghiệm.

Tổng hàm lượng phenolic được xác định thông qua phân tích màu sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu, thuốc thử này chuyển màu từ vàng sang xanh lục đậm khi có chất chống oxy hóa [158]. Tổng hàm lượng phenolic của mẫu cấy được tính toán dựa trên đường cong chuẩn và độ hấp thụ của nó, được biểu thị bằng miligam axit gallic tương đương (mg GAE) trên 100 gam trọng lượng khô.

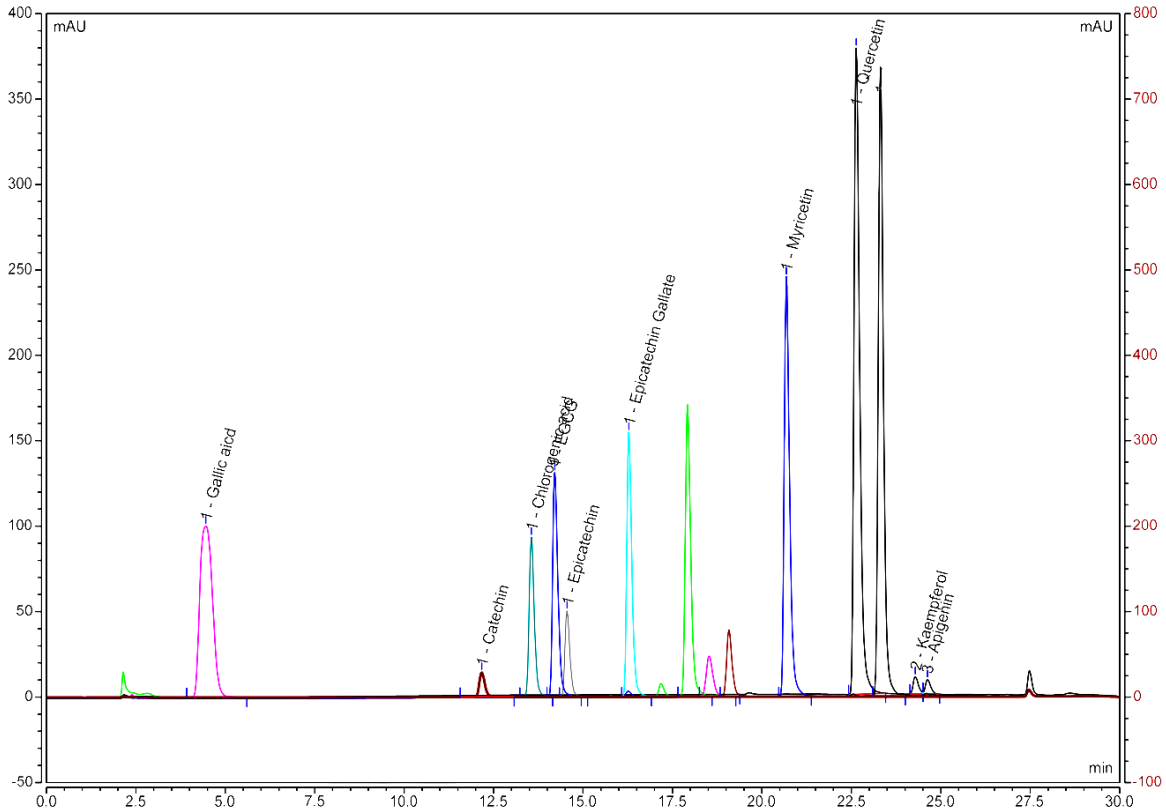
Thí nghiệm 3.3: Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên sự tổng hợp các hợp chất thứ cấp của rễ bất định cây diệp hạ châu

Chiết xuất ethanol 80% của 1 g rễ bất định có nguồn gốc từ các đoạn thân đốt và các đoạn thân đốt lTCL sau 60 ngày nuôi cấy được phân tích bằng hệ thống Thermo-Ultimate 3000 HPLC (Thermi Scientific, USA) theo phương pháp của Harikrishnan và cộng sự [159]. Các dung dịch gốc (20 mg/mL) được siêu âm trong 15 phút và lọc qua màng PTFE Millex 0,45 µm. Các chất chuyển hóa thứ cấp chuẩn (1 mg/mL) được pha loãng (1000 - 125 µg/mL) và phân tích bằng cột XBridgeTM C-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). Pha động bao gồm acetonitril (dung môi A) và nước với 0,1% orthophosphoric acid (dung môi B) với tốc độ rửa giải isocratic là 1,0

mL/phút. Các đường chuẩn và sắc ký đồ được sử dụng để định lượng các hợp chất này (Hình 2.9 và 2.10).



Hình 2.9. Đường chuẩn của phyllanthin và hypophyllanthin.



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 sử dụng trong nghiên cứu

2.3.2.1. Quan sát hình thái giải phẫu

Hình thái của mẫu thực vật được chuẩn bị theo phương pháp của Peterson và cộng sự [160]. Quá trình chuẩn bị mẫu bắt đầu bằng việc cắt các mẫu thành lát mỏng có độ dày từ 30 đến 40 µm, sau đó ngâm trong dung dịch Javel 10% trong 15 phút, tiếp theo là rửa sạch bằng nước cất. Các mẫu tiếp tục được xử lý bằng dung dịch

acetic acid 10% trong 10 phút, sau đó rửa lại ba lần bằng nước cất để loại bỏ hoàn toàn dung dịch. Sau khi rửa sạch, các mẫu được nhuộm với dung dịch đỏ carmine trong 5 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất cho đến khi không còn dư lượng thuốc nhuộm. Cuối cùng, các mẫu được đặt lên lam kính, thêm một giọt nước hoặc glycerin, rồi phủ lamen lên trên. Các mẫu sau đó được quan sát dưới kính hiển vi điện tử (Olympus CH30, Olympus, Nhật Bản).

2.3.2.2. Phương pháp xử lý thống kê

Tất cả các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, 30 mẫu/nghiệm thức (đối với nội dung 1). 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 1 yếu tố ở mức ý nghĩa $p < 0,05$ [161]. Các biểu đồ (± SD) được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và heatmap được xử lý bằng OriginPro 2024b (mối tương quan Pearson).

2.3.3. Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được thực hiện trong phòng nuôi cấy với nhiệt độ duy trì ở mức 25 ± 2°C, độ ẩm từ 55 - 60% và thời gian chiếu sáng là 16 giờ mỗi ngày (sử dụng đèn huỳnh quang với cường độ chiếu sáng 40 - 45 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) cho tất cả các giai đoạn nuôi cấy.

2.3.4. Địa điểm và thời gian thực hiện luận án

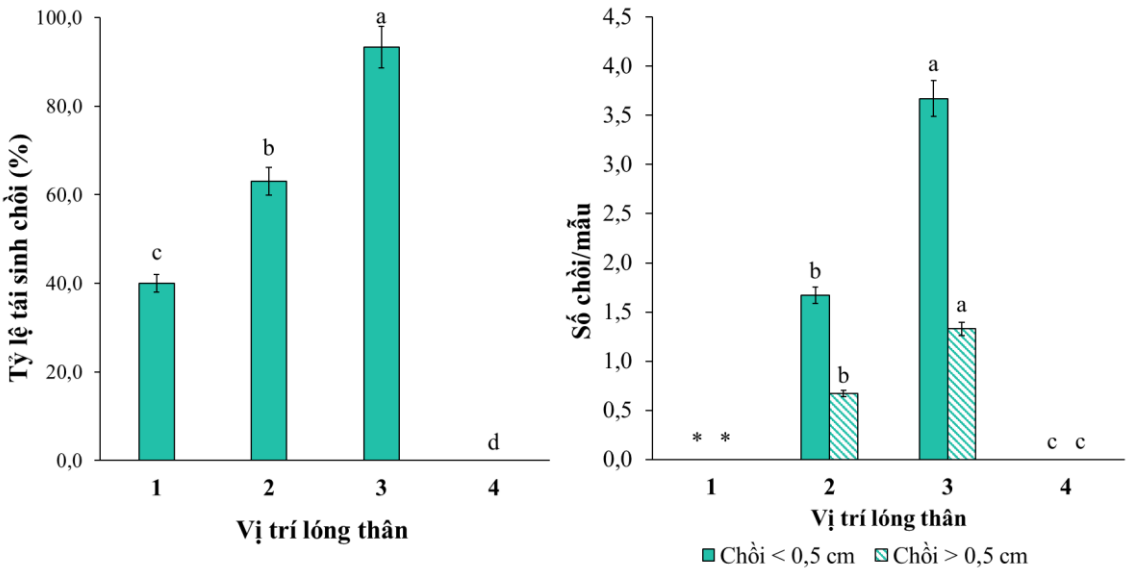
Các thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Khoa học sự sống (trước đây là Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường Lang Biang - Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng). Thời gian thực hiện luận án từ 2021 – 2025.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

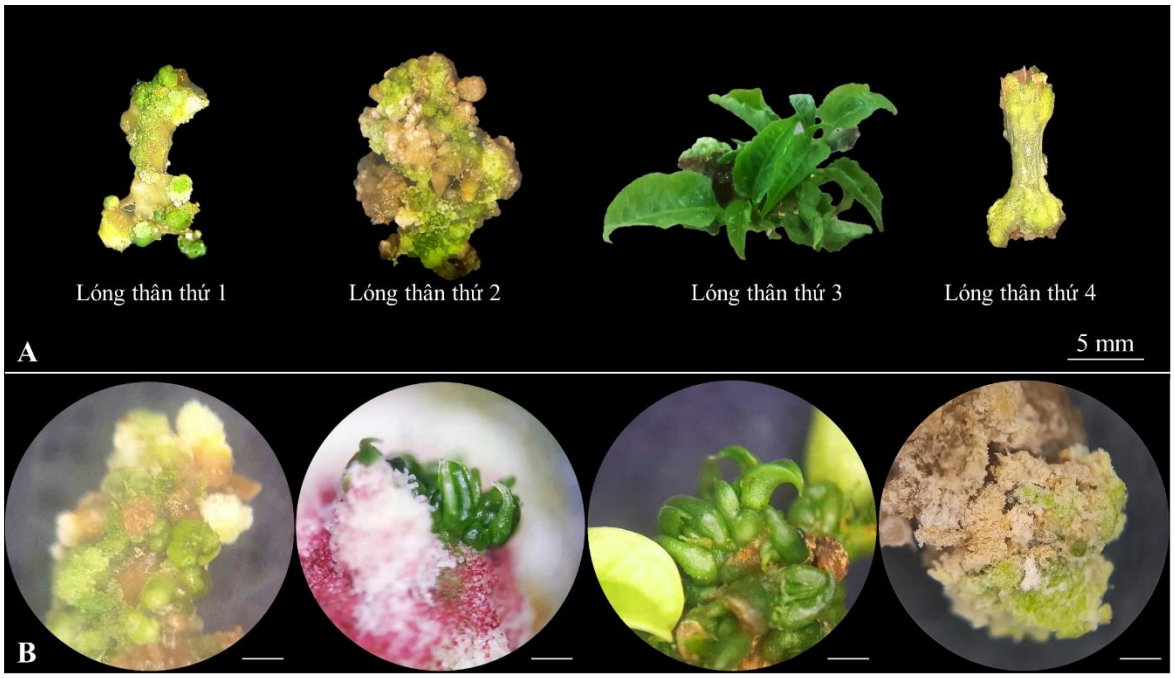
3.1. Nội dung 1: Nghiên cứu chọn nguồn mẫu cấy tối ưu cho quá trình phát sinh hình thái *in vitro ở cây chanh dây, đồng tiền và diệp hạ châu*

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy ảnh hưởng rõ rệt của vị trí lóng thân đến khả năng tái sinh chồi ở cây chanh dây trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* (Hình 3.1 và 3.2). Ở lóng thân thứ 1, tỷ lệ tái sinh chồi là 40,00%, nhưng chồi có kích thước nhỏ (dưới 0,1 cm) (Hình 3.1). Lóng thân thứ 2 có tỷ lệ tái sinh chồi tăng lên đến 63% với 1,67 chồi/mẫu có kích thước nhỏ hơn 0,5 cm và 0,67 chồi/mẫu có kích thước lớn hơn 0,5 cm (Hình 3.1). Lóng thân thứ 3 thể hiện sự vượt trội với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 93,33%, cao nhất trong các vị trí lóng thân được khảo sát. Số chồi < 0,5 cm là 3,67, trong khi chồi > 0,5 cm là 1,33 (Hình 3.1). Đây là vị trí mẫu cấy thích hợp cho quá trình phát sinh chồi và phát triển kích thước chồi đạt tối ưu. Ngược lại, lóng thân thứ 4 không có khả năng tái sinh chồi, với tỷ lệ tái sinh là 0,00% (Hình 3.1).



Hình 3.1. Khả năng cảm ứng chồi ở 4 vị trí lóng thân *in vitro* khác nhau của cây chanh dây sau 60 ngày nuôi cấy. **Chồi có kích thước < 0,1 cm*

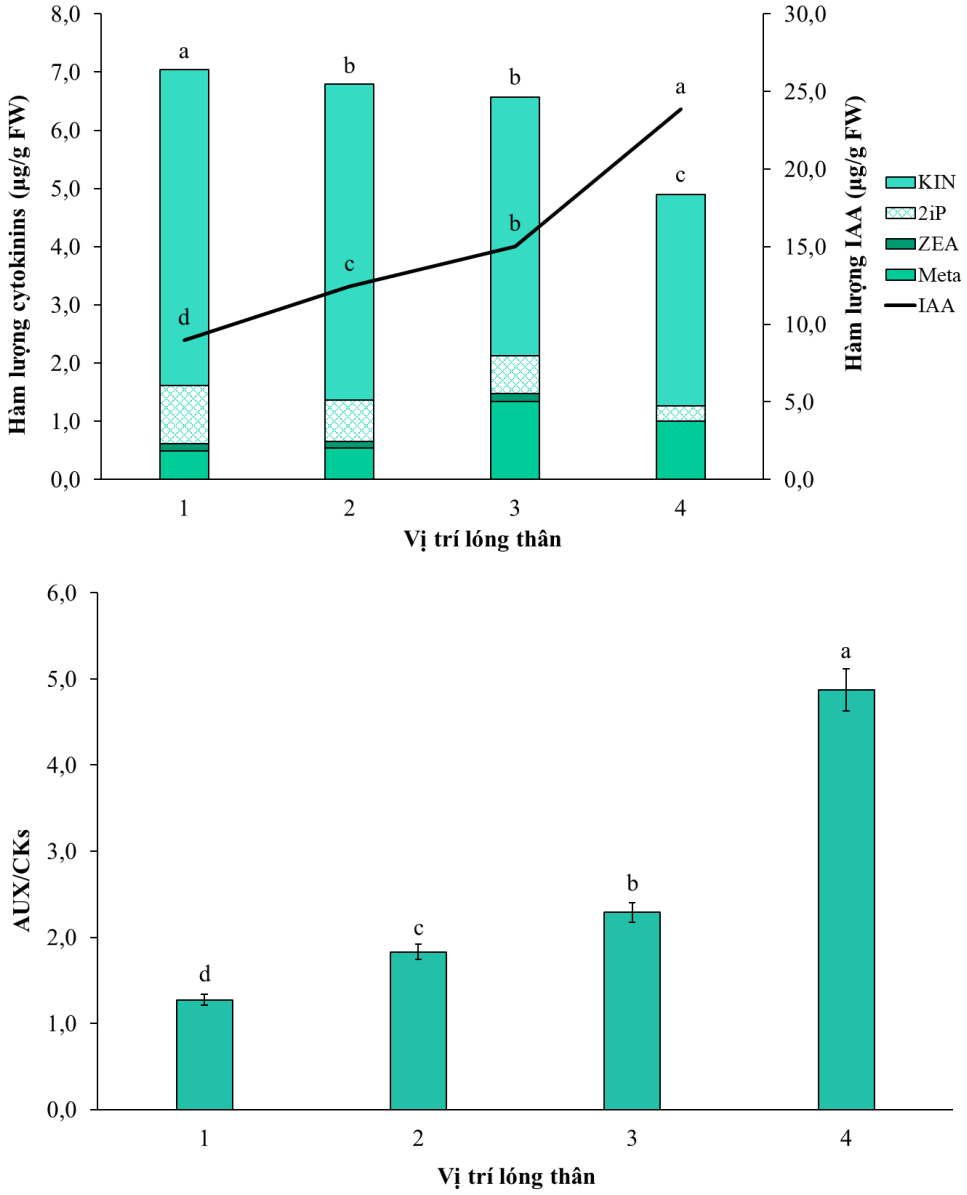


Hình 3.2. Sự phát sinh chồi của mẫu cây chanh dây ở các vị trí lóng thân *in vitro* khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy. **A.** Mẫu cấy tại các vị trí lóng thân từ 1 đến 4 sau 60 ngày nuôi cấy (Bar = 5 mm). **B.** Cảm ứng chồi từ các vị trí lóng thân *in vitro* khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy (từ trái sang phải) (Bar = 2 mm).

Kết quả về phân tích UHPLC-UV chỉ ra các nồng độ AUX (IAA) và CKs (Meta, ZEA, 2iP, KIN) ở các vị trí khác nhau của lóng thân cây chanh dây (vị trí 1, 2, 3 và 4) có sự khác biệt (Hình 3.3). Nồng độ IAA tăng dần từ vị trí lóng thân thứ 1 (8,958 µg/g FW) đến vị trí lóng thân thứ 4 (23,848 µg/g FW). Trong khi đó, nồng độ CKs không có sự khác biệt giữa vị trí lóng thân thứ 1 (6,548 µg/g FW), lóng thân thứ 2 (6,243 µg/g FW) và lóng thân thứ 3 (5,219 µg/g FW). Tuy nhiên ở vị trí lóng thân thứ 4 (vị trí mẫu cấy gần gốc nhất, xa đỉnh chồi nhất), hàm lượng CKs giảm rõ rệt (3,891 µg/g FW) (Hình 3.3). Sự giảm nồng độ CKs có thể ảnh hưởng đến khả năng phát triển chồi và sự phân chia tế bào ở các vị trí xa gốc. Tỉ lệ IAA/CKs phản ánh sự cân bằng giữa auxin (IAA) và CKs, hai hormone đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của thực vật. Tỉ lệ IAA/CKs tăng mạnh từ vị trí lóng thân thứ 1 (1,368) đến vị trí lóng thân thứ 4 (6,129) (từ vị trí mẫu gần chồi nhất đến vị trí mẫu gần gốc nhất). Điều này có thể cho thấy sự gia tăng ảnh hưởng của AUX so với CKs khi các mẫu cấy được lấy từ các vị trí gần cực rễ của cây.

Dựa vào kết quả trên, có thể thấy rằng nồng độ của các hormone thực vật thay đổi rõ rệt khi mẫu cấy được lấy từ các vị trí khác nhau trên lóng thân *in vitro* của cây

chanh dây. Sự gia tăng IAA và tỉ lệ IAA/CKs từ vị trí lóng thân thứ 1 đến vị trí lóng thân thứ 4 cho thấy ảnh hưởng mạnh mẽ của AUX trong việc thúc đẩy sự phát triển chồi ở các vị trí mẫu cấy gần đỉnh chồi. Ngược lại, sự giảm dần của các CKs (ZEA, 2iP, KIN) có thể ảnh hưởng đến sự phân chia tế bào và sự phát triển của chồi. Điều này chỉ ra rằng mẫu cấy từ các vị trí xa gốc (gần chồi) có thể có khả năng tái sinh chồi tốt hơn, nhờ vào sự kết hợp tối ưu giữa AUX và CKs, đặc biệt là tỷ lệ IAA/CKs cao.



Hình 3.3. Hàm lượng cytokinin, IAA **(A)** và tỷ lệ IAA/CKs **(B)** ở 4 vị trí lóng thân *in vitro* khác nhau của cây chanh dây.

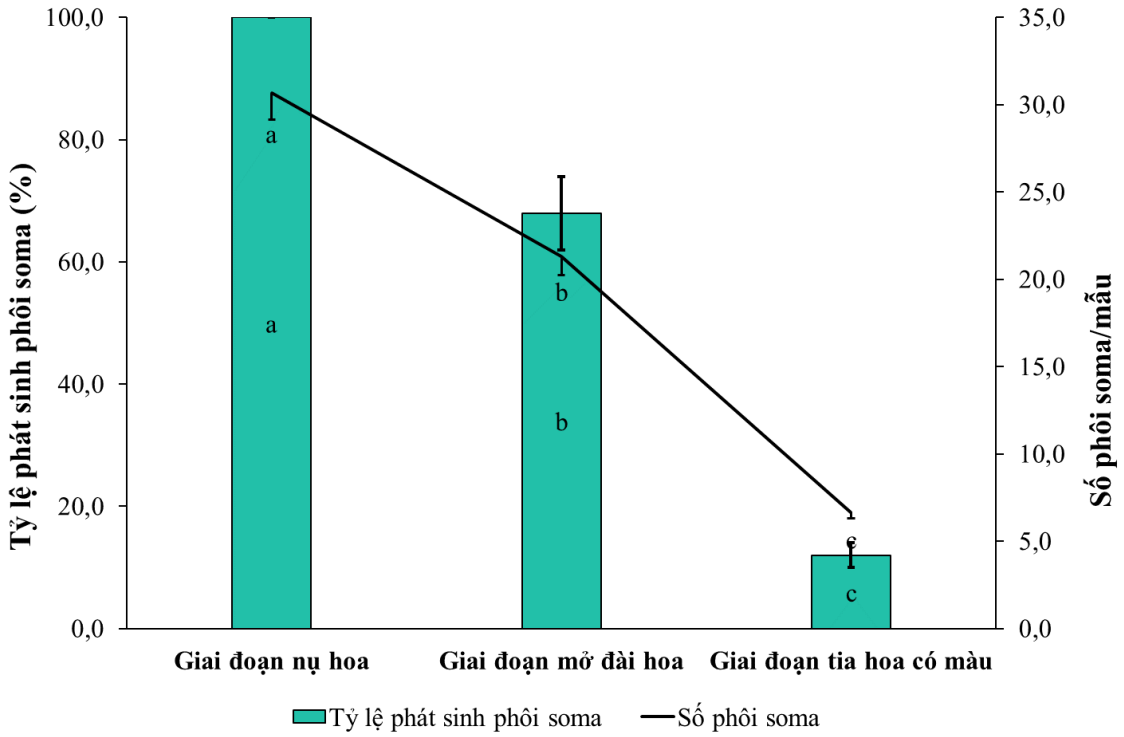
Vị trí mẫu cấy đóng vai trò quan trọng trong khả năng tái sinh chồi khi nuôi cấy *in vitro*. Sự khác biệt về độ trưởng thành của tế bào và hàm lượng hormone nội sinh

ở các vị trí khác nhau có thể ảnh hưởng đến khả năng đáp ứng của mẫu cấy với môi trường cảm ứng. Điều này chỉ ra rằng, việc lựa chọn đúng vị trí mẫu cấy là yếu tố quyết định trong việc cải thiện hiệu quả tái sinh chồi khi nuôi cấy *in vitro*. Nghiên cứu trên cây chanh dây vàng cho thấy mẫu lóng thân *in vitro* từ vị trí đốt thứ 3 cho hiệu quả tái sinh chồi cao nhất, như đã được Trần Hiếu [149] ghi nhận. Kết quả của nghiên cứu này cũng có kết quả tương tự các nghiên cứu trước, mẫu cấy lóng thân thứ 3 của mẫu chanh dây *in vitro* cho khả năng tái sinh chồi tối ưu nhất. Ngoài ra, sự khác biệt về vị trí mẫu cấy không chỉ tác động đến sự phát triển của mẫu cấy mà còn ảnh hưởng đến khả năng phát sinh chồi, điều này có thể liên quan đến sự phân bố hormone nội sinh và độ trưởng thành tế bào tại các vị trí khác nhau. Vì vậy, các lóng thân ở vị trí này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

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

Nghiên cứu hiện tại cho thấy ảnh hưởng rõ rệt của độ tuổi đế hoa lên khả năng phát sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Kết quả được trình bày qua ba giai đoạn phát triển chính của đế hoa là nụ hoa, mở đài hoa và tia hoa có màu. Các giai đoạn này phản ánh sự thay đổi về hình thái cũng như khả năng tái sinh của phôi soma (Hình 3.4 và 3.5).

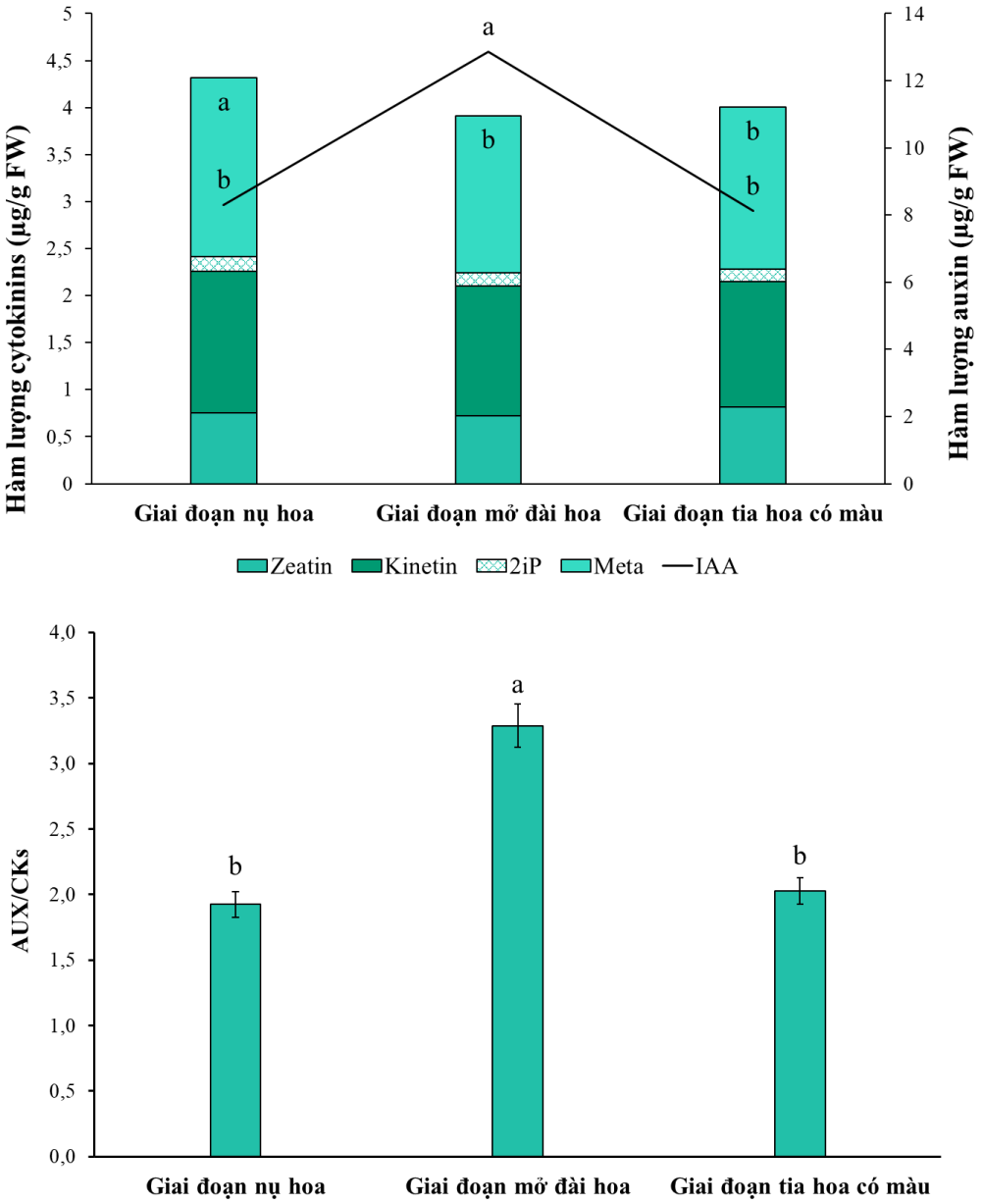
Ở giai đoạn nụ hoa, mẫu có kích thước lớn nhất và màu sắc xanh tươi, phản ánh khả năng phát sinh phôi soma mạnh mẽ với tỷ lệ tái sinh đạt 100% và số phôi soma cao nhất (30,67) (Hình 3.4 và 3.5). Đây là giai đoạn tế bào còn trẻ, hoạt động sinh lý mạnh mẽ và có tiềm năng tái sinh tối ưu. Ở giai đoạn mở đài hoa, tỷ lệ phát sinh phôi soma giảm xuống còn 68% và số phôi soma còn 21,33. Điều này có thể do tế bào bắt đầu chuyển hóa thành tế bào chuyên biệt hơn, làm giảm khả năng tái sinh. Cuối cùng, ở giai đoạn tia hoa có màu, khả năng phát sinh phôi soma ở giai đoạn này giảm mạnh xuống còn 12% và số phôi soma còn 6,67 (Hình 3.4). Điều này cho thấy rằng ở giai đoạn trưởng thành, tế bào đã mất đi khả năng hình thành phôi soma và khả năng tái sinh gần như không còn.



Hình 3.4. Sự phát sinh hình thái của mẫu đế hoa đồng tiền ở các giai đoạn khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy.

Hình 3.5. Sự phát sinh hình thái của mẫu đế hoa đồng tiền ở các giai đoạn khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy.

Hàm lượng các hormone CKs trong các giai đoạn phát triển hoa được ghi nhận trong Hình 3.6. Nồng độ hormone đạt giá trị cao nhất trong mẫu ở giai đoạn nụ hoa và giảm dần khi hoa phát triển qua các giai đoạn tiếp theo. Điều này cho thấy hàm lượng hormone nội sinh có ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát sinh phôi soma (Hình 3.6).



Hình 3.6. Hàm lượng cytokinin, IAA **(A)** và tỷ lệ IAA/CKs **(B)** ở 3 độ tuổi khác nhau của mẫu đế hoa cây hoa đồng tiền.

CKs đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân chia và biệt hóa tế bào, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát sinh phôi soma. Mức độ cao của các hormone này trong giai đoạn đầu giúp thúc đẩy sự phân chia tế bào, hỗ trợ quá trình phát sinh phôi soma. Giai đoạn nụ hoa thể hiện mức độ CKs cao hơn 2 loại mẫu cấy còn lại. Những hormone này đã được ghi nhận là các yếu tố quan trọng trong việc điều hòa sự phân chia và biệt hóa tế bào. Mặc dù AUX (IAA) ở mức trung bình (8,301 µg/g FW) trong giai đoạn nụ hoa, tỉ lệ AUX/CKs (1,923) cho thấy sự cân bằng giữa AUX và CKs

(Hình 3.6). Đây là điều kiện thuận lợi, vì sự cân bằng này cần thiết để khởi động các quá trình tái tạo và biệt hóa mô.

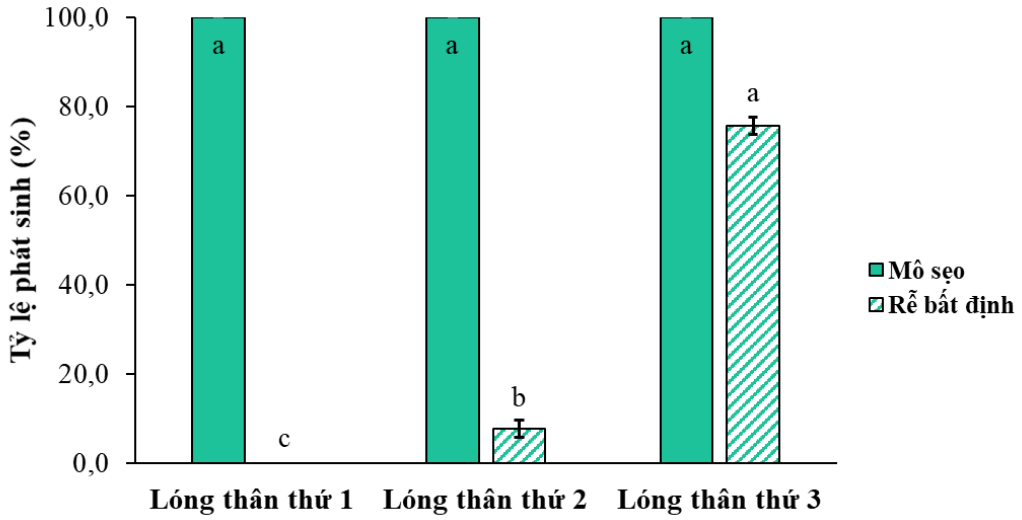
Kết quả thực nghiệm của Khai và cộng sự [162] trên đối tượng cây tử linh lan cho thấy rằng tuổi của cánh hoa có ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của tế bào, cụ thể là số lượng tế bào tái sinh và hướng của quá trình tái sinh. Theo đó, mẫu có độ tuổi trẻ nhất (5 ngày tuổi) cho tỷ lệ tái sinh cao nhất, đặc biệt là với các cấu trúc giống hoa. Trong khi đó, tỷ lệ và số lượng phôi soma cao nhất được ghi nhận ở mẫu cấy thuộc nhóm 10 ngày tuổi. Sự hình thành rễ bất định chỉ được quan sát thấy ở các mẫu cấy ở độ tuổi 10 và 15 ngày. Xu hướng tái sinh chồi mạnh nhất được ghi nhận ở cánh hoa thuộc nhóm 20 ngày tuổi so với các mẫu cấy trẻ hơn. Tuy nhiên, khả năng tái sinh cao hơn ở các mẫu lá già của cây *Prunus canescens* [163] và cây *Cucurbita moschata* [164] cũng đã được ghi nhận. Điều này trái ngược với các kết quả thu được ở nhiều nghiên cứu trước đây và kết quả của nghiên cứu hiện tại, kết quả cho thấy các mẫu cấy trẻ hơn cho khả năng tái sinh mạnh hơn so với các mẫu già, chẳng hạn như cây *Cercis canadensis* [165], *Aerides maculosum* [166], *Rosa hybrida* [167], *Morus alba* [168], *Cajanus cajan* [169], *Brassica* spp. [170], lúa [171] và *Platanus occidentalis* [172].

Kết quả nghiên cứu này khẳng định rằng độ tuổi của đế hoa có ảnh hưởng lớn đến khả năng phát sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền. Giai đoạn nụ hoa cho tỷ lệ tái sinh cao nhất, là thời điểm tối ưu để thu nhận vật liệu nuôi cấy. Trong khi đó, giai đoạn mở đài hoa và tia hoa có màu cho thấy khả năng tái sinh giảm dần. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc lựa chọn đúng giai đoạn phát triển của mẫu cấy trong các nghiên cứu và ứng dụng nuôi cấy mô thực vật.

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

Kết quả cho thấy, khi nuôi cấy các mẫu lóng thân cây diệp hạ châu ở các vị trí khác nhau thì khả năng phát sinh hình thái *in vitro* là khác nhau sau 40 ngày nuôi cấy (Hình 3.7 và 3.8). Sự hình thành mô sẹo xảy ra ở cả 3 vị trí lóng của các mẫu với tỷ lệ hình thành mô sẹo là 100% ở lóng thân thứ 1 và 2. Điều thú vị là rễ bất định được hình thành ở lóng thân thứ ba dù được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA, điều này là do nồng độ AUX nội sinh cao hơn của mẫu cấy cũng như sự biệt hóa của các

tế bào tại khu vực này. Tuy nhiên, cơ chế của sự phát sinh hình thái này vẫn chưa rõ ràng. Mặc dù tỷ lệ hình thành mô sẹo của cả 3 lóng đều cao (75,66 - 100%) nhưng lóng thân thứ 2 cho hiệu quả phát sinh hình thái tốt nhất với mô sẹo lớn, bao phủ toàn bộ mẫu cấy sau 40 ngày nuôi cấy; trong khi đó, ở 2 vị trí lóng thân còn lại, mô sẹo chỉ hình thành ở 2 mặt cắt của mẫu cấy với mô sẹo nhỏ (Hình 3.7). Mặt khác, ngay cả khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA ngoại sinh, bên cạnh sự hình thành mô sẹo, lóng thứ 3 vẫn cho sự hình thành rễ bất định (Hình 3.7 và 3.8); điều này có thể là do càng gần hệ thống gốc rễ, hàm lượng AUX trong mẫu càng cao; cũng như vùng tế bào ở lóng thứ 3 có thể nhạy cảm hơn với sự biệt hóa thành tế bào gốc. Từ đó, trong quá trình hình thành mô sẹo, rễ bất định cũng được hình thành ở vị trí lóng thân này (Hình 3.7 và 3.8).

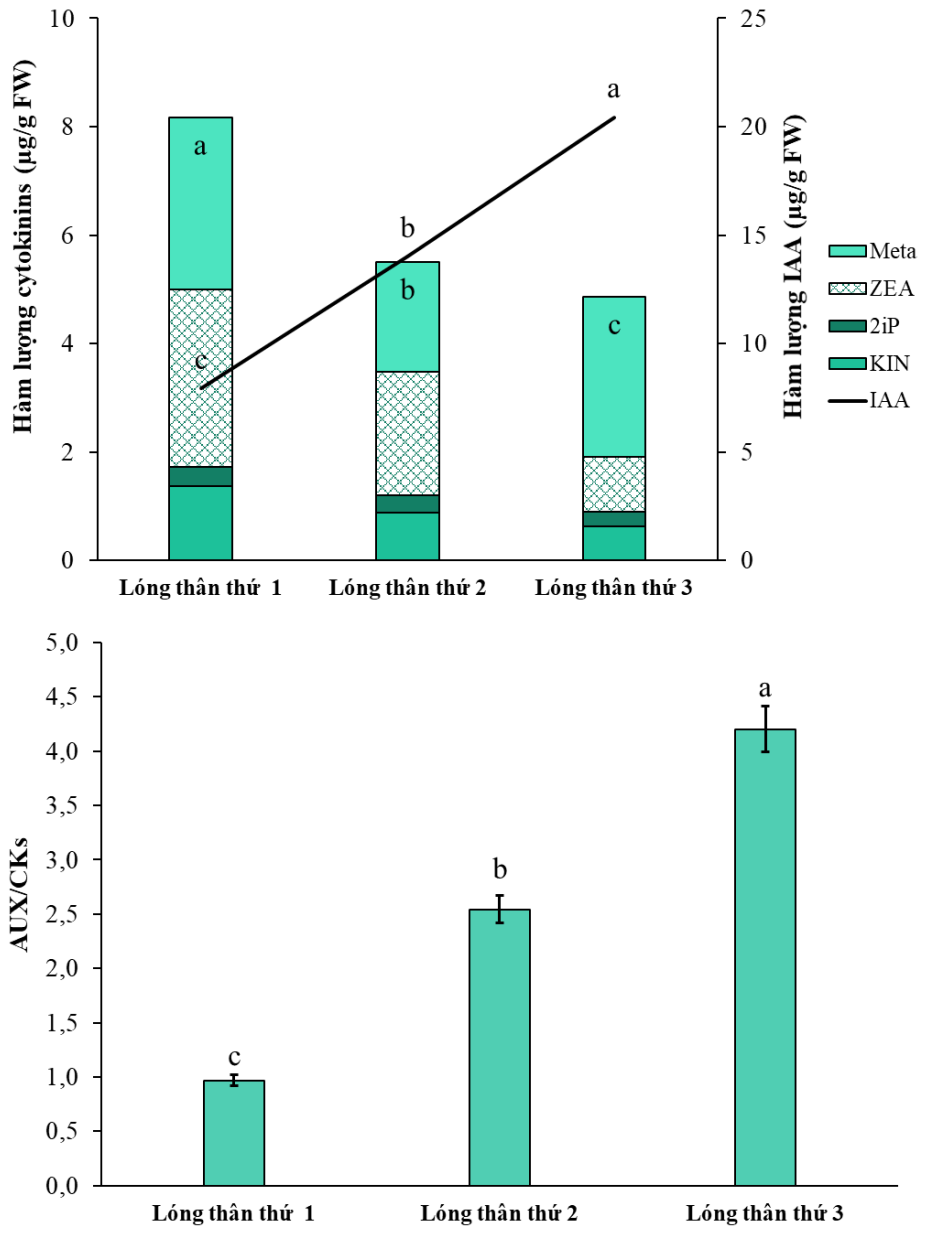


Hình 3.7. Tỷ lệ phát sinh mô sẹo và rễ bất định của các vị trí lóng thân khác nhau của cây diệp hạ châu sau 40 ngày nuôi cấy.

Hình 3.8. Sự phát sinh hình thái của mẫu cây diệp hạ châu ở các vị trí lóng thân khác nhau sau 40 ngày nuôi cấy.

Do sự cân bằng của hormone nội sinh, đặc biệt là AUX và CKs, có liên quan chặt chẽ đến quá trình phát sinh hình thái; nên trong nghiên cứu này, tỷ lệ AUX/CKs đã được kiểm tra trong 3 mẫu cấy lóng thân. Trong mẫu cấy ban đầu, nồng độ của CKs và AUX trong 3 lóng thân cũng khác nhau (Hình 3.9). Hàm lượng CKs giảm dần theo từng vị trí lóng thân (càng gần rễ hàm lượng CKs càng giảm); ngược lại, hàm lượng AUX tăng dần khi các mẫu ở gần các cực của rễ. Kết quả cho thấy tỷ lệ AUX/CKs ở 3 lóng thân của cây diệp hạ châu đều xấp xỉ/lớn hơn 1 (hàm lượng AUX tương đương/cao hơn CKs) (Hình 3.9) nên ở cả 3 vị trí lóng đều có khả năng hình thành mô sẹo (Hình 3.9). Tỷ lệ AUX/CKs tại vị trí lóng thứ nhất là thấp nhất (0,970) và ngược lại tỷ lệ này cho kết quả cao nhất tại vị trí lóng thứ 3 (4,203) (Hình 3.9).

Kết hợp giữa kết quả phát sinh hình thái và phân tích hàm lượng AUX, CKs nội sinh ban đầu trong mẫu lóng thân có thể thấy tỷ lệ AUX/CKs của lóng thân thứ 2 thể hiện khả năng hình thành mô sẹo vượt trội hơn so với 2 vị trí lóng thân còn lại; trong khi đó, tỷ lệ AUX/CKs quá cao ở mẫu lóng thân thứ 3 (Hình 3.9) dẫn đến khả năng hình thành rễ bất định mặc dù mẫu cấy được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung CKs ngoại sinh (Hình 3.8).



Hình 3.9. Hàm lượng cytokinin, IAA **(A)** và tỷ lệ IAA/CKs **(B)** ở 3 vị trí lóng thân *in vitro* khác nhau của cây diệp hạ châu.

Việc lựa chọn vị trí mẫu cấy đóng vai trò quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật. Ở mỗi vị trí hàm lượng hormone nội sinh khác nhau dẫn đến sự phát sinh hình thái khác nhau. Nghiên cứu của Nhut và cộng sự [173] cho thấy việc lựa chọn vị trí cấy thích hợp đã cải thiện tỷ lệ tái sinh chồi *in vitro* của cây hoa loa kèn (*Lilium longiflorum*); kết quả của nghiên cứu này cho thấy các mẫu ở vị trí 1 (gần vùng ngọn nhất) và vị trí 2 cho tỷ lệ hình thành chồi *in vitro* cao nhất sau 60 ngày nuôi cấy và hiệu suất tái sinh chồi giảm khi vị trí mẫu càng gần vùng rễ. Sự khác biệt về hình thái này có thể là do hàm lượng hormone nội sinh và tính nhạy cảm của từng vùng tế bào [173]. Theo Bramhanapalli và cộng sự [174], bất kể hàm lượng PGRs trong môi

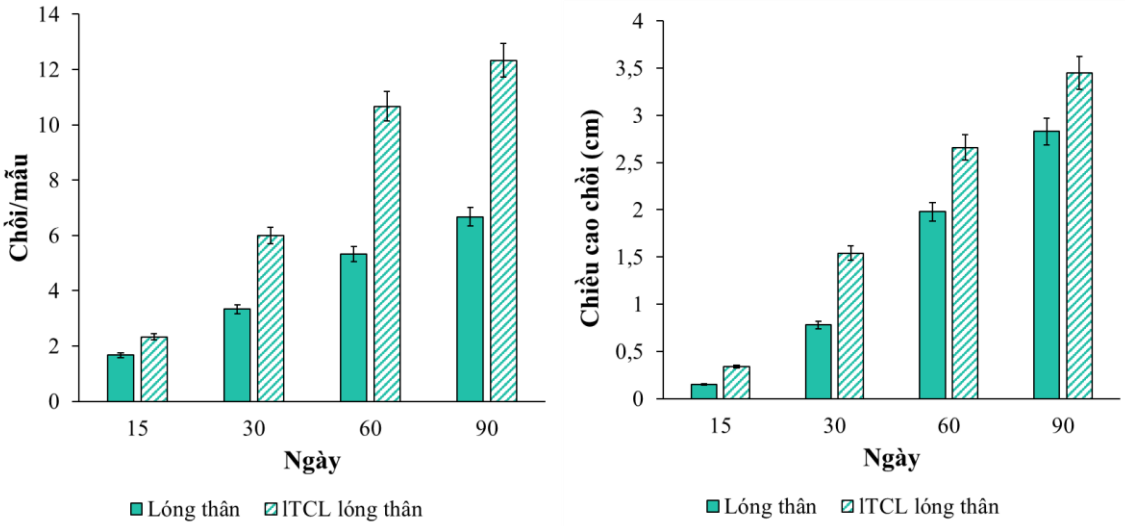
trường tái sinh, sự tái sinh chồi và rễ có thể bắt nguồn từ cơ chế di truyền được kích hoạt bởi việc cắt mẫu cấy. Beyaz và cộng sự [175] báo cáo rằng khả năng tái sinh rễ ở đoạn gần cực rễ là tốt hơn, trong khi tái sinh chồi hiệu quả hơn ở đoạn gần cực ngọn.

Kết quả nghiên cứu trên 3 đối tượng cho thấy vật liệu đầu vào, bao gồm vị trí mẫu cấy và độ tuổi mô, là yếu tố then chốt quyết định đến hiệu quả tái sinh *in vitro* ở các loài thực vật khác nhau. Trên cây chanh dây, việc lựa chọn đúng vị trí lóng thân đã chứng minh ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng phát sinh chồi. Lóng thân thứ 3, cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất và chất lượng chồi tốt hơn so với các vị trí khác, cho thấy đây là vùng mô thích hợp cho quá trình phát sinh chồi. Tương tự, nghiên cứu trên cây diệp hạ châu cũng chỉ ra rằng vị trí mẫu cấy có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng hình thành mô sẹo và rễ bất định. Lóng thân thứ 2 là vị trí tối ưu cho sự phát triển của mô sẹo lớn, trong khi lóng thứ 3 lại có xu hướng hình thành rễ bất định. Ở cây hoa đồng tiền, yếu tố tuổi sinh lý của mô thể hiện vai trò quyết định trong khả năng phát sinh phôi soma. Giai đoạn nụ hoa, khi các tế bào còn non, chưa có hoạt tính sinh lý cao cho khả năng phát sinh phôi soma tốt hơn so với các giai đoạn phát triển muộn hơn. Nhìn chung, các kết quả cho thấy rằng việc lựa chọn đúng vật liệu cấy, bao gồm vị trí mô cấy và giai đoạn sinh lý phát triển thích hợp có ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả của các quá trình tái sinh khác nhau ở thực vật.

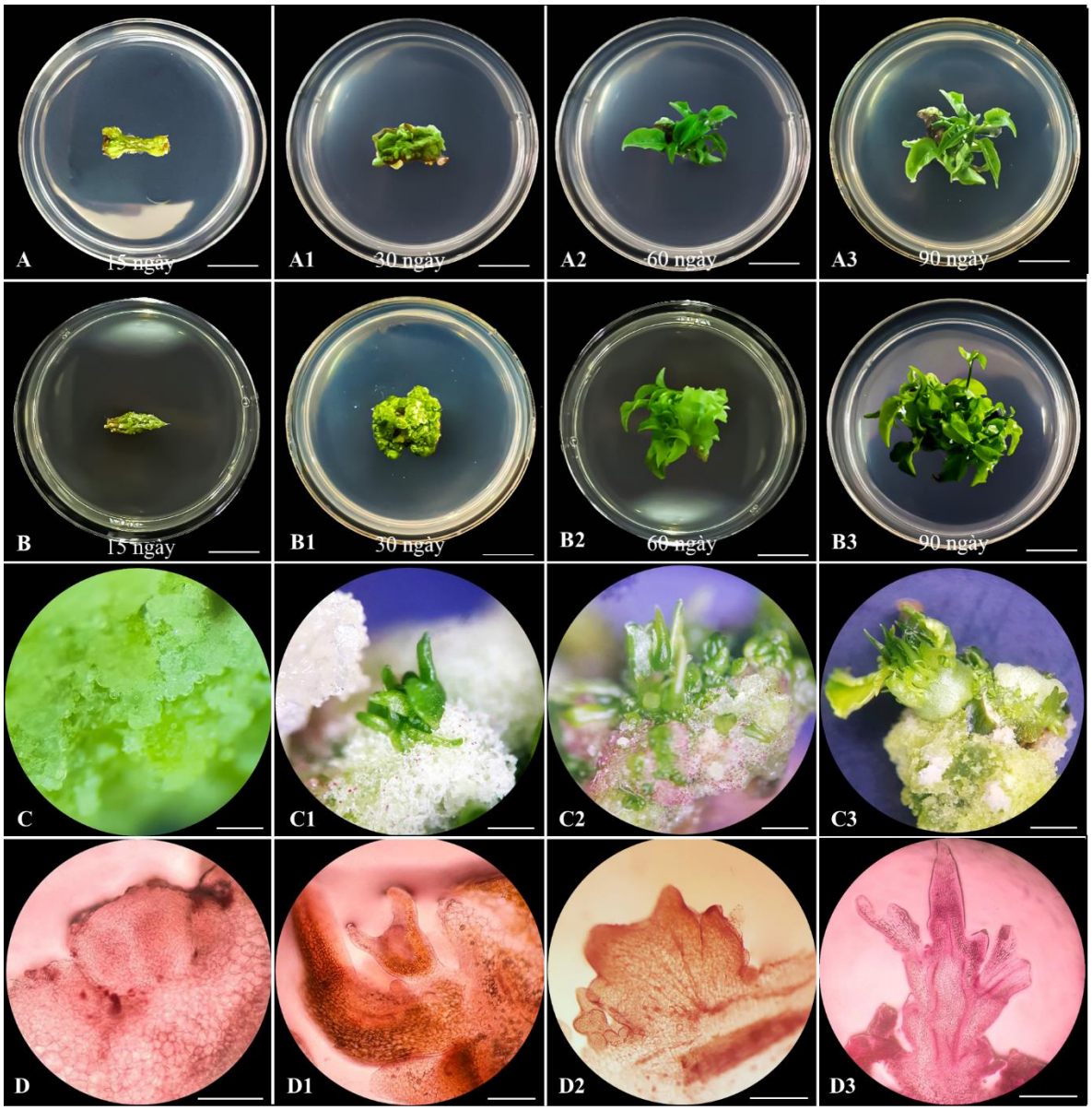
3.1.4. Ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên khả năng phát sinh hình thái của cây chanh dây, hoa đồng tiền và diệp hạ châu

Đối với cây chanh dây, kết quả cho thấy rằng các mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây đều cho thấy khả năng hình thành chồi bất định (Hình 3.10 và 3.11). Kết quả thí nghiệm cho thấy cả mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây đều có khả năng tái sinh chồi bất định. Mẫu lóng thân cho thấy sự tăng trưởng số lượng chồi dần dần qua thời gian, từ 1,67 chồi ở ngày thứ 15 lên 6,67 chồi vào ngày thứ 90. Tuy nhiên, chiều cao chồi của mẫu này chỉ tăng từ 0,15 cm lên 2,83 cm, với sự chậm lại trong mức tăng trưởng sau 60 ngày. Hệ số tái sinh của mẫu lóng thân cũng tăng đều, đạt 6,67 vào ngày thứ 90, cho thấy khả năng tái sinh ổn định nhưng không vượt trội.

Trong khi đó, mẫu lTCL lóng thân bắt đầu với số lượng chồi cao hơn (2,33 chồi vào ngày thứ 15) mẫu lóng thân và tăng nhanh chóng lên 12,33 chồi vào ngày thứ 90. Chiều cao chồi của mẫu này cũng phát triển mạnh mẽ hơn, từ 0,34 cm ở ngày thứ 15 lên 3,45 cm vào ngày thứ 90. Hệ số tái sinh của mẫu lTCL lóng thân tăng rất nhanh, đạt 24,67 vào ngày thứ 90, vượt xa mẫu lóng thân. Điều này chứng tỏ mẫu lTCL lóng thân có khả năng tái sinh chồi và phát triển chiều cao vượt trội so với mẫu lóng thân, đặc biệt trong giai đoạn từ 30 đến 90 ngày.



Hình 3.10. So sánh hiệu quả tái sinh chồi bất định từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây.

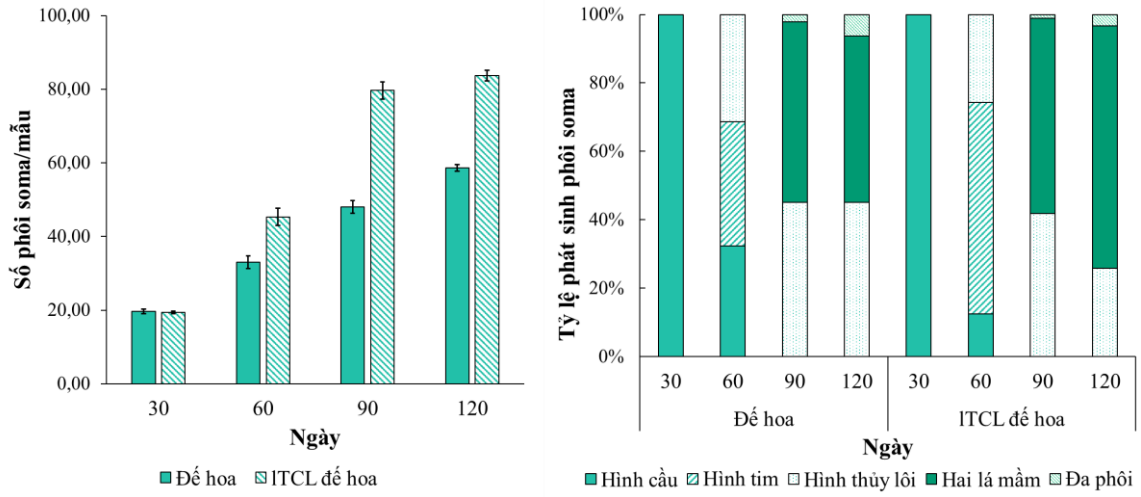


Hình 3.11. Sự hình thành chồi bất định từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây. **A-A3.** Chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân (Bar = 2 cm). **B-B3.** Chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu lTCL lóng thân (Bar = 2 cm). **C-C3.** Cảm ứng chồi bất định ở B-B3 quan sát dưới kính hiển vi soi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

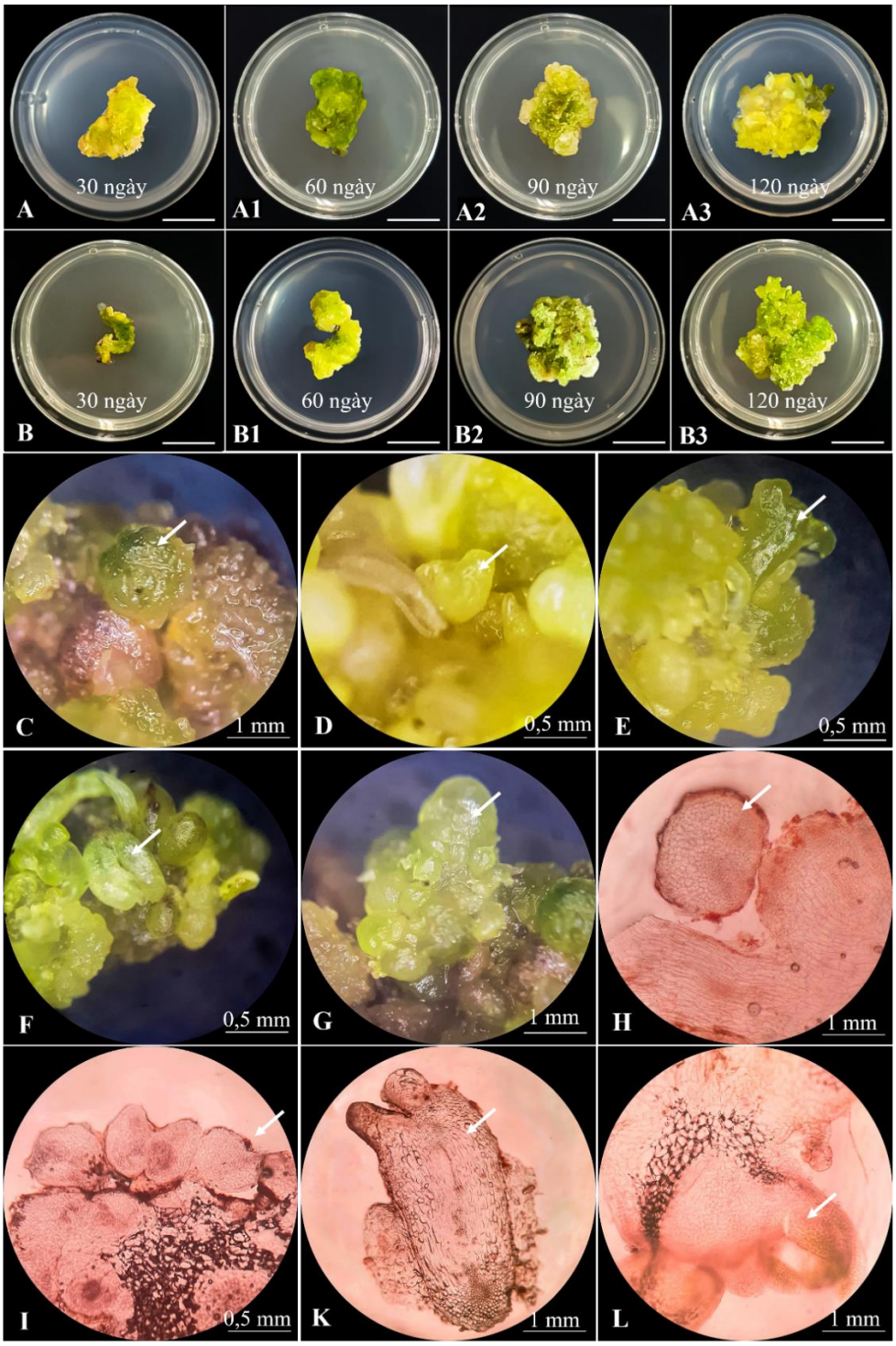
Đối với mẫu cây hoa hoa đồng tiền, kết quả cho thấy sự phát sinh phôi soma ở mẫu lTCL đế hoa là tối ưu hơn so với mẫu đế hoa (Hình 3.12 và 3.13). Đối với mẫu đế hoa, số lượng phôi soma tăng đều theo thời gian. Vào ngày nuôi cấy thứ 30, có 19,67 phôi soma/mẫu và đến ngày thứ 120, số phôi soma đã tăng lên 58,67 phôi soma/mẫu, cho thấy sự hình thành phôi đáng kể khi mẫu trưởng thành. Ở ngày thứ 30, phôi soma chủ yếu hình thành dạng hình cầu (100%) và không quan sát thấy các

dạng khác. Tuy nhiên, đến ngày thứ 60, một số phôi soma có cấu trúc hình tim (36,36%) và thủy lôi (31,31%) bắt đầu xuất hiện, nhưng dạng hình cầu vẫn chiếm ưu thế ở mức 32,32%. Đến ngày thứ 90 và ngày thứ 120, sự hình thành phôi hình cầu giảm đáng kể, với các cấu trúc hình tim và dạng lá mầm trở nên nổi bật hơn, đặc biệt là các cấu trúc dạng 2 lá mầm ở ngày thứ 120 (48,51%).

Tương tự như vậy, lTCL đế hoa cũng cho thấy số lượng phôi soma ngày càng tăng, với sự gia tăng mạnh từ 19,33 phôi soma/mẫu ở ngày thứ 30 lên 83,67 phôi soma/mẫu ở ngày thứ 120. Mẫu lTCL cho thấy sự hình thành phôi soma cao hơn so với đế hoa thông thường. Điều này cho thấy các mẫu lTCL tăng cường sự hình thành phôi soma hiệu quả hơn vật liệu đế hoa truyền thống, đặc biệt là sau 90 ngày. Ở ngày thứ 30, phôi ban đầu hình thành hình cầu (100%), rất giống với mẫu đế hoa. Vào ngày thứ 60, phôi hình tim (61,76%) chiếm ưu thế, trong khi phôi thủy lôi (25,74%) bắt đầu xuất hiện. Vào ngày thứ 90, phôi chủ yếu có hình dạng cấu trúc phôi 2 lá mầm (57,04%), với một số phôi hình tim (41,84%) hiện diện. Vào ngày thứ 120, phôi 2 lá mầm vẫn là hình dạng chủ yếu (70,78%), trong khi phôi hình tim tiếp tục giảm. Tóm lại, cả mẫu đế hoa và TCL đế hoa đều cho thấy sự thay đổi từ hình cầu sang hình dạng phôi soma phức tạp hơn theo thời gian. Tuy nhiên, mẫu lTCL đế hoa tạo điều kiện cho quá trình chuyển đổi nhanh hơn sang phôi soma hình tim và hình 2 lá mầm, đặc biệt là ở ngày nuôi cấy thứ 60 ngày.



Hình 3.12. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma từ mẫu đế hoa và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền.



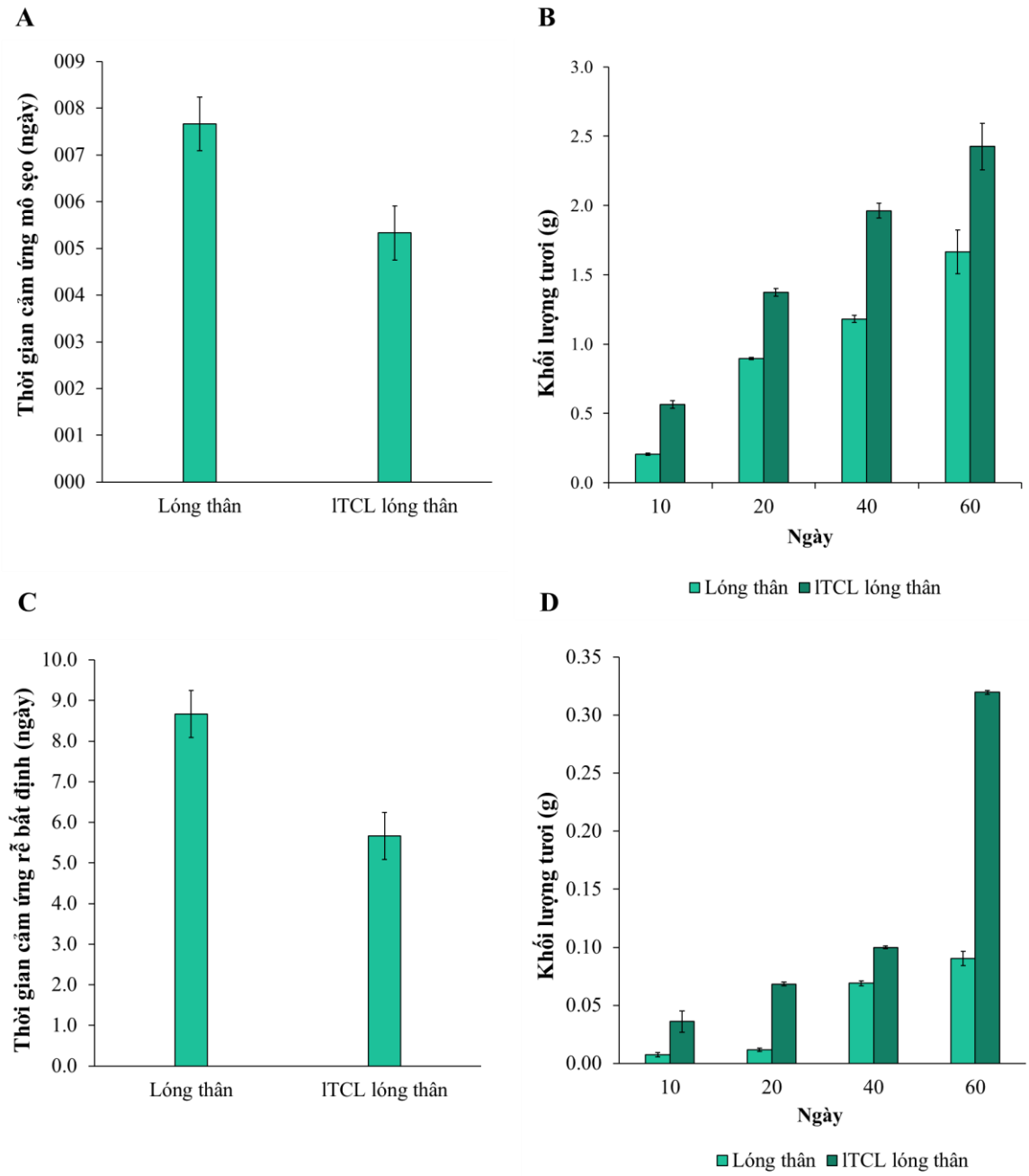
Hình 3.13. Sự hình thành phôi soma từ mẫu đế hoa và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền. **A-A3.** Phôi soma có nguồn gốc từ mẫu đế hoa (Bar = 2 cm). **B-B3.** Phôi soma có nguồn gốc từ mẫu lTCL đế hoa (Bar = 2 cm). **C.** Phôi soma ở giai đoạn hình cầu. **D.** Phôi soma ở giai đoạn hình tim. **E.** Phôi soma ở giai đoạn hình thủy lôi. **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 lôi. **L.** Hình giải phẫu của phôi soma dạng 2 lá mầm.

Ở cây diệp hạ châu, kết quả cho thấy rằng các mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu đều cho thấy khả năng hình thành mô sẹo khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA (Hình 3.14A, B và 3.15); sự hình thành mô sẹo và rễ bất định đối với mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung IBA (Hình 3.14C, D và 3.16).

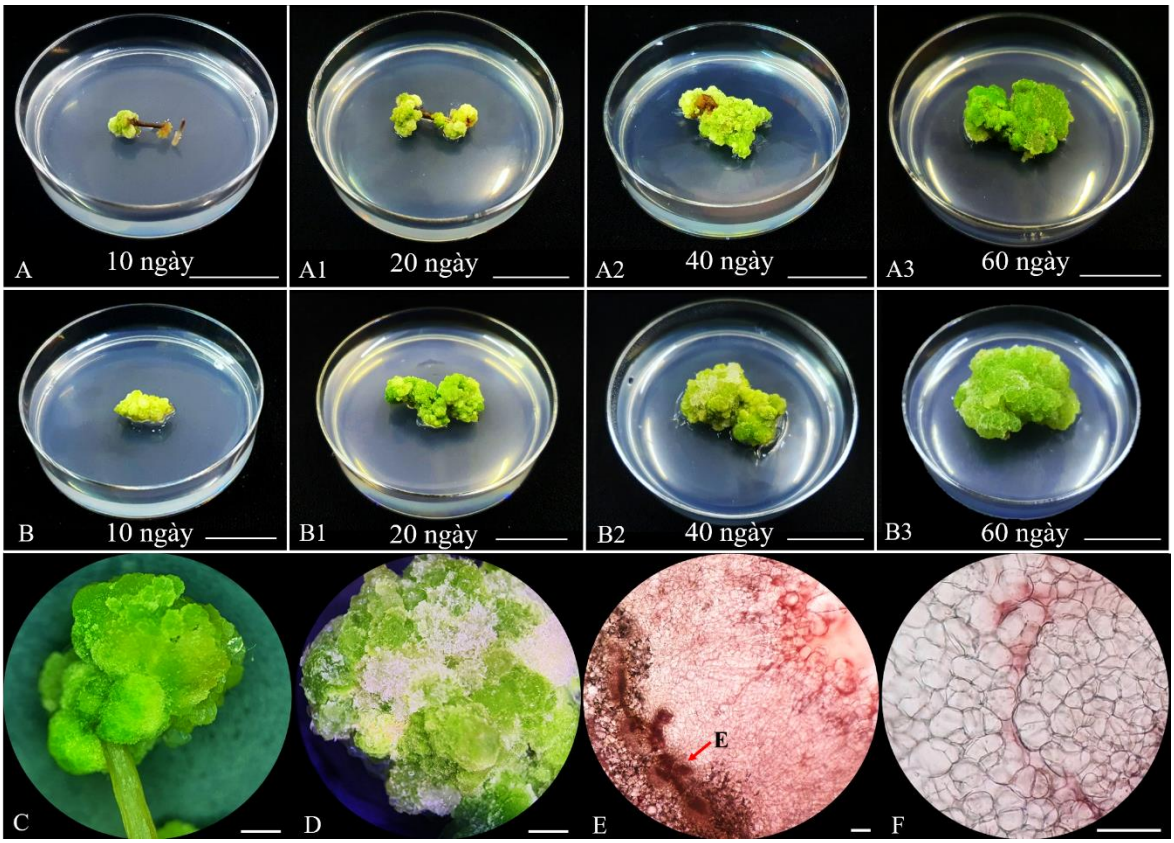
Ở mẫu lóng thân thứ 2 của cây diệp hạ châu, sự hình thành mô sẹo đã được quan sát thấy ở cả hai loại mẫu cấy (mẫu lóng thân và lTCL lóng thân) (Hình 3.14A, B). Tuy nhiên, đối với mẫu cấy lóng, mô sẹo chỉ hình thành ở 2 đầu cắt của mẫu cấy vào ngày nuôi cấy thứ 10 và 20 (Hình 3.15A, A1) và cho đến ngày nuôi cấy thứ 40, mô sẹo mới bao phủ hoàn toàn mẫu cấy (Hình 3.15A2). Trong khi đó, mẫu lTCL lóng thân cho thấy sự hình thành mô sẹo vượt trội, mô sẹo hình thành và bao phủ toàn bộ mẫu cấy từ ngày nuôi cấy thứ 10 (Hình 3.15B-B3); mô sẹo phát triển tốt, lớn, xanh và xốp (Hình 3.15B3, D).

Tương tự như vậy, sự hình thành rễ bất định thông qua mô sẹo cũng tối ưu hơn khi sử dụng mẫu lTCL lóng thân (mẫu lóng thân thứ 3) (Hình 3.14 và 3.16). Từ ngày nuôi cấy thứ 10, mô sẹo và rễ bất định hình thành và bao phủ toàn bộ mẫu (Hình 3.16B-B3); trong khi đó, mẫu cấy lóng thân cần tới 20 ngày nuôi cấy (Hình 3.16A-A3). Ngoài ra, sau 60 ngày nuôi cấy, rễ bất định được hình thành từ mẫu lTCL lóng thân có nhiều rễ tơ hơn và rễ dài hơn (Hình 3.16I, K). Ngược lại, rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân có màu vàng ở đầu rễ và có ít lông hút hơn (Hình 3.16G, H).

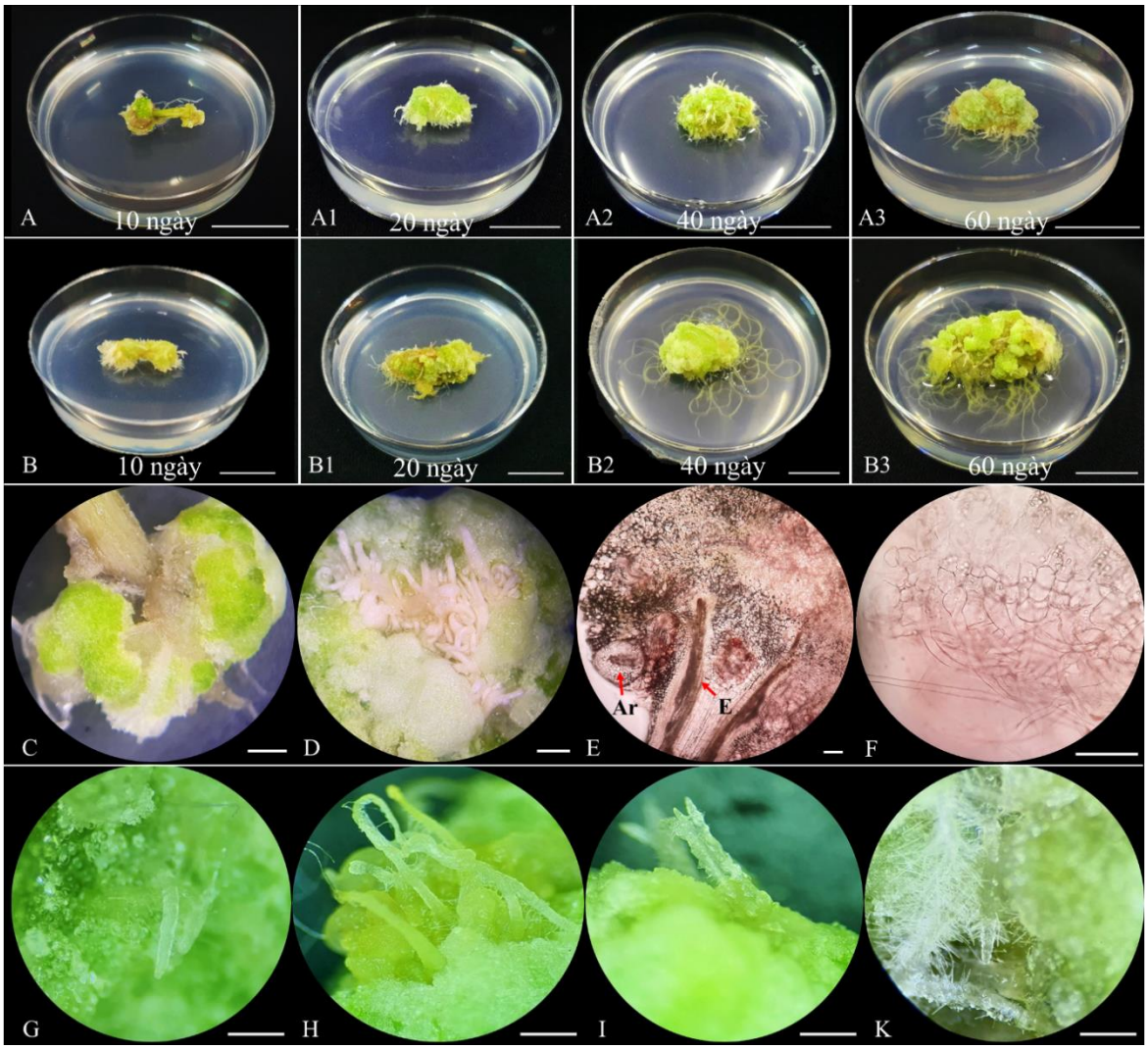
Trong những năm gần đây, đã có nhiều nghiên cứu về ứng dụng của kỹ thuật TCL trong lĩnh vực phát sinh hình thái thực vật *in vitro*. Kỹ thuật TCL mang lại một số lợi thế so với các kỹ thuật nuôi cấy truyền thống do diện tích bề mặt lớn hơn của mẫu cấy với môi trường nuôi cấy, cho phép các chất dinh dưỡng tiếp cận các tế bào thực vật tiềm năng hiệu quả hơn. Điều này thúc đẩy quá trình hình thành cơ quan (phát triển các cơ quan mới) và quá trình hình thành phôi (phát triển phôi mới) dễ dàng hơn [4]. Nhờ những lợi ích này, TCL được sử dụng rộng rãi để nhân giống nhiều loại thực vật *in vitro* và bảo tồn các loài có nguy cơ tuyệt chủng [50]. Các nghiên cứu trên cho thấy việc ứng dụng kỹ thuật TCL trong việc phát sinh hình thái ở các loài thực vật khác nhau là vượt trội hơn so với phương pháp nuôi cấy mô truyền thống.



Hình 3.14. Sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu. **A.** Thời gian cảm ứng mô sẹo. **B.** Khối lượng tươi mô sẹo. **C.** Thời gian cảm ứng rễ bất định. **D.** Khối lượng rễ bất định.



Hình 3.15. Sự hình thành mô sẹo từ mẫu lóng thân và lTCL 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 lTCL 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 ×10 (Mũi tên: Mẫu cấy - E) và **F.** ×40 (Bar = 40 µm).

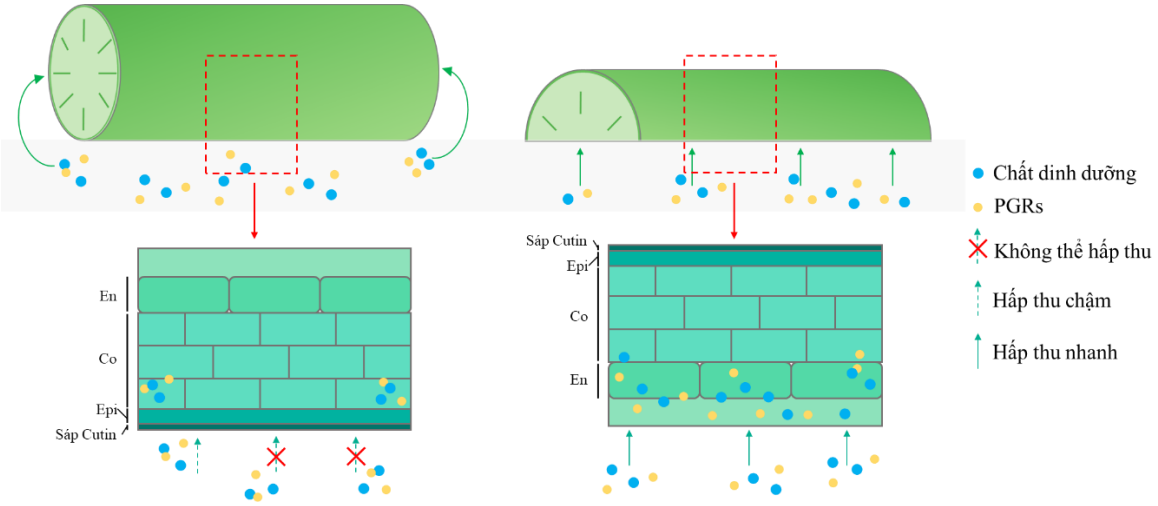


Hình 3.16. Sự hình thành rễ bất định mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu. **A-A3.** Rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân (Bar = 2 cm). **B-B3.** Rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lTCL lóng thân (Bar = 2 cm). **C, G** và **H.** Rễ bất định ở A, A3 quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (Bar = 0,3 cm). **D, I.** Rễ bất định ở B quan sát dưới kính hiển vi soi nổi và **K.** B3 (Bar = 0,3 cm). **E.** Giải phẫu của rễ bất định 20 ngày tuổi quan sát dưới kính hiển vi quang học ×10 và **F.** ×40 (Bar = 40 µm). Mũi tên: Mẫu cấy - E và Rễ bất định – Ar.

Mẫu TCL không chỉ tăng cường khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng mà còn tạo ra các tín hiệu nội sinh giúp mẫu cấy phát triển hình thái tốt hơn thông qua các vết thương. Vết thương kích hoạt các phản ứng phòng vệ, chẳng hạn như sản xuất các loại oxy phản ứng (ROS) [176], ảnh hưởng đến các quá trình tái sinh [43] và các phản ứng chữa lành bao gồm sự phản biệt hóa, tái kích hoạt chu kỳ tế bào và tái tạo mạch dẫn [44]. Mặt khác, kỹ thuật TCL cũng là một phương pháp chiến lược trong nghiên

cứu sinh học thực vật. Các nhà nghiên cứu có thể sao chép và phân tích các cơ chế phản ứng của thực vật thông qua các mẫu cấy TCL. Ví dụ, phương pháp này cho phép kiểm tra các phản ứng xảy ra do vết thương, chẳng hạn như tạo ra mô sẹo. Mô sẹo hoạt động như một lớp bảo vệ và hỗ trợ các quá trình tái sinh tiếp theo. Các nhà khoa học có thể sử dụng mẫu TCL để nghiên cứu các con đường truyền tín hiệu phức tạp được kích hoạt khi cây bị thương. Điều này giúp hiểu được những thay đổi về mặt sinh lý và sinh hóa trong quá trình phát sinh hình thái của cây, dẫn đến sự hiểu biết sâu sắc về các chiến lược thích nghi của thực vật.

Trong nghiên cứu này, việc sử dụng mẫu TCL để kích thích sự phát sinh hình thái ở thực vật đã chứng minh kết quả vượt trội khi so sánh với mẫu cấy thông thường. Điều này là do vết thương dọc theo mẫu cấy giúp các mẫu cấy dễ hấp thụ chất dinh dưỡng và PGRs từ môi trường nuôi cấy hơn, do đó các chất này có thể hoạt động nhanh hơn và hiệu quả hơn (Hình 3.17). Ngoài ra, với đặc điểm mỏng của mẫu TCL, chúng có thể nhạy cảm hơn với các yếu tố trên môi trường nuôi cấy vì chúng ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố nội sinh ban đầu so với mẫu cấy truyền thống.



Hình 3.17. Mô phỏng sự hấp thu chất dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng thực vật của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu. Epi - Lớp biểu bì, Col - Mô giữa; En - Lớp nội bì; PGRs - Chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

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

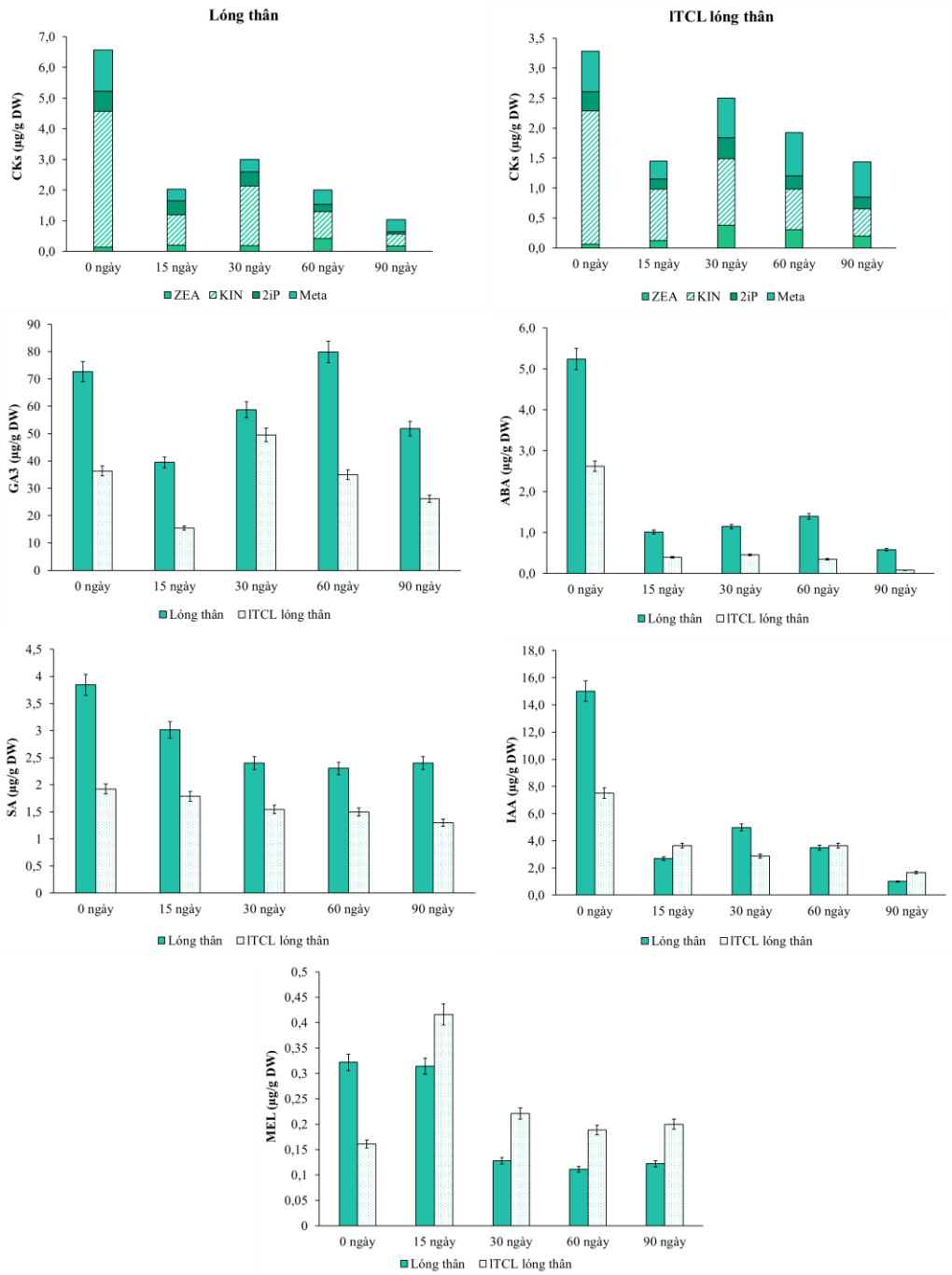
Đối với cây chanh dây, sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình hình thành chồi bất định cho thấy những thay đổi trong 90 ngày nuôi cấy đối với mẫu lóng thân và lTCL lóng thân (Hình 3.18).

Kết quả cho thấy hàm lượng CKs giảm mạnh sau 15 ngày nuôi cấy và sau đó tăng mạnh vào ngày thứ 30 (Hình 3.18). Tuy nhiên, nồng độ CKs lại có xu hướng giảm mạnh vào ngày thứ 60 và tiếp tục giảm ở ngày thứ 90 ở cả hai loại mẫu cấy (Hình 3.18). Tương tự, hàm lượng các hormone khác như GA_3, ABA và IAA đều có xu hướng giảm ở giai đoạn đầu của quá trình phát sinh chồi, cụ thể là vào ngày thứ 15 của quá trình nuôi cấy (Hình 3.18).

Ở mẫu lóng thân, hàm lượng GA_3 giảm dần trong suốt quá trình nuôi cấy còn lại (ngày thứ 60 và 90) (Hình 3.18). Ngược lại, ở mẫu cấy lTCL lóng thân, hàm lượng GA_3 lại tăng nhẹ vào ngày thứ 90 (Hình 3.18). Về ABA, ở mẫu lóng thân, hàm lượng này tiếp tục tăng vào ngày thứ 60 và giảm mạnh vào ngày thứ 90, trong khi mẫu lTCL lóng thân lại có sự giảm liên tục của ABA trong giai đoạn nuôi cấy thứ 60 và thứ 90 (Hình 3.18). Đối với hàm lượng IAA, ở mẫu lóng thân, hàm lượng này tiếp tục giảm liên tục từ ngày thứ 60 đến ngày thứ 90, trong khi ở mẫu lTCL lóng thân, IAA có xu hướng tăng vào ngày thứ 60 và giảm mạnh vào ngày thứ 90 (Hình 3.18).

Hàm lượng SA có xu hướng giảm nhẹ trong suốt quá trình nuôi cấy (ở mẫu lóng thân có sự tăng nhẹ vào ngày thứ 90) (Hình 3.18). Trong khi đó, hàm lượng MEL lại có sự tăng mạnh vào ngày thứ 15 rồi giảm mạnh vào ngày thứ 30, sau đó lại tăng trở lại vào giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy đối với mẫu lTCL lóng thân (Hình 3.18). Ngược lại, ở mẫu lóng thân, hàm lượng MEL lại ổn định vào ngày thứ 10, giảm vào ngày thứ 30 và tăng trở lại ở các giai đoạn tiếp theo.

Tóm lại, trong nghiên cứu này cho thấy CKs (ZEA, mT) tăng sớm, IAA ổn định, ABA giảm, GA_3 tăng ở giai đoạn kéo dài và MEL tăng ở giai đoạn cảm ứng giúp cân bằng hormone tối ưu cho hình thành chồi bất định ở chanh dây.



Hình 3.18. Sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành chồi *in vitro* của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây.

Tỷ lệ IAA/CKs trong quá trình nuôi cấy có sự biến động đáng chú ý ở cả hai mẫu cấy. Đối với mẫu cấy lóng thân, tỷ lệ này giảm ở ngày nuôi cấy thứ 15, sau đó tăng vào ngày thứ 30 và 60, rồi giảm mạnh vào ngày thứ 90. Trong khi đó, đối với mẫu lTCL lóng thân, tỷ lệ này lại tăng vào ngày nuôi cấy thứ 15, giảm mạnh vào ngày thứ 30, rồi lại tăng trở lại vào ngày thứ 60 và giảm vào ngày thứ 90 (Hình 3.19). Sự biến động này phản ánh một sự điều chỉnh trong quá trình phát sinh chồi bất định, khi

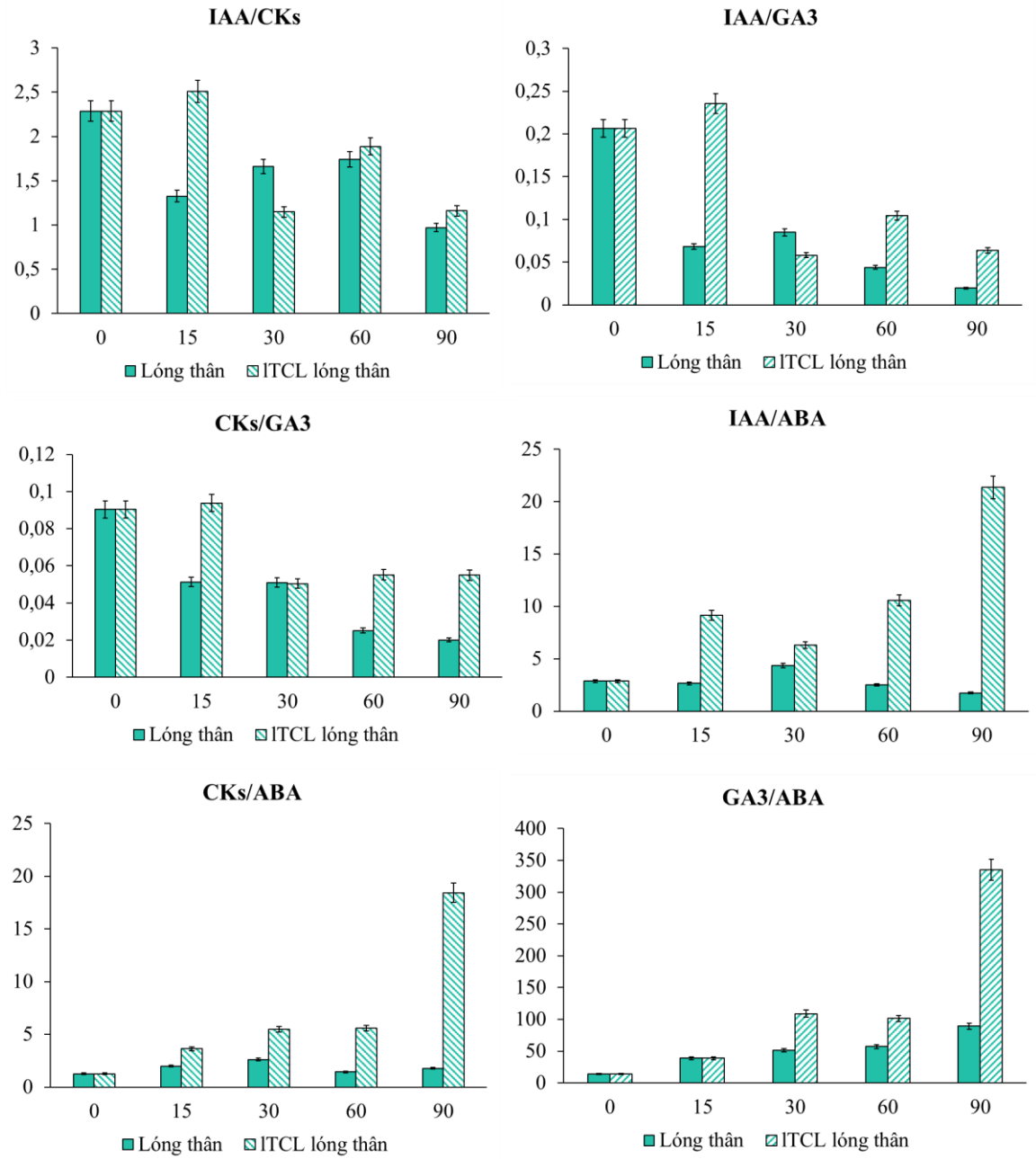
IAA và CKs đóng vai trò quan trọng trong việc kích thích phân chia và phát triển tế bào. Ngược lại, tỷ lệ IAA/GA_3 trong mẫu lTCL lóng thân tăng vào ngày nuôi cấy thứ 15, giảm ở ngày thứ 30 và có sự biến động tăng ở ngày nuôi cấy thứ 60 và giảm lại ở ngày nuôi cấy thứ 90 (Hình 3.19). Điều này có thể chỉ ra rằng sự thay đổi tỷ lệ giữa IAA và GA_3 có ảnh hưởng đến sự phát triển của chồi, với GA_3 đóng vai trò trong việc kích thích sự phát triển và tạo hình chồi.

Tỷ lệ CKs/GA_3 giữa hai loại mẫu cấy có sự khác biệt rõ rệt. Đối với mẫu lóng thân, tỷ lệ này giảm vào ngày thứ 15 và ổn định ở ngày thứ 30, rồi giảm liên tục ở các ngày nuôi cấy sau đó (Hình 3.19). Tuy nhiên, đối với mẫu lTCL lóng thân, tỷ lệ này tăng nhẹ vào ngày thứ 15, giảm vào ngày thứ 60 và tăng lại vào ngày thứ 90, cho thấy một sự điều chỉnh trong việc phối hợp giữa CKs và GA_3 trong việc phát sinh chồi bất định. Tỷ lệ IAA/ABA ổn định ở ngày thứ 15 trong mẫu lóng thân, tăng mạnh ở ngày thứ 30 và giảm liên tục ở ngày thứ 60 và 90. Ngược lại, ở mẫu lTCL lóng thân, tỷ lệ này tăng mạnh ở ngày thứ 15, giảm vào ngày thứ 30, rồi tăng liên tục trong các ngày tiếp theo (Hình 3.19), cho thấy sự khác biệt về tác động của IAA và ABA trong việc điều hòa quá trình phát sinh chồi.

Tỷ lệ CKs/ABA ở mẫu lóng thân có sự biến động tương tự như tỷ lệ IAA/ABA, trong khi tỷ lệ này ở mẫu lTCL lóng thân lại tăng vào ngày thứ 15 và 30, ổn định ở ngày thứ 60, rồi tăng mạnh vào ngày thứ 90. Điều này phản ánh sự tương tác giữa CKs và ABA, đặc biệt là trong việc thúc đẩy sự phát triển chồi trong các giai đoạn nhất định. Cuối cùng, tỷ lệ GA_3/ABA ở mẫu lóng thân tăng liên tục trong suốt quá trình nuôi cấy, đặc biệt là tăng mạnh ở ngày thứ 15 và 30, giảm nhẹ vào ngày thứ 60 và tăng mạnh vào ngày thứ 90 (Hình 3.19). Tỷ lệ này cho thấy một sự kích thích liên tục trong sự phát sinh và phát triển của chồi, đặc biệt là trong giai đoạn nuôi cấy kéo dài.

Quá trình phát sinh chồi bất định ở cây chanh dây trong nuôi cấy mô phản ánh một sự tương tác phức tạp giữa các hormone thực vật. Các tỷ lệ hormone như IAA/CKs, IAA/GA_3, CKs/GA_3, IAA/ABA, CKs/ABA và GA_3/ABA đều cho thấy sự biến động mạnh trong suốt quá trình nuôi cấy. Sự thay đổi tỷ lệ giữa các hormone này có thể giải thích được các giai đoạn phát sinh và phát triển chồi bất định, khi các hormone như IAA và CKs chủ yếu thúc đẩy sự phân chia tế bào và phát triển mô, trong khi GA_3 và ABA điều hòa sự phát triển và tạo hình các chồi. Mỗi hormone có

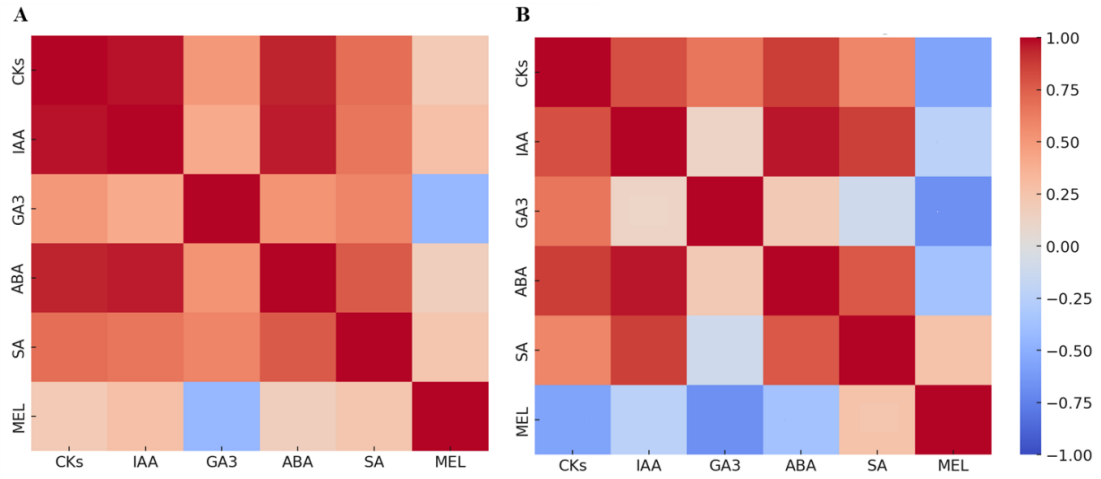
vai trò riêng biệt và tác động đến quá trình phát sinh chồi theo những cách khác nhau, từ việc kích thích sự phân chia tế bào đến việc điều chỉnh sự biệt hóa của mô, tạo ra một quá trình phát sinh chồi linh hoạt và hiệu quả trong nuôi cấy mô.



Hình 3.19. Tỷ lệ của các hormone nội sinh trong mẫu chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây.

Mối tương quan giữa các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh chồi bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây cho thấy nhiều mối quan hệ phức tạp giữa các hormone (Hình 3.20). Ở mẫu lóng thân, các hormone hầu như có mối tương quan thuận với nhau (ngoại trừ GA_3 và MEL), cho thấy sự phối hợp hài hòa giữa các hormone nội sinh trong quá trình hình thành chồi bất định. Tuy nhiên, ở

mẫu lTCL lóng thân, MEL lại có mối tương quan nghịch với hầu hết các hormone còn lại, đặc biệt rõ rệt với CKs và ABA (Hình 3.20), phản ánh xu hướng điều hòa đối lập. Sự thay đổi này cho thấy cơ chế điều hòa hormone nội sinh trong sự hình thành chồi bất định khác nhau tùy theo nguồn mẫu. MEL trong mẫu lTCL có thể đóng vai trò ức chế hoặc điều hòa nghịch so với vai trò phối hợp của nó trong mẫu lóng thân, từ đó phản ánh những khác biệt sinh lý tiềm ẩn giữa hai nguồn mẫu tái sinh *in vitro*.



Hình 3.20. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân **(A)** và lTCL lóng thân **(B)** của cây chanh dây. 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.

Ở mẫu lóng thân, sự kết hợp giữa CKs và GA_3 đóng vai trò then chốt trong việc thúc đẩy sự phát sinh và phát triển chồi. CKs giúp kích thích phân chia tế bào, trong khi GA_3 hỗ trợ kéo dài tế bào và thúc đẩy chiều cao của chồi. Mối tương quan thuận mạnh mẽ giữa CKs và GA_3 (Hình S1) cho thấy sự cộng hưởng giữa hai hormone này là yếu tố chính trong việc phát sinh chồi. Tuy nhiên, mối tương quan giữa IAA và GA_3 trong mẫu này khá yếu (Hình S1), cho thấy rằng IAA không đóng vai trò chủ chốt trong sự phát sinh chồi ở lóng thân. Một điểm đáng chú ý là IAA và ABA có mối tương quan thuận mạnh mẽ trong mẫu lóng thân (Hình S1), cho thấy sự tương tác hỗ trợ giữa hai hormone này trong việc điều hòa quá trình phát sinh chồi.

Ở mẫu lTCL lóng thân, tác động của CKs và GA_3 vẫn giữ vai trò chủ đạo trong việc thúc đẩy sự phát sinh và phát triển chồi (Hình S1). Mối tương quan mạnh mẽ giữa CKs và GA_3 trong mẫu này chỉ ra rằng sự kết hợp giữa hai hormone này tiếp tục là yếu tố quyết định trong việc thúc đẩy sự phát sinh chồi và chiều cao chồi (Hình

S1). Tuy nhiên, mối tương quan giữa IAA và GA_3 trong mẫu lTCL lóng thân vẫn yếu (Hình S1), cho thấy sự cộng hưởng giữa hai hormone này không đủ mạnh để đóng vai trò chính trong sự phát sinh chồi. IAA và ABA trong mẫu lTCL lóng thân có mối tương quan thuận tương tự như trong mẫu lóng thân (Hình S1). Điều này cho thấy rằng IAA và ABA có thể tương tác hỗ trợ trong việc điều hòa quá trình phát sinh chồi, mặc dù ABA thường được biết đến là yếu tố ức chế. Sự tương tác giữa IAA và ABA có thể giúp điều chỉnh sự phát sinh chồi, đặc biệt trong điều kiện môi trường thay đổi.

Ở mẫu lóng thân, CKs và GA_3 là hai hormone quan trọng nhất trong việc thúc đẩy sự phát sinh và phát triển chồi. Mặc dù IAA và GA_3 có sự tương tác nhẹ, nhưng IAA và ABA có sự hỗ trợ lẫn nhau trong việc điều hòa quá trình phát sinh chồi. Tương tự như mẫu lóng thân, CKs và GA3 vẫn là yếu tố chủ yếu thúc đẩy sự phát sinh chồi và phát triển chiều cao chồi ở mẫu lTCL lóng thân. IAA và ABA có sự tương tác tích thuận, nhưng vai trò của chúng là điều hòa và không mạnh mẽ như CKs và GA_3 trong việc thúc đẩy sự phát sinh chồi.

Kết quả cho thấy CKs có biến động mạnh, giảm ở giai đoạn đầu nhưng tăng rõ ở giai đoạn cảm ứng chồi, trong khi IAA, GA_3 và ABA đều suy giảm ở giai đoạn đầu rồi ổn định. Xu hướng này tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đó, khi CKs được xác định là yếu tố quyết định quá trình phát sinh chồi *de novo* [10, 11]. Hu và cộng sự [12] cũng chỉ ra rằng sự tác động của AUX nội sinh ảnh hưởng mạnh đến khả năng phát sinh chồi ở cây *citrus*. Như vậy, kết quả từ nghiên cứu này đã khẳng định tính phổ quát của nguyên lý "AUX giảm - CKs tăng" trong quá trình tái sinh chồi bất định.

Nồng độ hormone nội sinh và tỷ lệ của chúng có ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái ở các loại mẫu cấy khác nhau [66]. Vai trò của tín hiệu CKs và AUX là trung tâm của toàn bộ quá trình phát sinh chồi bất định, trong đó giai đoạn đầu chịu sự chi phối của AUX và giai đoạn sau chịu sự chi phối của CKs. Xét đến quan sát ban đầu của Skoog và Miller [25] rằng tỉ lệ CKs/AUX cao thì thuận lợi cho sự phát triển chồi, nhu cầu chung về quá trình tái sinh có thể được giải thích bởi sự khác biệt trong yêu cầu hình thái giữa các giai đoạn sớm và muộn của quá trình phát sinh chồi.

Trong nghiên cứu này, sự khác biệt về mối tương quan hormone nội sinh giữa mẫu lóng thân và mẫu lTCL lóng thân trong quá trình tái sinh chồi của cây chanh dây chủ yếu bắt nguồn từ đặc điểm sinh lý và mức độ tổn thương mô. Mẫu lóng thân có cấu trúc mô học ổn định và mức độ biệt hóa cao, do đó phản ứng hormone diễn ra

trong điều kiện nội bào tương đối ổn định, dẫn đến sự phối hợp thuận chiều giữa các hormone tăng trưởng như IAA, CKs, ABA với MEL. Trong khi đó, mẫu lTCL lóng thân với kích thước nhỏ, tỷ lệ tiếp xúc môi trường cao và chịu tổn thương cơ học do vết cắt kích hoạt các cơ chế phản ứng stress, bao gồm sự tích lũy MEL và các hormone liên quan đến ức chế hoặc điều hòa cân bằng nội sinh. Điều này giải thích vì sao MEL trong mẫu lTCL có xu hướng tương quan nghịch với các hormone nội sinh, trái ngược với vai trò hỗ trợ tái sinh trong mẫu lóng thân. Sự khác biệt này phản ánh mạng lưới điều hòa hormone phức tạp, phụ thuộc vào trạng thái mô cảm ứng và ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả tái sinh chồi.

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

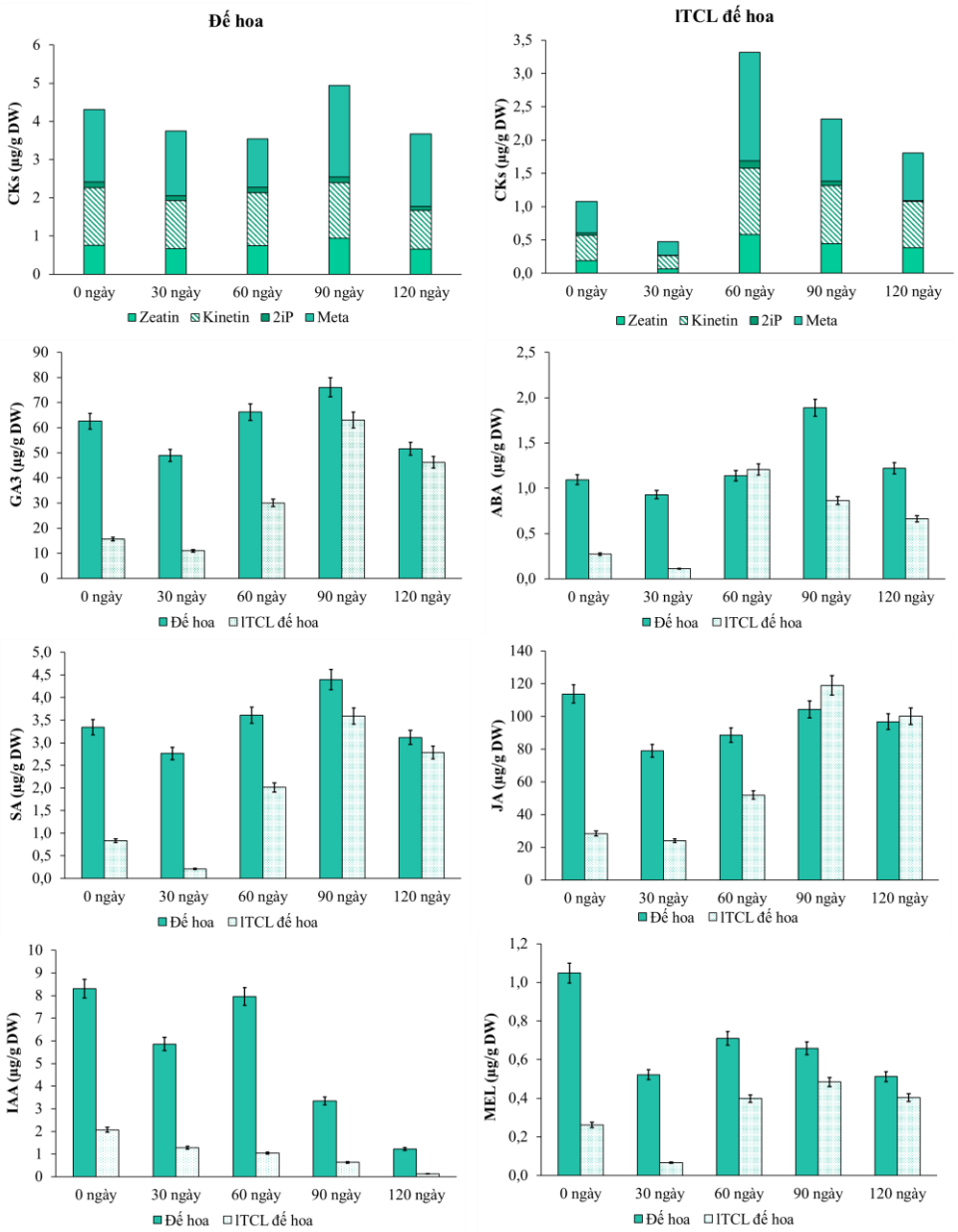
Kết quả phân tích sự biến động của các hormone trong quá trình hình thành phôi soma của mẫu đế hoa cây hoa đồng tiền cho thấy sự thay đổi rõ rệt của các hormone trong hai mẫu đế hoa và lTCL đế hoa qua từng giai đoạn nuôi cấy (Hình 3.21).

Kết quả phân tích cho thấy, hầu hết các hormone nội sinh có xu hướng giảm ở giai đoạn nuôi cấy ban đầu (ngày thứ 30) và tăng lên ở ngày nuôi cấy thứ 60 (Hình 3.21). Cụ thể, đối với nhóm hormone CKs, hàm lượng này tương đối ổn định ở ngày nuôi cấy thứ 30 và 60, giảm nhẹ liên tục trong giai đoạn đầu, sau đó tăng vào ngày thứ 90 rồi tiếp tục giảm ở ngày thứ 120 đối với mẫu đế hoa (Hình 3.21). Đối với mẫu lTCL đế hoa, hàm lượng CKs tăng mạnh vào ngày thứ 60, nhưng lại giảm dần vào ngày thứ 90 và 120 (Hình 3.21). CKs (ZEA, KIN, 2iP và Meta) được phân tích thể hiện mối quan hệ tương hỗ, tức là sự gia tăng nồng độ của một loại thường trùng với sự giảm nồng độ của loại còn lại (Hình 3.21). Đối với hai hormone GA_3 và SA, hàm lượng hormone tăng mạnh ở ngày thứ 60 và 90, rồi giảm dần ở ngày thứ 120 ở cả hai loại mẫu cấy (Hình 3.21). Trong khi đó, hormone ABA thể hiện sự biến động khác biệt, ở mẫu lTCL đế hoa, hàm lượng ABA tăng vào ngày thứ 60 và giảm dần ở các ngày tiếp theo (90 và 120), trong khi ở mẫu đế hoa, hàm lượng ABA tiếp tục tăng ở ngày thứ 90 và giảm mạnh ở ngày thứ 120 (Hình 3.21).

Hàm lượng JA ở cả hai mẫu cấy đều có xu hướng tăng vào ngày thứ 60 và 90 rồi giảm vào ngày thứ 120 (Hình 3.21). Đối với IAA, mẫu đế hoa thể hiện sự tăng ở ngày thứ 60, sau đó giảm dần vào ngày thứ 90 và 120, trong khi mẫu lTCL đế hoa lại

có xu hướng giảm liên tục suốt quá trình nuôi cấy (Hình 3.21). Đối với MEL, mẫu đế hoa cho thấy hàm lượng MEL tăng ở ngày thứ 60, nhưng sau đó giảm liên tục ở các ngày thứ 90 và 120. Trong khi đó, mẫu lTCL đế hoa có sự gia tăng của MEL vào ngày thứ 90 và giảm nhẹ ở ngày thứ 120 (Hình 3.21).

Nghiên cứu cho thấy sự biến động rõ rệt của các hormone nội sinh trong quá trình hình thành phôi soma của cây hoa đồng tiền. Các hormone như CKs, GA_3, SA, ABA, JA, IAA và MEL có xu hướng thay đổi theo từng giai đoạn nuôi cấy. Mỗi mẫu cấy (đế hoa và lTCL đế hoa) thể hiện những xu hướng biến động khác nhau, đặc biệt là trong giai đoạn 60 đến 90 ngày, khi hầu hết các hormone có sự biến động đáng kể.

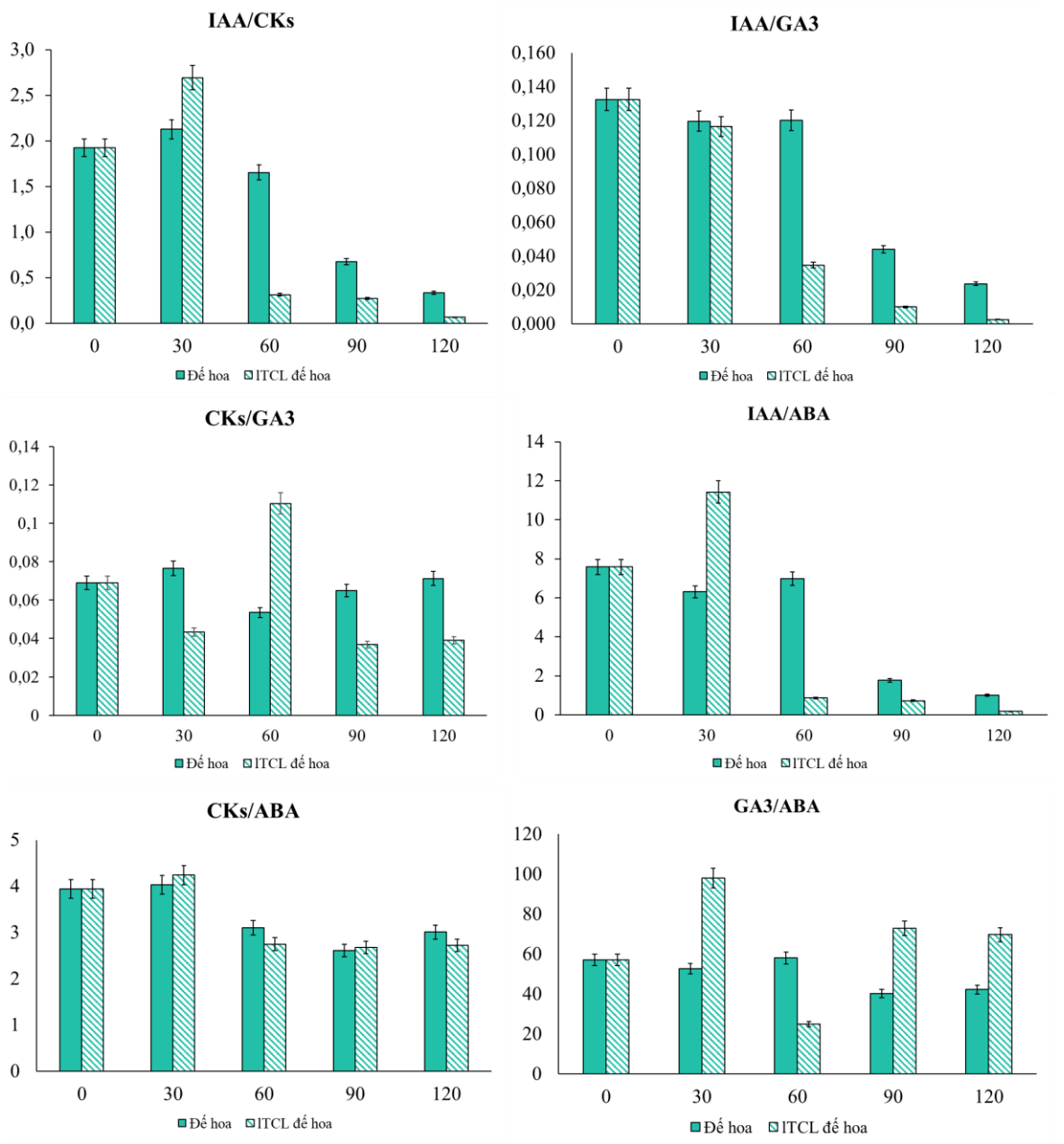


Hình 3.21. Sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành phôi soma của mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền.

Tỷ lệ IAA/CKs có sự thay đổi rõ rệt trong suốt quá trình nuôi cấy. Cụ thể, tỷ lệ này tăng vào ngày nuôi cấy thứ 30, sau đó giảm dần cho đến hết thời gian nuôi cấy, ở cả hai loại mẫu cấy đế hoa và lTCL (Hình 3.22). Tỷ lệ IAA/GA_3 giảm liên tục suốt quá trình nuôi cấy, mặc dù có một sự gia tăng nhẹ vào ngày thứ 60 đối với mẫu đế hoa, nhưng lại giảm mạnh ở các ngày nuôi cấy tiếp theo. Tỷ lệ CKs/GA_3 cho thấy sự gia tăng vào ngày nuôi cấy thứ 30, sau đó giảm vào ngày thứ 60 và tiếp tục tăng ở các ngày thứ 90 và 120 đối với mẫu đế hoa. Tuy nhiên, đối với mẫu lTCL đế hoa, tỷ lệ này lại giảm vào ngày nuôi cấy thứ 30, sau đó tăng mạnh vào ngày thứ 60 rồi giảm mạnh và duy trì ổn định vào ngày thứ 90 và 120 (Hình 3.22).

Tỷ lệ IAA/ABA có xu hướng giảm đối với mẫu đế hoa và tăng mạnh ở mẫu lTCL vào ngày nuôi cấy thứ 30 (Hình 3.22). Sau đó, tỷ lệ này tăng nhẹ đối với mẫu đế hoa và giảm mạnh đối với mẫu lTCL. Trong suốt quá trình nuôi cấy còn lại (ngày thứ 90 và 120), tỷ lệ này giảm liên tục ở cả hai loại mẫu cấy. Đối với tỷ lệ CKs/ABA, tỷ lệ này tăng vào ngày nuôi cấy thứ 30 và giảm vào ngày thứ 60 ở cả hai loại mẫu cấy. Tuy nhiên, trong giai đoạn tiếp theo, tỷ lệ này có sự giảm xuống và sau đó lại tăng ở mẫu đế hoa, trong khi tỷ lệ này ổn định đối với mẫu lTCL (Hình 3.22). Tỷ lệ GA_3/ABA cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa hai loại mẫu cấy. Đối với mẫu đế hoa, tỷ lệ này tương đối ổn định ở ngày nuôi cấy thứ 30 và 60, sau đó giảm vào ngày thứ 90 và tăng nhẹ vào ngày thứ 120. Ngược lại, đối với mẫu lTCL đế hoa, tỷ lệ GA_3/ABA tăng mạnh vào ngày nuôi cấy thứ 30, sau đó giảm mạnh vào ngày thứ 90 và tăng trở lại, ổn định ở các ngày thứ 90 và 120 (Hình 3.22).

Kết quả từ nghiên cứu cho thấy sự thay đổi tỷ lệ giữa các hormone thực vật như IAA, CKs, GA_3, ABA trong suốt quá trình phát sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền. Tỷ lệ các hormone này có xu hướng biến động theo các giai đoạn nuôi cấy, phản ánh sự tương tác phức tạp giữa các yếu tố sinh lý và sinh hóa của mẫu cấy trong việc kích thích sự phân chia tế bào đến sự hình thành mô phôi soma.

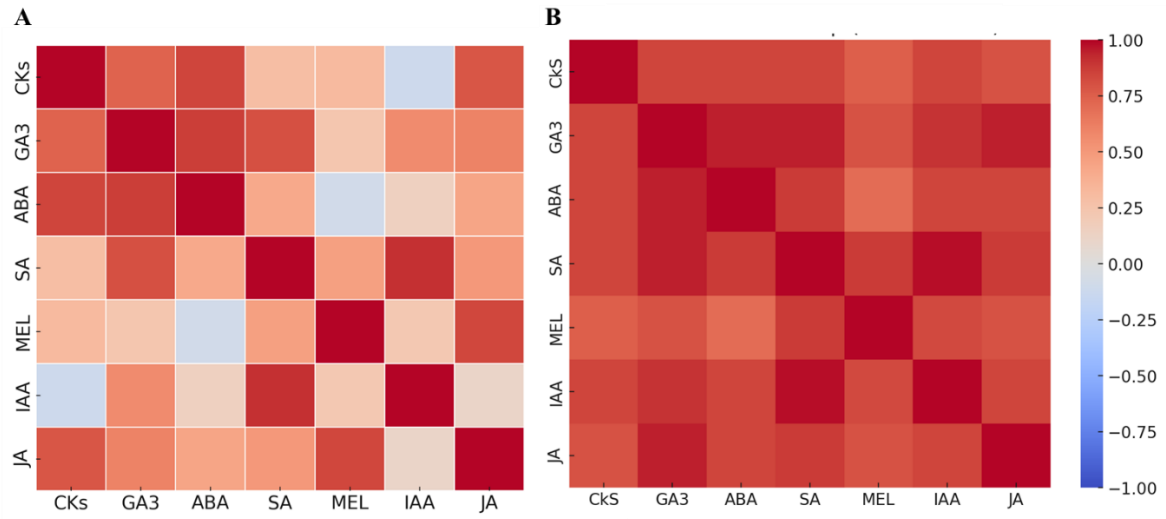


Hình 3.22. Tỷ lệ của các hormone nội sinh trong mẫu phôi soma có nguồn gốc từ mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền.

Trong quá trình phát sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền, mối tương quan giữa các hormone nội sinh trong mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cho thấy sự tương tác mạnh mẽ giữa các hormone và ảnh hưởng của chúng đến sự phát triển và phát sinh phôi soma (Hình 3.23).

Ở mẫu đế hoa, sự tương quan giữa các hormone tương đối yếu (đỏ nhạt và xanh nhạt), thể hiện sự tương tác yếu của các hormone trong quá trình hình thành phôi soma ở loại mẫu cấy này (Hình 3.24). Ngược lại, ở mẫu lTCL đế hoa, các mối tương quan giữa các hormone đều chuyển sang hướng thuận chiều rõ rệt, với các ô màu đỏ

đồng đều trải rộng toàn bộ ma trận (Hình 3.23). MEL và IAA thay vì có xu hướng đối lập với ABA và CKs như trong mẫu đế hoa, lại thể hiện mối tương quan thuận với tất cả các hormone còn lại ở mẫu lTCL đế hoa. Điều này cho thấy trong điều kiện cảm ứng phôi soma từ lTCL lóng thân, các hormone có xu hướng hoạt động đồng bộ và phối hợp chặt chẽ hơn. Sự khác biệt về mô hình tương quan này phản ánh sự thay đổi trong mạng lưới điều hòa hormone tùy thuộc vào nguồn mô cảm ứng, từ đó ảnh hưởng đến hiệu quả và cơ chế phát sinh phôi soma ở từng loại mẫu cấy.



Hình 3.23. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong phôi soma có nguồn gốc từ mẫu đế hoa **(A)** và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền **(B)**. 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.

Quá trình phát sinh phôi soma của cây đồng tiền được điều hòa mạnh mẽ bởi các hormone nội sinh như GA_3, IAA, ABA, ZEA và KIN. Mối quan hệ giữa các hormone này và các chỉ tiêu sinh trưởng như số phôi soma, hình thái phôi soma và tỷ lệ phát sinh phôi soma đã được nghiên cứu trong hai loại mẫu cấy (mẫu đế hoa nguyên vẹn và mẫu lTCL đế hoa) (Hình S2). Dựa trên dữ liệu sinh trưởng và kết quả từ heatmap, có thể nhận thấy rõ sự ảnh hưởng của các hormone nội sinh đến quá trình phát sinh phôi soma trong từng loại mẫu cấy.

Kết quả từ heatmap cho thấy các hormone như GA_3, IAA và ZEA có sự tương quan mạnh mẽ với nhau, đặc biệt là trong việc kích thích sự phân chia tế bào và phát sinh phôi soma (Hình S2). Cụ thể, GA_3 thúc đẩy sự phân chia và kéo dài của tế bào, từ đó tăng số lượng phôi soma, đặc biệt ở các giai đoạn 90 và 120 ngày. Dữ liệu sinh

trưởng cho thấy mẫu đế hoa nguyên vẹn có số lượng phôi soma tăng dần theo thời gian, với số phôi đạt cao nhất vào ngày thứ 120. Tuy nhiên, số lượng phôi soma ở các giai đoạn đầu (30 và 60 ngày) của mẫu này còn thấp và có sự phát triển chậm. Về hình thái phôi soma, mẫu đế hoa chủ yếu phát sinh các phôi soma với hình thái hình cầu và hình tim, với tỷ lệ phôi có hình dạng này chiếm ưu thế. Điều này cho thấy sự phát sinh phôi soma diễn ra khá ổn định nhưng thiếu sự đa dạng về hình thái, đặc biệt là sự phát sinh phôi hai lá mầm và đa phôi, điều này có thể do sự thiếu hụt sự điều hòa của các hormone như ABA, vốn có vai trò trong việc ổn định sự phát sinh phôi soma.

Mẫu lTCL đế hoa, mặc dù số lượng phôi ở giai đoạn 30 và 60 ngày thấp hơn so với mẫu đế hoa, nhưng số phôi ở giai đoạn 90 và 120 ngày vượt trội hơn (Hình S2). Heatmap cho thấy sự tương quan giữa GA_3 và IAA vẫn duy trì, nhưng mức độ tương quan này có thể yếu hơn so với mẫu đế hoa nguyên vẹn, phản ánh sự phát sinh phôi soma ổn định và chậm hơn ở các giai đoạn đầu. Tuy nhiên, mẫu lTCL đế hoa lại có sự phát sinh phôi vượt trội ở các giai đoạn sau, với số lượng phôi soma đạt mức cao nhất vào ngày thứ 120. Một điểm đáng chú ý là mẫu lTCL đế hoa có sự đa dạng hình thái phôi soma cao hơn, đặc biệt là sự phát sinh các phôi hai lá mầm và đa phôi. Đây là yếu tố quan trọng trong việc tạo ra các phôi hoàn thiện và đa dạng, phù hợp với các ứng dụng yêu cầu phôi soma phát triển tốt và có hình thái đa dạng. Sự đa dạng này có thể được lý giải qua sự hiệp đồng của GA_3, IAA và ABA trong việc điều chỉnh sự phát sinh phôi soma, đặc biệt là khả năng điều hòa sự phát triển của phôi soma của mẫu lTCL (Hình S2). Điều này cho thấy mẫu lTCL đế hoa không chỉ giúp tăng số lượng mà còn tạo ra phôi soma với chất lượng và đa dạng hình thái cao hơn.

Tóm lại, các hormone nội sinh như GA_3, IAA, ZEA có tác động mạnh mẽ đến số phôi soma, đặc biệt là trong mẫu đế hoa nguyên vẹn, với sự phát sinh phôi soma ổn định và nhanh chóng. Tuy nhiên, mẫu đế hoa thiếu sự đa dạng hình thái phôi soma, chủ yếu phát sinh các phôi hình cầu và hình tim. Trong khi đó, mẫu lTCL đế hoa mặc dù có số lượng phôi thấp hơn ở các giai đoạn đầu, nhưng lại thể hiện sự phát sinh phôi vượt trội và đa dạng hình thái phôi soma ở các giai đoạn sau. Sự điều hòa của ABA trong mẫu lTCL giúp duy trì sự phát sinh phôi ổn định và tạo ra phôi với hình thái hoàn thiện và đa dạng. Việc hiểu rõ sự tác động của các hormone nội sinh đối với các chỉ tiêu sinh trưởng sẽ giúp tối ưu hóa quy trình phát sinh phôi soma trong

cây đồng tiền, phục vụ cho các ứng dụng nhân giống cây trồng và nghiên cứu giống cây trong tương lai.

Quá trình phát sinh phôi soma có liên quan chặt chẽ đến những thay đổi về hàm lượng hormone nội sinh [115, 177]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng hormone nội sinh thực vật thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của thực vật trong điều kiện phối hợp và điều hòa lẫn nhau của nhiều loại hormone khác nhau [178]. Các hormone thực vật được nghiên cứu nhiều nhất bao gồm AUX, CKs, ABA và GA. AUX tham gia vào quá trình thiết lập và duy trì tính phân cực của tế bào [179]. Trong quá trình phát sinh phôi soma, nồng độ IAA nội sinh cao cũng có mối tương quan thuận với khả năng phát sinh phôi soma cao [180], nhưng khi quá trình phát triển phôi soma được thiết lập và tiến triển đến một mức độ nào đó, nồng độ IAA lại giảm xuống [181].

CKs cũng là chìa khóa để tạo ra phôi soma. Tuy nhiên, Jiménez và Bangerth [180] không tìm thấy bất kỳ sự khác biệt nào về mức độ CKs nội sinh giữa mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma và mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi trong nghiên cứu về phôi soma cà rốt, chỉ ra rằng CKs có thể đóng vai trò thứ yếu trong việc xác định khả năng phát sinh phôi của mô sẹo cây cà rốt. Điều này cũng cho thấy rằng nhu cầu về các loại hormone nội sinh khác nhau rất khác nhau giữa các loài thực vật khác nhau. Cũng có nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ CKs cao là cần thiết trong giai đoạn phân chia tế bào ban đầu của quá trình phát sinh phôi soma, nhưng không cần thiết cho các giai đoạn sau của quá trình phát triển và trưởng thành của phôi soma [182].

Trong quá trình phát sinh phôi soma, sự phối hợp của AUX và ABA đóng vai trò trung tâm; IAA giảm dần trong khi ABA gia tăng ở giai đoạn giữa - cuối, điều hòa sự trưởng thành và ổn định của phôi soma. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Yang và Zhang [21] về vai trò điều hòa của AUX - ABA trong quá trình phát sinh phôi soma. Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận tiềm năng phôi soma giảm dần qua các lần cấy chuyển [20] và kết quả ở hoa đồng tiền củng cố giả thuyết rằng sự mất cân bằng hormone là nguyên nhân chính.

Việc duy trì khả năng phát sinh phôi soma của thực vật là một quá trình sinh lý và sinh hóa phức tạp. Do đó, hàm lượng của một hormone đơn lẻ không thể giải thích hoàn toàn vai trò của nó, mà sự cân bằng giữa các hormone mới là yếu tố then chốt và thường được sử dụng để đánh giá quá trình phát sinh phôi soma [183-185]. Kết

quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy so với các hormone nội sinh khác, tỷ lệ MeJA/ABA, IAA/ABA và GA_3/ABA cao có lợi cho việc duy trì năng lực phôi hóa ở thông đỏ Hàn Quốc, trong khi tỷ lệ MeJA/ABA và IAA/ABA thấp lại thuận lợi cho sự phân hóa phôi soma sớm. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy ở cây *Cyathea delgadii* [183], *Picea balfouriana* [186] và *Ormosia henryi* [185], trong đó tỷ lệ IAA/ABA và GA_3/ABA ở mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma cao hơn rõ rệt so với mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi soma. Ngoài ra, tỷ lệ IAA/ABA quá cao (chủ yếu do IAA tăng cao) cũng có thể gây hóa nâu. Garcia và cộng sự [187] đề cập rằng sự suy giảm hoặc mất khả năng tạo phôi soma ở các dòng cấy lâu dài có thể một phần do sự tích lũy AUX và mất cân bằng chuyển hóa AUX và quá trình nuôi cấy dài hạn này có thể điều chỉnh các thay đổi hình thái ở tế bào mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma.

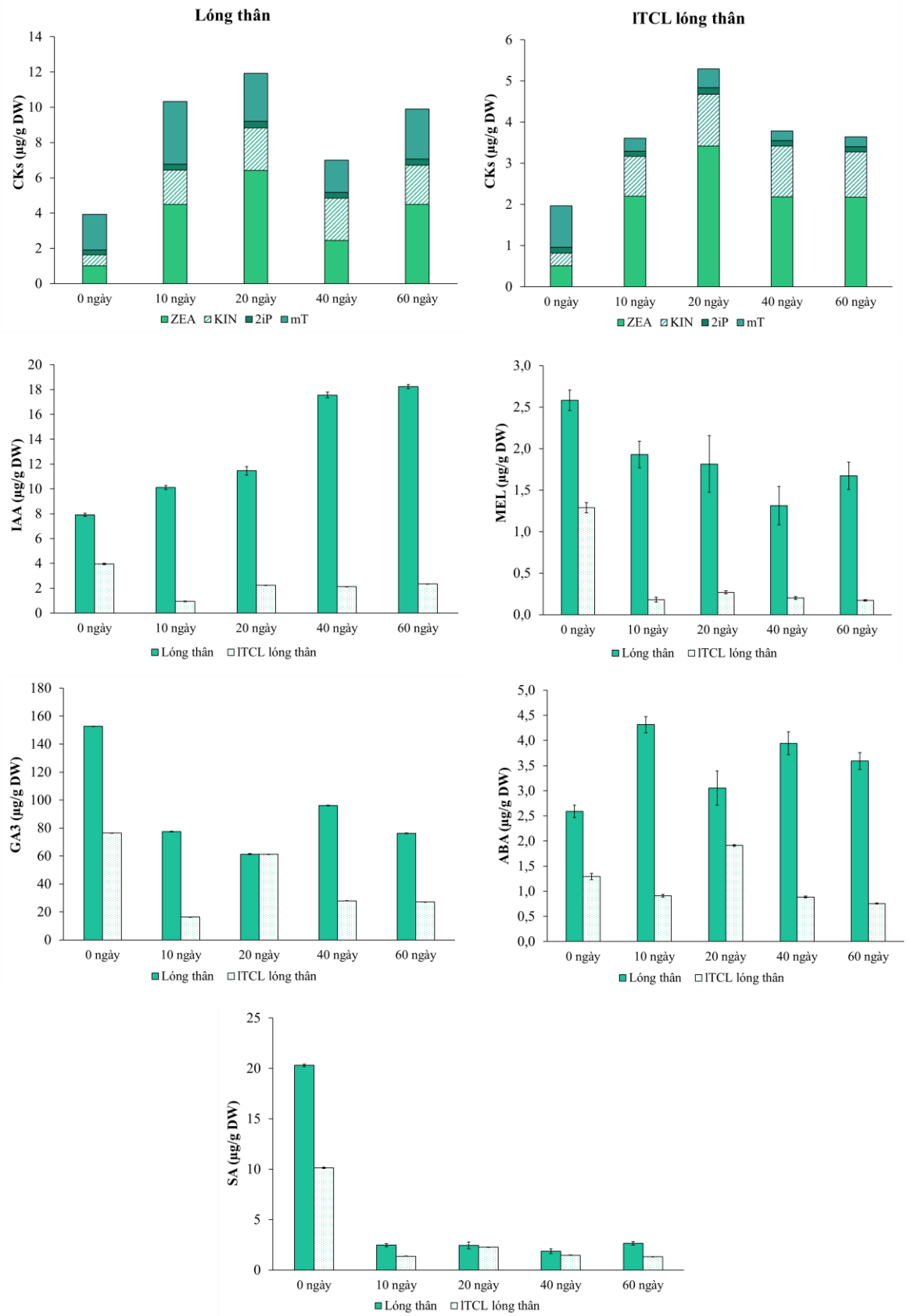
Trong quá trình phát sinh phôi soma của cây hoa đồng tiền, sự khác biệt về mối tương quan hormone giữa mẫu đế hoa và mẫu lTCL lóng thân cũng phản ánh sự khác biệt về bản chất sinh học của hai loại mô. Mẫu đế hoa là mô sinh sản với hoạt tính sinh trưởng cao và độ linh hoạt sinh lý lớn, thường đi kèm với sự điều tiết hormone tinh vi nhằm kiểm soát chính xác các quá trình phân hóa và hình thành cơ quan. Do đó, các hormone như MEL, ABA và SA trong mẫu đế hoa có thể thể hiện mối tương quan nghịch, nhằm tạo ra sự cân bằng nội sinh phù hợp cho quá trình phôi hóa. Trái lại, trong mẫu lTCL đế hoa phản ứng hormone trở nên đơn giản và mang tính đồng bộ hơn. Điều này thể hiện qua mối tương quan thuận chiều rõ rệt giữa hầu hết các hormone, bao gồm MEL, IAA, GA_3 và ABA, cho thấy sự hợp tác nội sinh nhằm phân chia và hình thành phôi soma. Như vậy, chính sự khác biệt về loại mô, mức độ biệt hóa và trạng thái sinh lý đã chi phối mạnh mẽ đến cơ chế điều hòa hormone trong quá trình phát sinh phôi soma.

Tóm lại, cả hai mẫu cấy đều cho thấy sự tương tác mạnh mẽ giữa các hormone nội sinh trong việc điều hòa sự phát sinh phôi soma. Tuy nhiên, trong mẫu lTCL đế hoa, các mối tương quan giữa các hormone mạnh hơn và có sự phối hợp chặt chẽ hơn, đặc biệt trong việc điều chỉnh sự phát sinh phôi soma và sự phát triển tế bào. Điều này cho thấy mẫu lTCL đế hoa có sự điều hòa hormone mạnh mẽ hơn trong quá trình phát sinh phôi soma so với mẫu đế hoa.

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

Đối với cây diệp hạ châu, biến động hormone nội sinh đã được quan sát thấy trong quá trình hình thành mô sẹo và rễ bất định từ các mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu (Hình 3.24 và 3.25). Hầu hết các hormone nội sinh giảm mạnh trong 10 ngày đầu nuôi cấy (ngoại trừ hàm lượng CKs trong mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lóng thân, hàm lượng IAA trong mô sẹo và rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và hàm lượng ABA trong mô sẹo có nguồn gốc từ cả 2 loại mẫu cấy) (Hình 3.24 và 3.25).

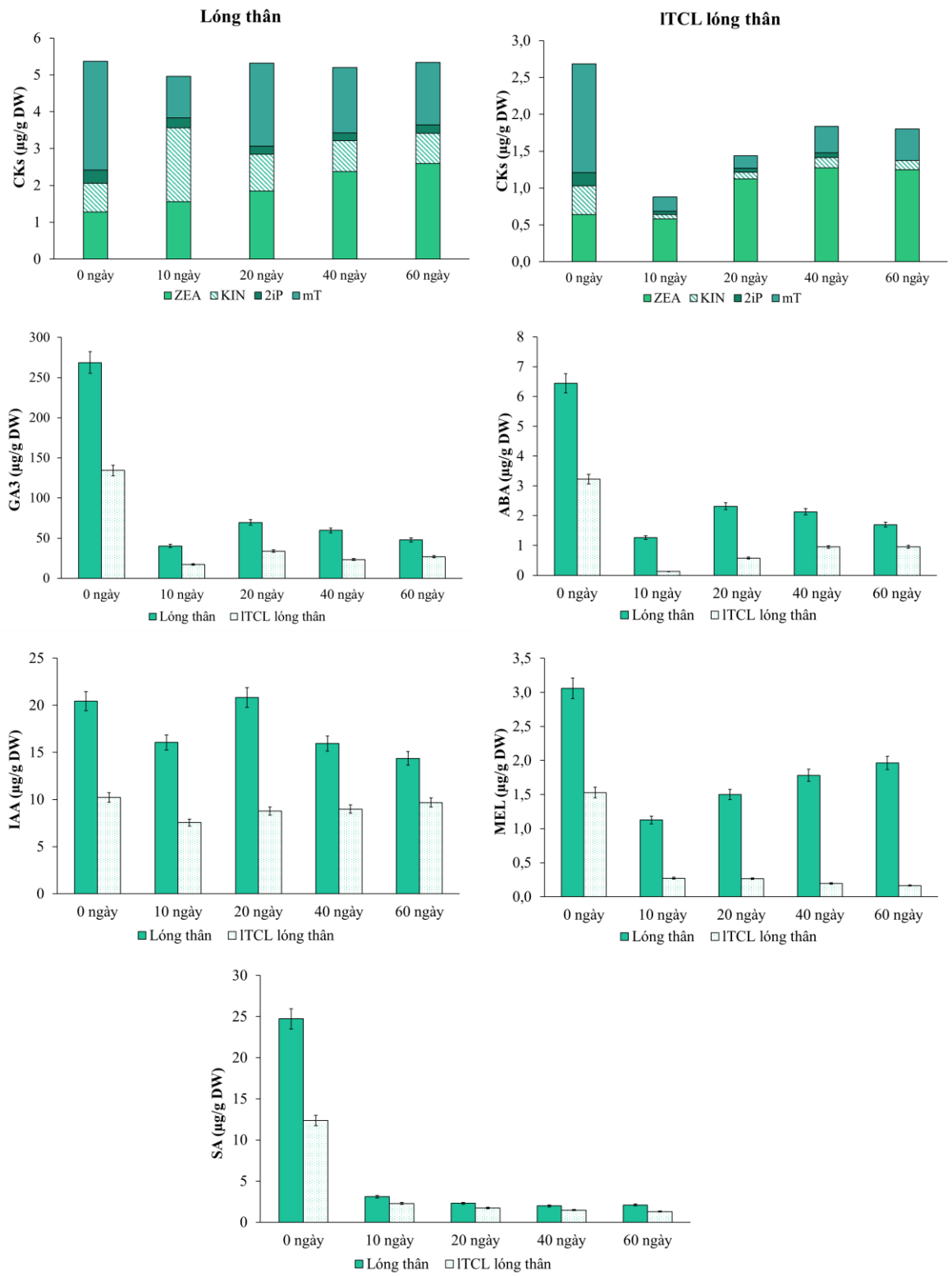
Đối với sự hình thành mô sẹo, trong suốt thời gian nuôi cấy, nồng độ CKs biểu hiện sự gia tăng đều từ ngày đầu tiên cho đến ngày thứ 20 ở các mẫu lóng thân và lTCL lóng thân, sau đó giảm dần trong những ngày nuôi cấy còn lại. Tuy nhiên, trong mẫu lóng thân, mức CKs tăng đột biến vào ngày nuôi cấy thứ 60 (Hình 3.24). Ngược lại, hàm lượng GA_3, SA và MEL giảm đáng kể vào ngày nuôi cấy thứ 10 (Hình 3.24). Trong mẫu lóng thân, hàm lượng GA_3 tăng dần, đạt cao nhất vào ngày nuôi cấy thứ 40 (Hình 3.24), trong khi hàm lượng SA vẫn tương đối ổn định trong suốt thời gian nuôi cấy (Hình 3.24). Hàm lượng MEL tiếp tục giảm cho đến ngày thứ 40, sau đó MEL có xu hướng tăng trở lại vào ngày nuôi cấy thứ 60 (Hình 3.24). Đối với mẫu cấy lTCL lóng thân, các hormone này đạt cao nhất vào ngày nuôi cấy thứ 20, sau đó giảm dần vào ngày thứ 40 và ngày thứ 60. Các xu hướng tương tự đã được quan sát thấy ở hàm lượng IAA và ABA trong mẫu cấy lTCL lóng thân. Tuy nhiên, trong mẫu cấy lóng thân, hàm lượng IAA tăng đều trong suốt quá trình nuôi cấy (Hình 3.24), trong khi ABA biểu hiện sự kiểu dao động bất thường, với nồng độ cao nhất được ghi nhận vào ngày thứ 10, sau đó giảm vào ngày thứ 20 và tăng trở lại vào ngày thứ 40 của quá trình nuôi cấy (Hình 3.24).



Hình 3.24. Sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành mô sẹo của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu.

Nghiên cứu này cũng quan sát thấy sự biến động ở hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành rễ bất định. Tất cả các hormone được kiểm tra trong cả hai loại mẫu cấy đều biểu hiện sự suy giảm vào ngày thứ 10 của quá trình nuôi cấy, sau đó là sự gia tăng vào ngày nuôi cấy thứ 20, ngoại trừ SA (Hình 3.25). Tuy nhiên, có sự chênh lệch trong động học hormone giữa hai loại nuôi cấy. Trong mẫu cấy lóng thân, CKs biểu hiện sự biến động với cả sự tăng và giảm trong quá trình nuôi cấy (Hình 3.25). Hàm lượng IAA, GA_3 và ABA đều giảm vào ngày thứ 10, đạt cao nhất vào ngày thứ 20 và sau đó giảm dần trong suốt thời gian nuôi cấy còn lại (Hình 3.25). Hàm lượng SA biểu hiện sự giảm liên tục từ ngày thứ 10 đến ngày thứ 40, ổn định vào ngày thứ 60 của quá trình nuôi cấy (Hình 3.25), trong khi hàm lượng MEL giảm vào ngày thứ 10 và biểu hiện sự gia tăng liên tục trong suốt thời gian nuôi cấy (Hình 3.25). Ngược lại, ở mẫu lTCL lóng thân, hàm lượng CKs, IAA và ABA giảm vào ngày thứ 10, tăng dần và đạt đỉnh vào ngày nuôi cấy thứ 40 (Hình 3.25). Trong khi đó, hàm lượng SA cho thấy sự giảm liên tục trong toàn bộ thời gian nuôi cấy (Hình 3.25). Hàm lượng GA_3 và MEL giảm vào ngày thứ 10, sau đó tăng lên, đạt đỉnh vào ngày nuôi cấy thứ 20 (Hình 3.25). Sự thay đổi về hàm lượng MEL trái ngược với sự thay đổi của IAA (Hình 3.25) mặc dù 2 loại hormone này có vai trò về mặt cấu trúc và sinh lý tương tự nhau. Chính vì vậy, cần có thêm các nghiên cứu để làm rõ mối quan hệ giữa 2 loại hormone này trong thực vật.

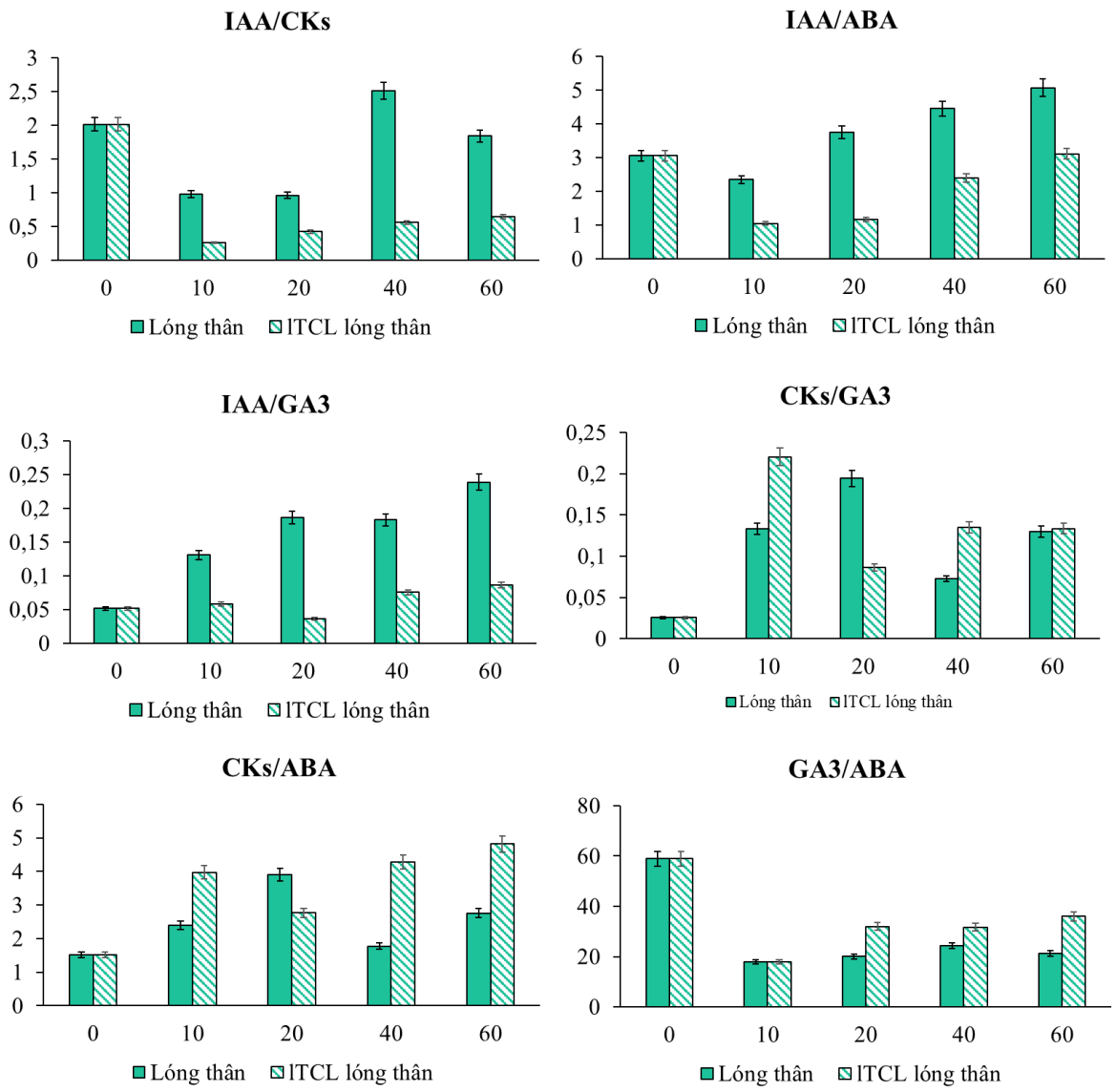
Đối với quá trình phát sinh mô sẹo và rễ bất định ở mẫu cấy của cây diệp hạ châu, tỷ lệ giữa các hormone nội sinh (IAA/CKs, IAA/GA_3, IAA/ABA, CKs/GA_3, CKs/ABA, GA_3/ABA) có sự phân hóa rõ ràng trong từng quá trình phát sinh hình thái và từng loại mẫu cấy (Hình 3.26 và 3.27). Hầu hết, sự biến động của hormone nội sinh trong mẫu có nguồn gốc từ lTCL lóng thân cao hơn đáng kể so với mẫu lóng thân cây diệp hạ châu (Hình 3.24 và 3.25). Trong quá trình hình thành mô sẹo, tỷ lệ hormone nội sinh, chẳng hạn như CKs/GA_3 và CKs/ABA, đạt đỉnh vào ngày thứ 10 đối với mẫu lTCL lóng thân và ngày thứ 20 đối với mẫu lóng thân (Hình 3.26). Đối với sự hình thành rễ bất định, IAA/CKs đều đạt mức cao nhất vào ngày thứ 10 nuôi cấy đối với lTCL lóng thân và ngày thứ 20 đối với mẫu lóng thân; IAA/ABA, IAA/GA_3 đạt mức cao nhất vào ngày thứ 10 đối với cả hai loại mẫu cấy (Hình 3.26).



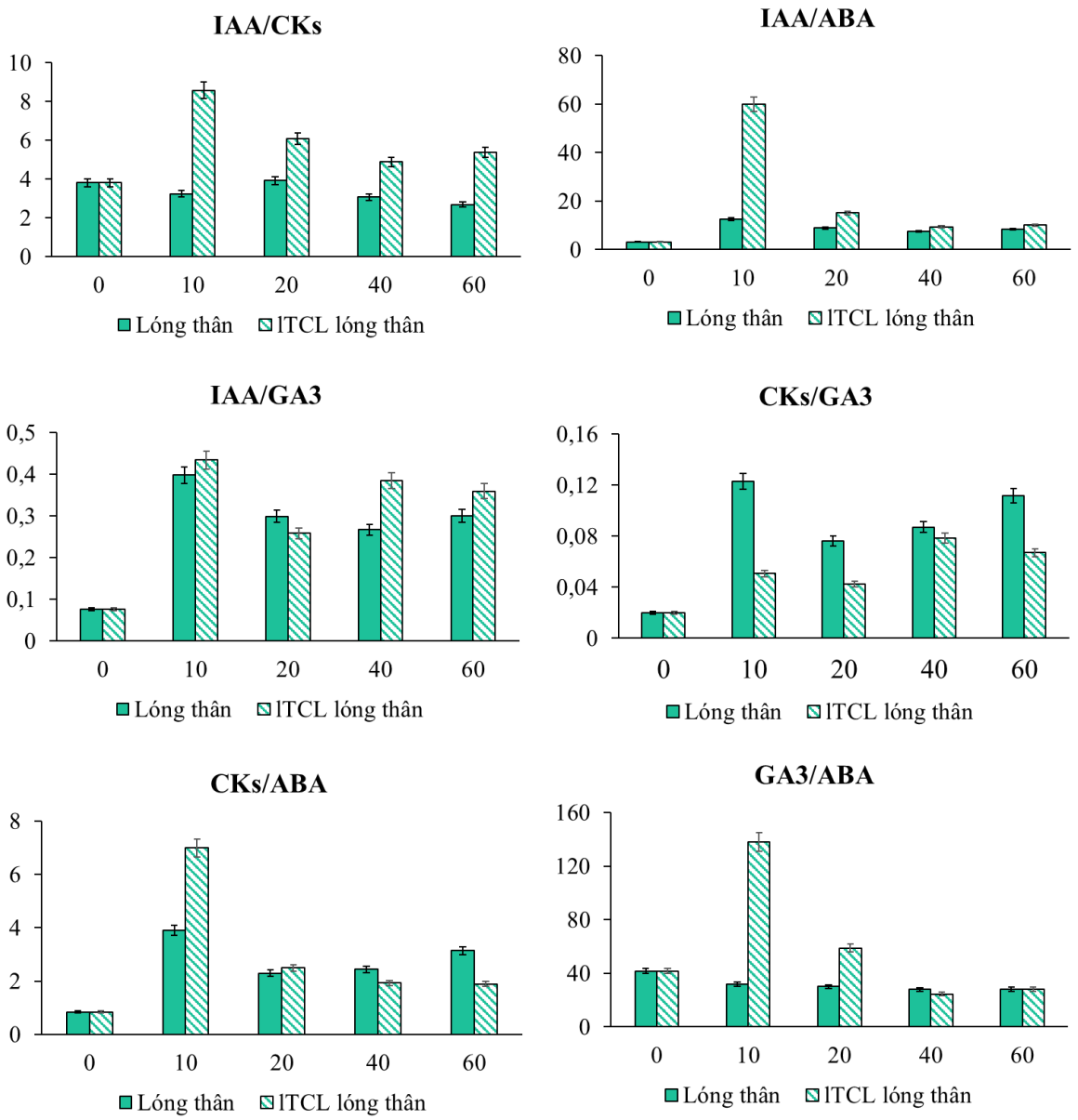
Hình 3.25. Sự biến động của hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình hình thành rễ bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu.

Tỷ lệ GA_3/ABA trong mô sẹo ở cả mẫu cấy lóng thân và mẫu ITCL ghi nhận sự sụt giảm rõ rệt trong giai đoạn đầu, sau đó duy trì ở mức thấp và chỉ tăng nhẹ ở giai đoạn sau (Hình 3.26). Tỷ lệ GA_3/ABA trong rễ bất định từ lóng thân có xu hướng duy

trì ổn định và không biến động lớn trong suốt quá trình theo dõi. Trái lại, ở rễ bất định từ mẫu ITCL lóng thân, tỷ lệ GA_3/ABA tăng đột biến tại ngày thứ 10, sau đó giảm dần theo thời gian. Sự khác biệt này cho thấy xử lý ITCL có thể ảnh hưởng đến quá trình điều hòa cân bằng GA_3 và ABA trong giai đoạn khởi phát hình thành rễ bất định (Hình 3.27).



Hình 3.26. Tỷ lệ của các hormone nội sinh trong mẫu mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu.



Hình 3.27. Tỷ lệ của hormone nội sinh trong mẫu rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu.

Nghiên cứu này đã chỉ ra mối tương quan rõ ràng giữa các hormone nội sinh trong quá trình hình thành mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu (Hình 3.28 và 3.29). Trong quá trình hình thành mô sẹo, CKs có mối tương quan nghịch với IAA, GA_3 và ABA, đồng thời có mối tương quan thuận với SA và MEL trong mẫu lóng thân cây diệp hạ châu. Ngược lại, dù cùng là một chương trình phát sinh mô sẹo, CKs lại có mối tương quan thuận với ABA và tương quan nghịch yếu với MEL trong mẫu lTCL lóng thân. Đặc biệt, IAA có mối tương quan nghịch với hầu hết các hormone được phân tích, ngoại trừ GA_3 trong mẫu nuôi cấy lóng thân.

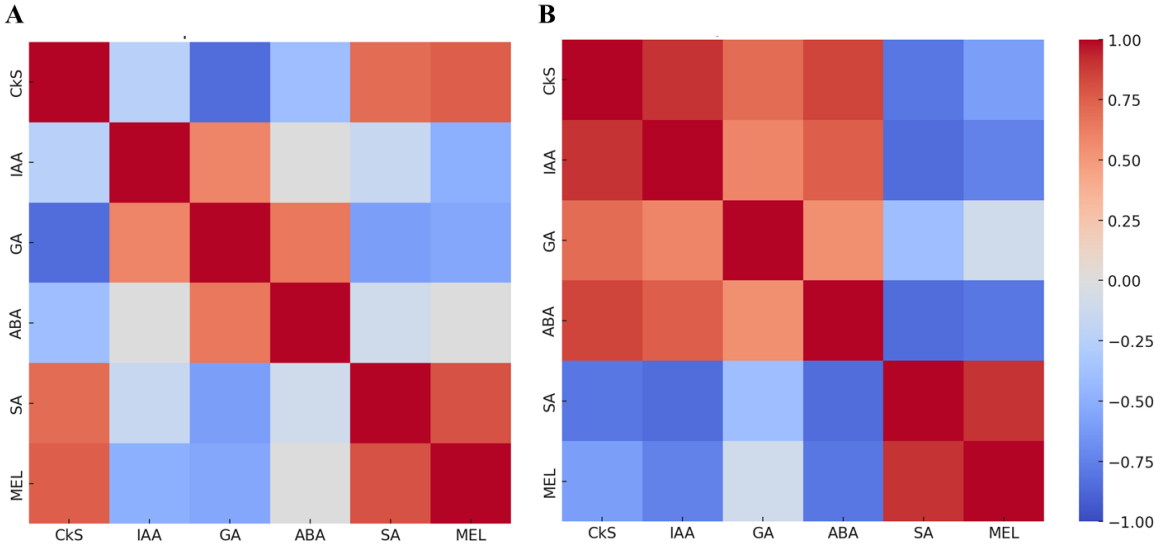
Ngoài ra, sự khác biệt trong mối tương quan giữa các hormone nội sinh trong các mẫu nuôi cấy khác nhau cũng được thể hiện qua sự tương quan của GA_3, ABA và SA với các hormone khác (Hình 3.28). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong quá trình hình thành rễ bất định (Hình 3.29). Đối với mẫu cấy lóng thân, CKs có mối tương quan nghịch với IAA và SA, nhưng lại có mối tương quan thuận với GA_3, ABA và MEL. Trong khi đó, đối với mẫu lTCL lóng thân, CKs có mối tương quan thuận với IAA và mối tương quan nghịch với MEL. Mặc dù CKs có mối tương quan nghịch với IAA, nhưng mối tương quan thuận với MEL lại mạnh mẽ hơn, khẳng định sự hình thành rễ bất định vẫn xảy ra trong trường hợp này.

Điều thú vị là sự tương quan giữa các hormone nội sinh trong quá trình hình thành rễ bất định ở mẫu lóng thân và lTCL lóng thân không có sự khác biệt đáng kể. Cả SA và MEL đều có mối tương quan nghịch với hầu hết các hormone nội sinh khác (trừ CKs trong mẫu lóng thân và SA trong mẫu lTCL lóng thân). Mối tương quan giữa GA_3 và ABA với các hormone khác cũng không có sự khác biệt lớn giữa hai loại mẫu cấy (Hình 3.28).

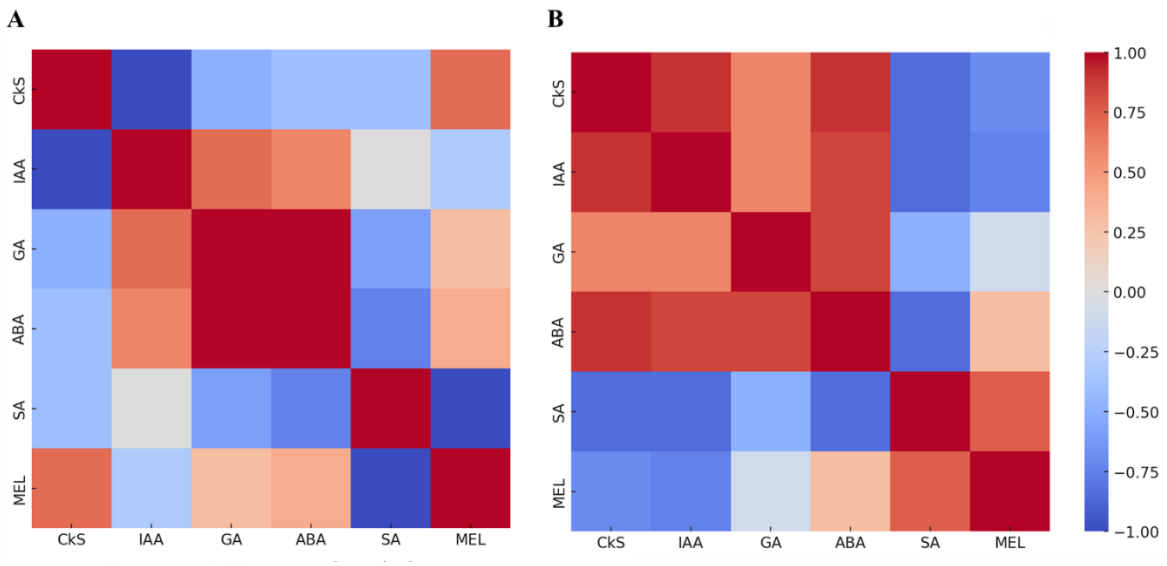
Phân tích hệ số tương quan cho thấy ở mẫu lóng thân, IAA và các tỷ lệ IAA/ABA, IAA/GA_3 thể hiện mối tương quan thuận mạnh với khối lượng tươi (Hình 3S), trong khi CKs như KIN, 2iP và ZEA cũng góp phần tích cực nhưng ở mức trung bình (Hình 3S). Ngược lại, các hormone như SA, MEL và GA có tác động ức chế rõ rệt đến khả năng sinh trưởng của mô sẹo ở mẫu lóng thân (Hình 3S). Trong khi đó, mẫu lTCL lóng thân phản ứng nổi bật với CKs, đặc biệt KIN, ZEA và sự phối hợp CKs/ABA, đồng thời cũng được cải thiện khi có tỷ lệ IAA/GA_3 (Hình S3). Tuy nhiên, IAA đơn lẻ, SA, MEL, mT và GA_3 thể hiện tác động tiêu cực đối với sự tích lũy khối lượng tươi của mẫu mô sẹo (Hình 3S). Nhờ đáp ứng mạnh với CKs, mẫu lTCL lóng thân có thời gian cảm ứng mô sẹo ngắn hơn và khối lượng tươi cao hơn rõ rệt so với mẫu lóng thân. Nói cách khác, trong khi mẫu lóng thân phụ thuộc chủ yếu vào AUX kết hợp với CKs, thì mẫu lTCL lóng thân lại ưu thế nhờ CKs, đặc biệt khi phối hợp với ABA, tạo nên sự khác biệt đáng kể về hiệu quả cảm ứng mô sẹo.

Ở quá trình hình thành rễ bất định, mẫu lTCL lóng thân có ưu thế rõ rệt so với mẫu lóng thân của cây diệp hạ châu. Phân tích tương quan cho thấy sự hình thành rễ ở mẫu lóng thân gắn liền với vai trò điều hòa của AUX và sự phối hợp AUX/ABA, nhưng vẫn chịu ảnh hưởng ức chế từ một số hormone như SA và MEL (Hình S4).

Trong khi đó, mẫu lTCL lóng thân phản ứng mạnh mẽ với CKs (KIN, 2iP, ZEA) khi kết hợp với ABA hoặc GA_3, đồng thời sự phối hợp AUX/CKs và AUX/ABA có tác động thúc đẩy rõ rệt đến quá trình ra rễ và sự gia tăng sinh khối (Hình 4S). ET và SA có xu hướng ức chế, đặc biệt ở mẫu lóng thân, trong khi mẫu lTCL lóng thân ít bị ảnh hưởng tiêu cực hơn (Hình 4S). Như vậy, có thể thấy cơ chế hình thành rễ bất định ở mẫu lóng thân phụ thuộc nhiều hơn vào AUX đơn lẻ và sự cân bằng với ABA, còn ở mẫu lTCL lóng thân lại nhạy cảm và đáp ứng mạnh với CKs kết hợp ABA hoặc GA_3. Điều này lý giải tại sao mẫu lTCL lóng thân có thời gian cảm ứng ngắn hơn và khả năng tích lũy sinh khối tốt hơn, cho thấy ưu thế khi ứng dụng kỹ thuật TCL trong cải thiện khả năng hình thành rễ bất định của cây diệp hạ châu.



Hình 3.28. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lóng thân **(A)** và lTCL 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.



Hình 3.29. Mối tương quan của các hormone nội sinh trong rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân **(A)** và lTCL 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.

Trong điều kiện bình thường, các hormone nội sinh ở thực vật tồn tại ở trạng thái cân bằng. Tuy nhiên, trạng thái cân bằng này có thể bị phá vỡ bởi nhiều yếu tố bên trong hoặc bên ngoài, chẳng hạn như stress sinh học và phi sinh học. Những rối loạn này đóng vai trò là tín hiệu cho những thay đổi trong hormone nội sinh. Nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng hormone nội sinh thực vật hiếm khi hoạt động riêng lẻ. Thay vào đó, các quá trình phát triển của thực vật được điều chỉnh bởi một mạng lưới phức tạp gồm các con đường truyền tín hiệu hormone được kết nối với nhau. Các điểm hội tụ giữa các con đường này, được gọi là tương tác chéo, tạo ra một mạng lưới truyền tín hiệu toàn diện [188]. Mạng lưới này bao gồm tổng hợp hormone, truyền tín hiệu và tương tác chéo; từ đó tạo thành một hệ thống phức tạp. Hormone nội sinh thực vật tương tác bằng cách kích hoạt các chất truyền tin hoặc khởi tạo chuỗi phosphoryl hóa, do đó điều chỉnh biểu hiện gene. Quá trình này điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp hoặc hoạt động của các hormone thực vật khác nhau, đảm bảo phản ứng phối hợp với các kích thích khác nhau [189].

AUX và CKs là hai nhóm hormone phổ biến và có liên quan chặt chẽ đến quá trình phát sinh hình thái ở thực vật. AUX, đặc biệt là IAA, đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành mô sẹo và phát triển rễ bất định. Nồng độ IAA cao giúp duy trì trạng thái chưa phân hóa của mô sẹo, thể hiện qua sự sinh trưởng và phát triển

mạnh mẽ của mẫu cấy [190]. IAA rất cần thiết trong quá trình hình thành rễ bất định, đặc biệt là trong giai đoạn cảm ứng [191]. Ngược lại, CKs thúc đẩy quá trình hình thành mô sẹo và chồi do vết thương gây ra bằng cách thúc đẩy sự tăng sinh tế bào thông qua việc tăng biểu hiện gene *CYCD3* [192]. CKs cũng đóng vai trò trong quá trình hình thành rễ bất định, với sự gia tăng đáng kể được quan sát thấy trong giai đoạn cảm ứng và giai đoạn khởi đầu của quá trình phát sinh hình thái [193]. Tuy nhiên, CKs và AUX có mối quan hệ đối kháng, trong đó CKs thường ức chế sự hình thành rễ bất định ở nhiều loài khác nhau như cây *Arabidopsis*, cây lúa, cây cỏ linh lăng (*Medicago sativa*) và cây bạch dương [194, 195]. Tỷ lệ AUX/CKs cao thúc đẩy sự tái sinh rễ, trong khi tỷ lệ AUX/CKs thấp thúc đẩy hình thành chồi [25, 196].

Tương tác của GA với các hormone khác thay đổi tùy theo các yếu tố sinh học, loại mẫu cấy và giai đoạn phát triển [197]. Wen và cộng sự [198] đã ghi nhận có mối tương quan thuận với IAA, trans-Zeatin-riboside và GA trong ba giai đoạn của quá trình hình thành rễ của cây *Paeonia* × *lemoinei* ‘High Noon’. Ngược lại, ABA, liên quan đến khả năng chống chịu stress, cho thấy xu hướng ngược lại. ABA kiểm soát biểu hiện gene trong quá trình phát triển sinh dưỡng của cây [199].

SA mặc dù thường ức chế sự phát triển của cây, nhưng lại thúc đẩy sự hình thành mô sẹo và đóng vai trò quan trọng trong khả năng miễn dịch và khả năng chịu stress của cây [200]. Điều thú vị là MEL, một loại hormone khác liên quan đến quá trình hình thành rễ, giúp tăng cường sản xuất IAA, thúc đẩy quá trình phát sinh hình thái rễ [201]. Ứng dụng ngoại sinh của MEL đã được chứng minh là làm tăng hàm lượng IAA và hoạt động của rễ ở các loài như cây *Brassica juncea* và cây *Mimosa pudica* L. [202, 203]. MEL và AUX có tác dụng hiệp đồng trong việc kích thích sự phát triển của rễ bên bằng cách điều chỉnh vận chuyển AUX [204], trong khi MEL đối kháng với ABA, ảnh hưởng đến khả năng chịu đựng stress của cây [205].

Sự tương tác giữa các hormone nội sinh, chẳng hạn như tương tác giữa AUX và ABA thường điều chỉnh các quá trình thiết yếu trong quá trình stress phi sinh học [206]. ABA chủ yếu điều chỉnh con đường truyền tín hiệu AUX bằng cách điều chỉnh biểu hiện của các yếu tố đáp ứng AUX (ARF5, ARF6 và ARF10) thông qua ubiquitin hóa [120]. Tỷ lệ AUX/ABA rất quan trọng đối với sự biệt hóa nguyên thủy của rễ và sự kéo dài rễ [207]. Nồng độ ABA tăng trong điều kiện stress sẽ ức chế các gene mã hóa chất vận chuyển AUX [208], trong khi nồng độ ABA thấp hơn sẽ thúc đẩy quá

trình vận chuyển và truyền tín hiệu AUX. Nghiên cứu này đã xác nhận mối tương quan thuận giữa ABA và AUX trong điều kiện không có stress, mặc dù mối tương quan tiêu cực đã được quan sát thấy trong quá trình hình thành mô sẹo [208].

Hơn nữa, sự tương tác giữa các hormone nội sinh là phổ biến và đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự tăng trưởng và phát triển của thực vật. Các hormone này ảnh hưởng đến hoạt động của nhau bằng cách điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp, do đó làm thay đổi nồng độ của chúng thông qua việc điều chỉnh các chuỗi tín hiệu. Trong tương lai gần, việc hiểu các cơ chế tương tác hiệp đồng giữa các hormone nội sinh sẽ là chủ đề chính trong nghiên cứu thực vật. Kết quả của nghiên cứu này nhấn mạnh rằng sự tương tác giữa các hormone nội sinh phụ thuộc vào loài thực vật, loại mẫu cấy và giai đoạn phát sinh hình thái. Tuy nhiên, vẫn cần tiến hành thêm các nghiên cứu về sự tương tác giữa các hormone nội sinh để làm rõ vấn đề này.

Phân tích sự biến động và mối tương quan của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái *in vitro* ở ba đối tượng nghiên cứu cho thấy mỗi loài thực vật có mỗi cách điều hòa hormone nội sinh đặc trưng, trong đó vai trò của từng nhóm hormone được thể hiện khác nhau tùy theo con đường phát sinh hình thái.

Đối với cây chanh dây, quá trình tái sinh chồi bất định chịu sự chi phối chủ yếu của CKs và tỷ lệ IAA/CKs. Hàm lượng CKs tăng cao cùng với tỷ lệ IAA/CKs thấp ở giai đoạn cảm ứng và phát triển chồi là yếu tố quyết định hiệu quả tái sinh chồi. AUX đóng vai trò hỗ trợ trong việc tái lập trạng thái phân chia tế bào ban đầu nhưng không phải là hormone chi phối chính. Các hormone khác như GA_3, ABA và SA tham gia điều hòa ở mức độ thứ cấp, góp phần ổn định quá trình phát sinh chồi hơn là quyết định hướng phát sinh hình thái.

Ở cây hoa đồng tiền, kết quả cho thấy quá trình hình thành phôi soma là kết quả của sự tương tác phức hợp giữa AUX, CKs và GA_3. Trong đó, AUX giữ vai trò khởi phát và duy trì trạng thái cảm ứng phôi soma, CKs tham gia điều hòa quá trình phân chia và tổ chức lại tế bào, còn GA_3 đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn phát triển và hoàn thiện phôi soma. Sự cân bằng động giữa các hormone này, hơn là hàm lượng của từng hormone riêng lẻ, quyết định hiệu quả phát sinh phôi soma. Điều này phản ánh tính đặc thù của con đường phát sinh phôi soma so với tái sinh chồi bất định.

Đối với cây diệp hạ châu, sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định thể hiện rõ vai trò chủ đạo của auxin trong cảm ứng rễ, trong khi CKs và ABA tham gia điều chỉnh

hướng phát sinh hình thái giữa mô sẹo và rễ bất định. AUX là hormone quyết định đối với sự hình thành rễ bất định, còn ABA và các hormone liên quan đến stress đóng vai trò điều hòa trạng thái sinh lý của mô cấy, góp phần ổn định cấu trúc mô và hỗ trợ quá trình biệt hóa. Sự khác biệt về mối tương quan hormone giữa mô sẹo và rễ bất định cho thấy sự chuyển đổi con đường phát sinh hình thái gắn liền với sự tái cấu trúc mạng lưới hormone nội sinh.

So sánh giữa kỹ thuật TCL và phương pháp nuôi cấy truyền thống cho thấy lTCL mang lại hiệu quả vượt trội trong việc kiểm soát và làm rõ mối tương quan hormone nội sinh. Các mẫu TCL có cấu trúc mô học đơn giản hơn, hàm lượng hormone nội sinh thấp và phân bố đồng đều hơn, từ đó phản ánh rõ ràng hơn vai trò điều hòa của từng hormone và các tương tác hiệp đồng – đối kháng giữa chúng. Ngược lại, các mẫu cấy truyền thống với cấu trúc mô phức tạp thường che lấp hoặc làm nhiễu các tín hiệu hormone, dẫn đến hiệu quả phát sinh hình thái kém ổn định và khó phân tích cơ chế điều hòa.

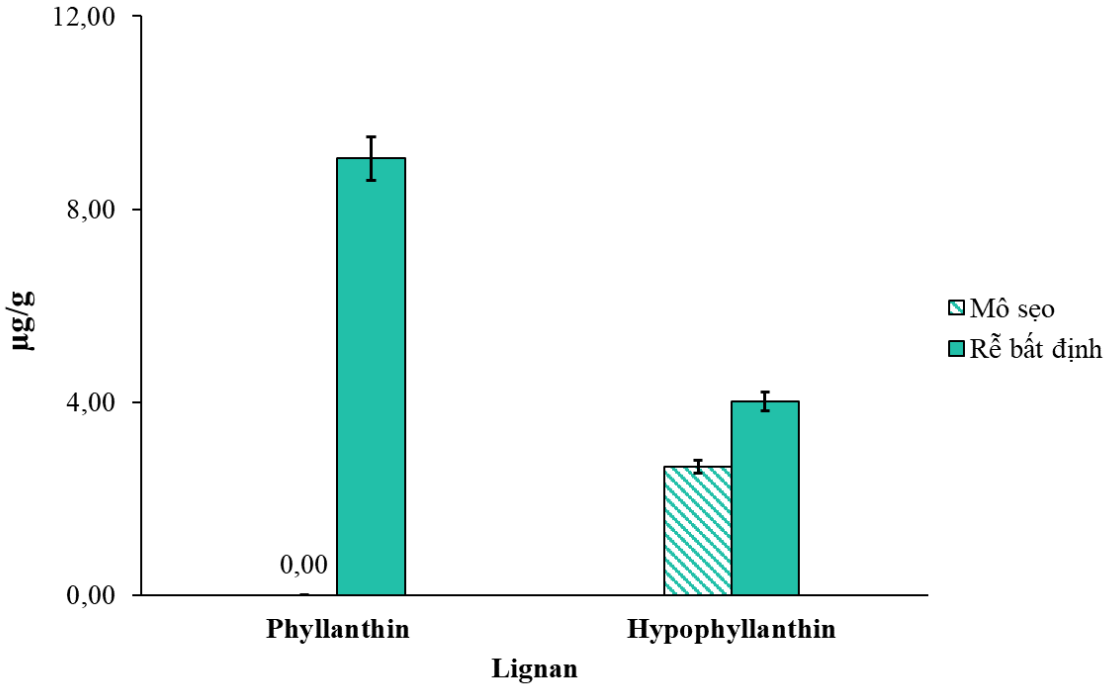
Như vậy, các kết quả nghiên cứu cho thấy không chỉ xác định được vai trò hormone chủ đạo tương ứng với từng đối tượng và từng con đường phát sinh hình thái, mà còn khẳng định ưu thế của kỹ thuật TCL so với nuôi cấy truyền thống trong nghiên cứu cơ chế điều hòa hormone nội sinh và nâng cao hiệu quả tái sinh *in vitro*.

3.2.4. Sự sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp của mẫu mô sẹo và rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lTCL 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 lTCL lóng thân được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.30).

Kết quả cho thấy mô sẹo tạo ra 2,67 µg/g hypophyllanthin, trong khi rễ bất định cho thấy lượng cao hơn đáng kể là 4,01 µg/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 phyllanthin, trong đó phyllanthin không thể phát hiện được trong mô sẹo. Trong khi đó, rễ bất định sinh tổng hợp 9,05 µg/g (Hình 3.30). Điều này cho thấy rằng rễ của cây diệp hạ

châu là nguồn chính của phyllanthin, nhấn mạnh khả năng tổng hợp sinh học cao hơn của chúng đối với lignan đặc biệt này.



Hình 3.30. Sự tích lũy phyllanthin và hypophyllanthin của mô sẹo và rễ bất định có nguồn gốc từ lTCL lóng thân cây diệp hạ châu sau 60 ngày nuôi cấy.

Nuôi cấy rễ bất định thường được sử dụng để sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp vì các cơ quan này là nguồn tiềm năng của nhiều phân tử hoạt tính sinh học khác nhau [209]. Nuôi cấy rễ bất định cung cấp một phương pháp đầy hứa hẹn để sản xuất các phân tử hoạt tính sinh học vì rễ cây có khả năng tự nhiên tổng hợp và tích lũy nhiều loại chất chuyển hóa thứ cấp và protein [210]. Các nuôi cấy này thường thể hiện các đặc điểm hóa thực vật tương tự như rễ được nuôi cấy trong cơ thể sống [209]. Ngoài ra, so với nuôi cấy mô sẹo và huyền phù tế bào, rễ bất định thường ổn định hơn và tích lũy nhiều chất chuyển hóa thứ cấp hơn trong các khoảng gian bào, dẫn đến quá trình chiết xuất đơn giản [211].

Nhìn chung, kết quả sự khác biệt đáng kể trong quá trình sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp này giữa mô sẹo và rễ bất định của cây diệp hạ châu. Trong khi mô sẹo tổng hợp hypophyllanthin, nhưng không sản xuất phyllanthin, trong khi nuôi cấy rễ bất định cho thấy khả năng sản xuất cả hai hợp chất cao hơn nhiều, đặc biệt là phyllanthin. Mẫu hình này có thể chỉ ra rằng các nuôi cấy có nguồn gốc từ rễ có con đường chuyển hóa phát triển hơn hoặc chuyên biệt hơn để tổng hợp lignan, khiến

chúng có giá trị hơn đối với việc chiết xuất các chất chuyển hóa thứ cấp cụ thể cho mục đích dược phẩm hoặc công nghiệp. Hơn nữa, sự vắng mặt của phyllanthin trong mô sẹo có thể gợi ý nhu cầu tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy để thúc đẩy sản xuất hợp chất này hoặc quá trình tổng hợp phyllanthin không được kích hoạt trong nuôi cấy mô sẹo từ cây diệp hạ châu trong các điều kiện đã thử nghiệm. Những phát hiện này có thể cung cấp thông tin cho nghiên cứu sâu hơn về việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy *in vitro* để tăng cường tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp mong muốn trong cây diệp hạ châu. Chính vì vậy, rễ bất định của cây diệp hạ châu sẽ được sử dùng làm nguồn mẫu cho các nghiên cứu tiếp theo.

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

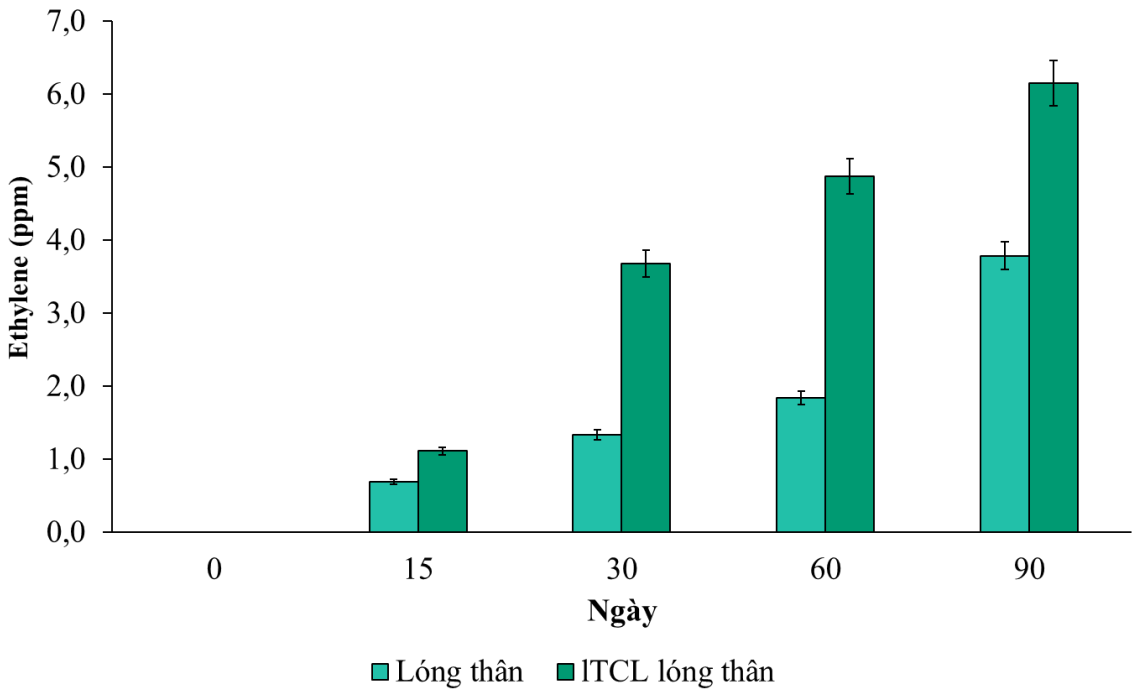
3.3.1. Ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên sự tích lũy khí ethylene trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu

Đối với cây chanh dây, kết quả cho thấy sự biến động của mức độ tích lũy ET trong quá trình phát sinh chồi bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân (Hình 3.31).

Với mẫu lóng thân, mức độ tích lũy khí ET tăng dần qua các ngày từ 0,00 ppm (ngày 0) lên 0,70 ppm (ngày 15), 1,34 ppm (ngày 30), 1,84 ppm (ngày 60) và đạt 3,79 ppm vào ngày 90 (Hình 3.31). Điều này cho thấy sự tích lũy ET trong mẫu này có xu hướng gia tăng ổn định theo thời gian, cho thấy quá trình phát sinh chồi bất định diễn ra một cách liên tục.

Trong khi đó, mẫu lTCL lóng thân bắt đầu từ mức 0,000 ppm (ngày 0) và tăng nhanh chóng trong các giai đoạn tiếp theo. Mức ET tại ngày nuôi cấy thứ 15 là 1,115 ppm, đến ngày thứ 30 đạt 3,69 ppm, ngày thứ 60 là 4,88 ppm và đạt đỉnh cao 6,15 ppm vào ngày thứ 90 (Hình 3.31). Điều này cho thấy mẫu lTCL lóng thân có sự tích lũy ET cao hơn so với mẫu lóng thân ở tất cả các thời điểm phân tích và tốc độ tăng trưởng ET của mẫu này cũng nhanh hơn, đặc biệt là từ ngày thứ 15 đến ngày thứ 30 của giai đoạn nuôi cấy.

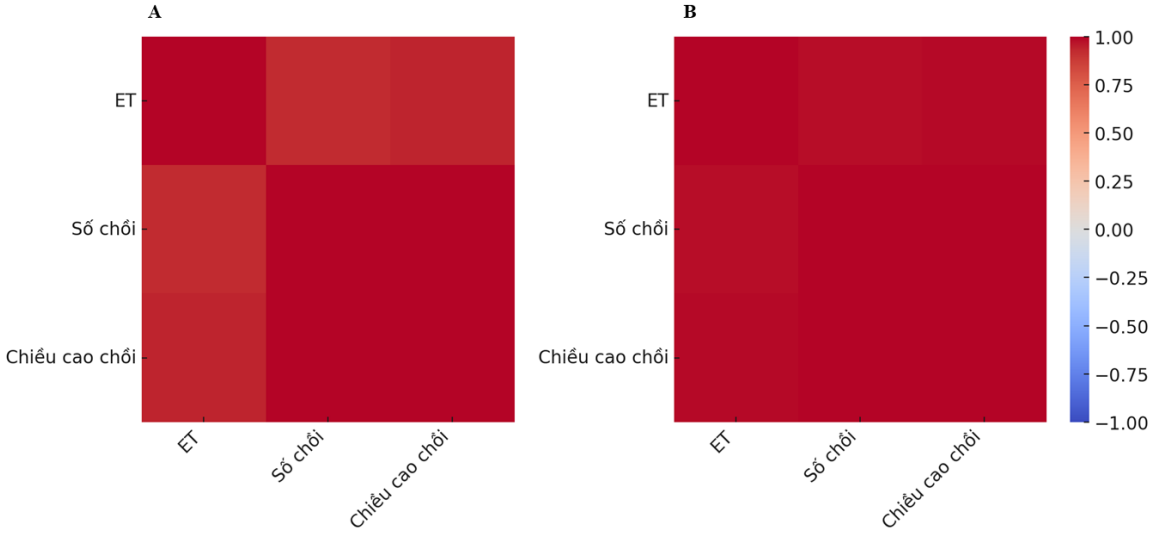
Từ kết quả này có thể nhận thấy rằng mẫu lTCL lóng thân có sự tích lũy ET mạnh mẽ và nhanh chóng hơn so với mẫu lóng thân, điều này có thể chỉ ra rằng mẫu lTCL lóng thân phản ứng mạnh mẽ hơn với tác động của ethylene, dẫn đến quá trình phát sinh chồi bất định diễn ra mạnh mẽ và nhanh chóng hơn.



Hình 3.31. Sự tích lũy khí ethylene trong quá trình cảm ứng chồi bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây.

Kết quả phân tích cho thấy ET có mối tương quan thuận rất mạnh mẽ với sự hình thành chồi bất định trong mẫu cấy lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây. Cụ thể, mối tương quan giữa ET và số chồi (Hình 3.32), cho thấy khi nồng độ ET tăng lên, số lượng chồi bất định được hình thành cũng tăng tương ứng. Điều này chỉ ra rằng ET đóng vai trò quan trọng trong việc kích thích quá trình phân chia tế bào và hình thành chồi mới. Bên cạnh đó, mối tương quan giữa ET và chiều cao chồi cũng rất mạnh mẽ (Hình 3.32), cho thấy ET không chỉ ảnh hưởng đến số lượng chồi mà còn tác động đến sự phát triển chiều cao của các chồi này. Hơn nữa, mối tương quan dương mạnh giữa số chồi và chiều cao chồi (Hình 3.32) chứng tỏ rằng sự phát triển về số lượng và kích thước của chồi có sự liên kết chặt chẽ. Những kết quả này khẳng định rằng khí ethylene không chỉ kích thích sự hình thành chồi bất định mà còn góp phần vào sự phát triển đồng đều về cả số lượng lẫn chất lượng của các chồi, từ đó nâng cao hiệu quả của quá trình nuôi cấy mô. Điều này mở ra hướng nghiên

cứu và ứng dụng việc điều chỉnh nồng độ ethylene để tối ưu hóa quá trình phát sinh chồi bất định trong mô cấy cây chanh dây.

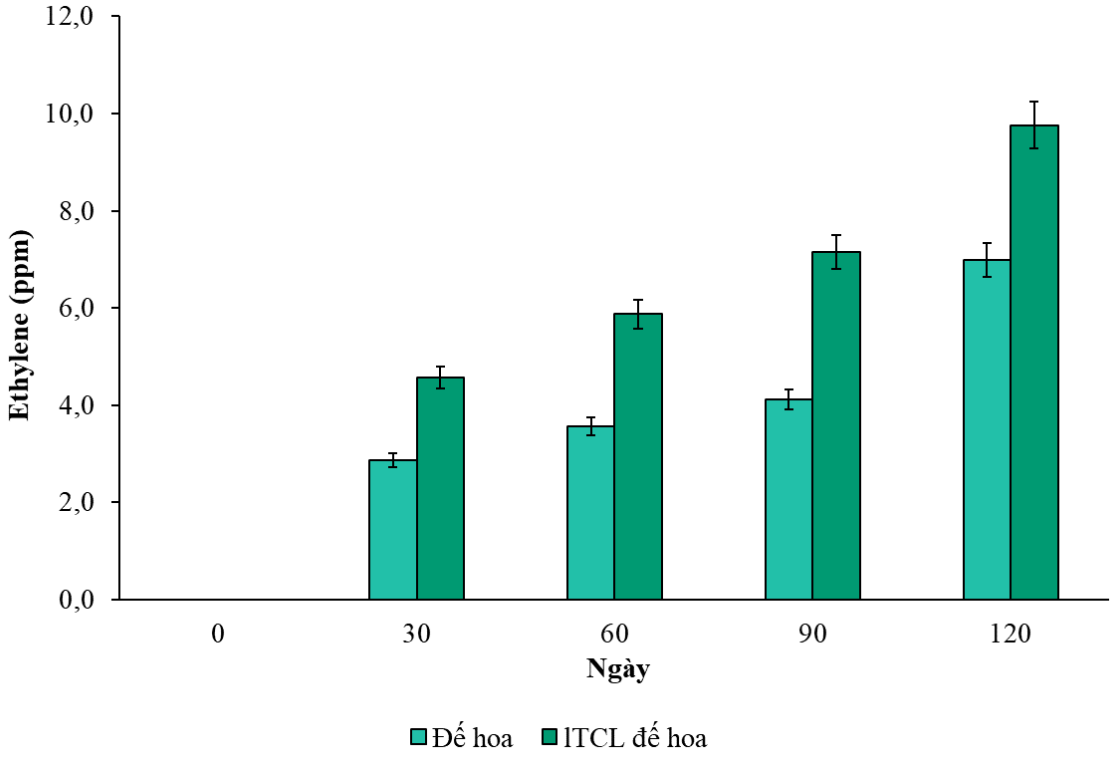


Hình 3.32. Mối tương quan giữa khí ethylene và sự hình thành chồi bất định của mẫu cấy **A.** lóng thân và **B.** lTCL lóng thân của cây chanh dây. Hệ số tương quan được tính toán dựa trên hệ số tương quan Pearson. Màu đỏ sẫm hơn biểu thị mối tương quan thuận cao hơn.

Sự tích lũy ET trong quá trình cảm ứng phôi soma của mẫu đế hoa và mẫu lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa hai mẫu mô này trong suốt 120 ngày nuôi cấy (Hình 3.33). Đối với mẫu đế hoa, ET không được ghi nhận ở ngày nuôi cấy 0 và bắt đầu được tích lũy từ ngày thứ 30 với nồng độ 2,87 ppm. Theo thời gian, nồng độ ET tiếp tục tăng dần, lần lượt đạt 3,56 ppm sau 60 ngày, 4,12 ppm sau 90 ngày và đạt mức cao nhất là 6,98 ppm vào ngày 120 nuôi cấy. Điều này cho thấy ET có vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh phôi soma với nồng độ tăng dần theo sự phát triển của mô phôi soma.

Trong khi đó, mẫu lTCL đế hoa thể hiện một xu hướng tích lũy ET mạnh mẽ hơn hẳn so với mẫu đế hoa thông thường. Mặc dù ET cũng không có mặt ở ngày đầu tiên (0,00 ppm), nhưng ngay từ ngày 30, mẫu lTCL đế hoa đã có nồng độ ET đạt 4,56 ppm, cao hơn hẳn so với mẫu đế hoa tại cùng thời điểm (2,87 ppm) (Hình 3.33). Sự tích lũy ET tiếp tục tăng mạnh trong các ngày tiếp theo, với 5,87 ppm sau 60 ngày, 7,15 ppm sau 90 ngày và đạt mức cao nhất là 9,76 ppm vào ngày 120. Đây là mức ET cao hơn đáng kể so với mẫu đế hoa tại tất cả các thời điểm, cho thấy mẫu lTCL

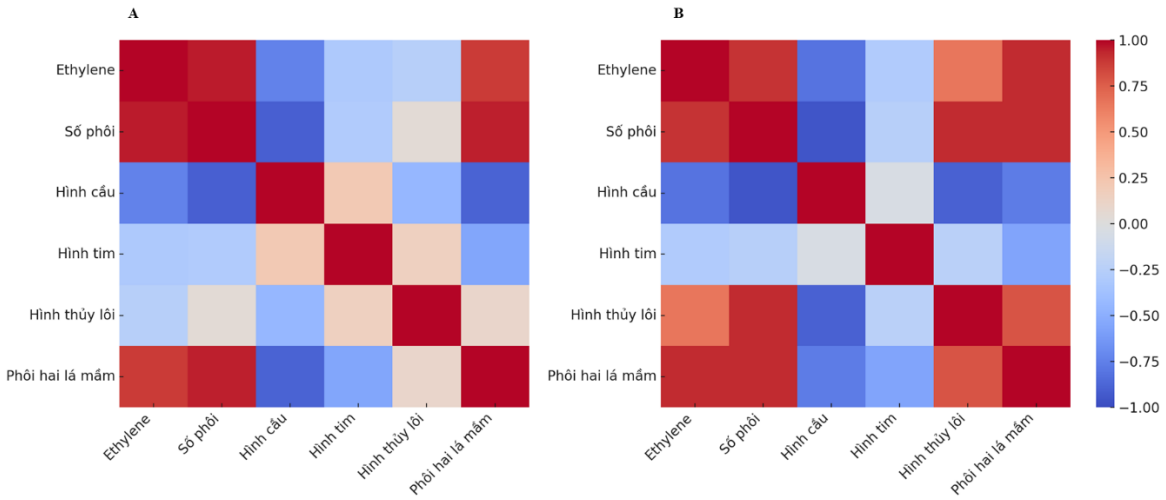
đế hoa có phản ứng mạnh mẽ hơn đối với điều kiện nuôi cấy, có thể liên quan đến quá trình phát sinh phôi soma hiệu quả hơn.



Hình 3.33. Sự tích lũy khí ethylene trong quá trình cảm ứng phôi soma của mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền.

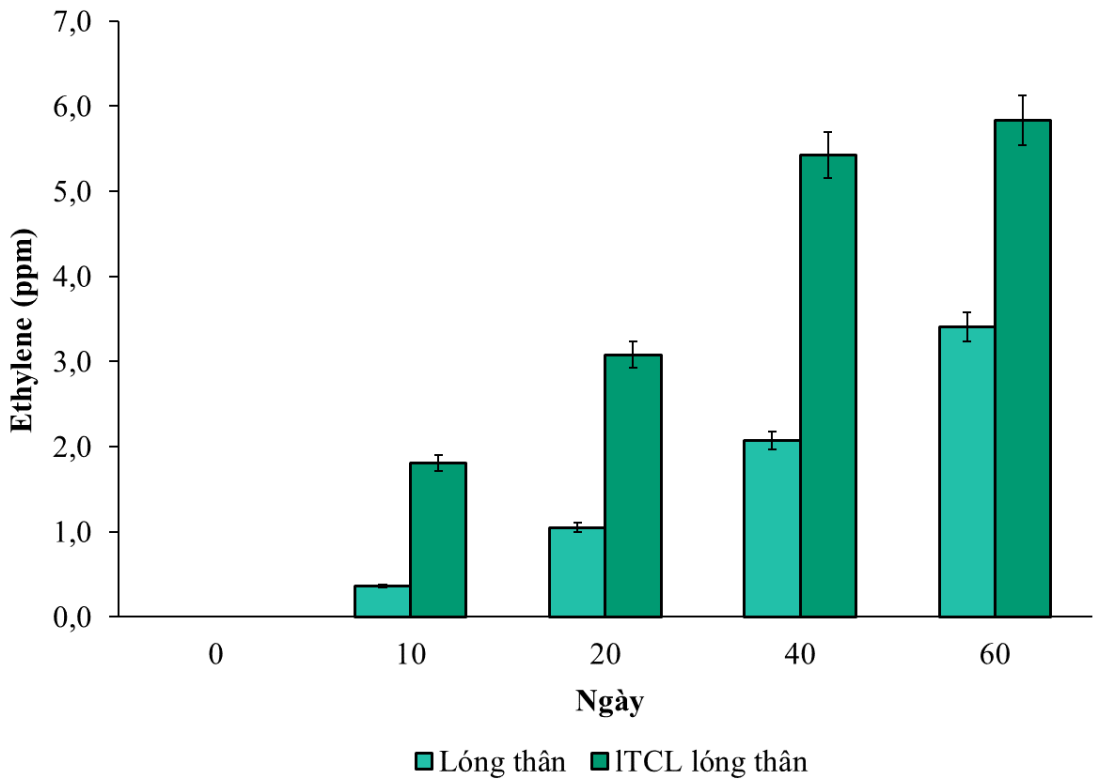
Kết quả phân tích cho thấy ET có vai trò quan trọng trong sự cảm ứng phôi soma của mẫu cấy đế hoa và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền. Mối tương quan giữa ET và số phôi soma là tương quan dương rất mạnh (Hình 3.34), cho thấy khi nồng độ ET tăng lên, số lượng phôi soma được hình thành cũng tăng theo. Điều này chỉ ra rằng ET đóng vai trò trong việc kích thích sự phân chia tế bào và sự phát sinh phôi soma trong các mẫu cấy mô này. Tuy nhiên, mối tương quan giữa ET và phôi soma hình cầu lại là mối tương quan nghịch (Hình 3.34), phản ánh rằng khi ET tăng, sự hình thành phôi soma hình cầu giảm, có thể do ET thúc đẩy sự phân hóa mô phôi soma theo các hướng khác, không phải chỉ hình cầu. Mối tương quan dương thấp giữa ET và phôi soma hình thủy lôi (Hình 3.34) cho thấy ET cũng hỗ trợ sự phát sinh các phôi phôi soma dạng thủy lôi, nhưng tác động của nó không mạnh mẽ như đối với số phôi soma. Đặc biệt, mối tương quan mạnh mẽ giữa ET và phôi soma hai lá mầm (Hình 3.34) chỉ ra rằng ET có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của phôi soma hai lá mầm, một dạng phôi soma hoàn chỉnh. Tổng thể, ET không chỉ thúc đẩy sự hình thành phôi

soma mà còn đóng vai trò quan trọng trong việc phân hóa phôi thành các cấu trúc phôi khác nhau, đặc biệt là phôi soma hai lá mầm. Những kết quả này khẳng định ET là yếu tố cần thiết trong việc tối ưu hóa quá trình phát sinh phôi soma trong mô cấy cây hoa đồng tiền.



Hình 3.34. Mối tương quan giữa khí ethylene và sự cảm ứng phôi soma của mẫu cấy **A.** đế hoa và **B.** lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền. 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.

Đối với cây diệp hạ châu, sự tích tụ ET của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân đều tăng trong 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.35). Mẫu lTCL lóng thân biểu hiện mức tích lũy ET cao hơn đáng kể so với mẫu lóng thân thông thường tại tất cả các thời điểm ghi nhận kết quả. Nồng độ ET sau 10, 20, 40 và 60 ngày nuôi cấy của mẫu lóng thân lần lượt là 0,36 ppm, 1,05 ppm, 2,07 ppm và 3,41 ppm. Trong khi đó, hàm lượng ET trong mẫu lTCL lóng thân cao hơn gấp 2 lần với lần lượt là 1,81 ppm, 3,08 ppm, 5,43 ppm và 5,83 ppm (Hình 3.35).

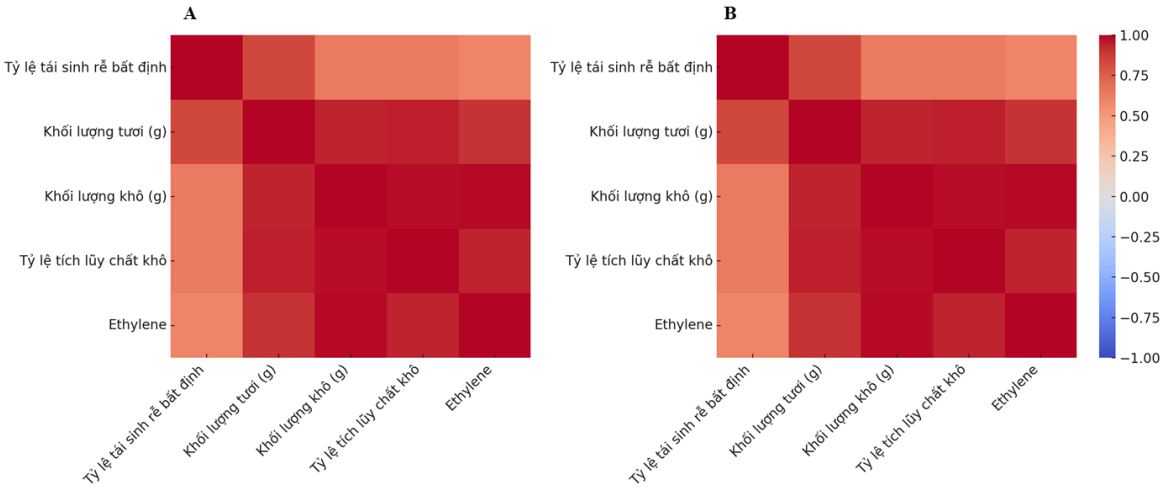


Hình 3.35. Sự tích lũy khí ethylene trong quá trình cảm ứng rễ bất định của mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu.

Kết quả cũng cho thấy hệ số tương quan giữa ET và tỷ lệ hình thành rễ bất định là 0,6125, cho thấy mối tương quan dương vừa phải giữa hai biến này (Hình 3.36). Khi nồng độ ET tăng lên thì tỷ lệ hình thành rễ bất định cũng tăng lên, mặc dù mối quan hệ này không quá mạnh. Giá trị tương quan trong phạm vi này cho thấy, trong khi ET có thể góp phần thúc đẩy sự hình thành rễ bất định, các yếu tố khác có thể đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh quá trình này. Hơn nữa, ET cho thấy mối tương quan dương mạnh hơn với khối lượng tươi và khối lượng khô của mẫu cấy, cho thấy ET có thể có tác động trực tiếp và mạnh mẽ hơn đến sự tích tụ sinh khối rễ bất định (Hình 3.36). Mối quan hệ chặt chẽ giữa ET và các chỉ số sinh khối thực vật có thể ảnh hưởng gián tiếp đến sự hình thành rễ bất định, vì khối lượng tươi và khối lượng khô tăng có thể tạo ra các điều kiện sinh lý thuận lợi hơn cho sự hình thành rễ bất định.

Tóm lại, trong khi ET dường như ảnh hưởng tích cực đến sự hình thành rễ bất định, thì cường độ vừa phải của mối quan hệ này cho thấy rằng nó có khả năng là một trong số nhiều yếu tố liên quan đến quá trình này. Các mối tương quan mạnh hơn được quan sát thấy giữa ET và các thông số liên quan đến sinh khối cho thấy rằng vai

trò của ET trong sự hình thành rễ bất định có thể liên quan đến tác động của nó đối với sự phát triển tổng thể của mẫu cấy và sự tích tích lũy khối lượng (Hình 3.36).



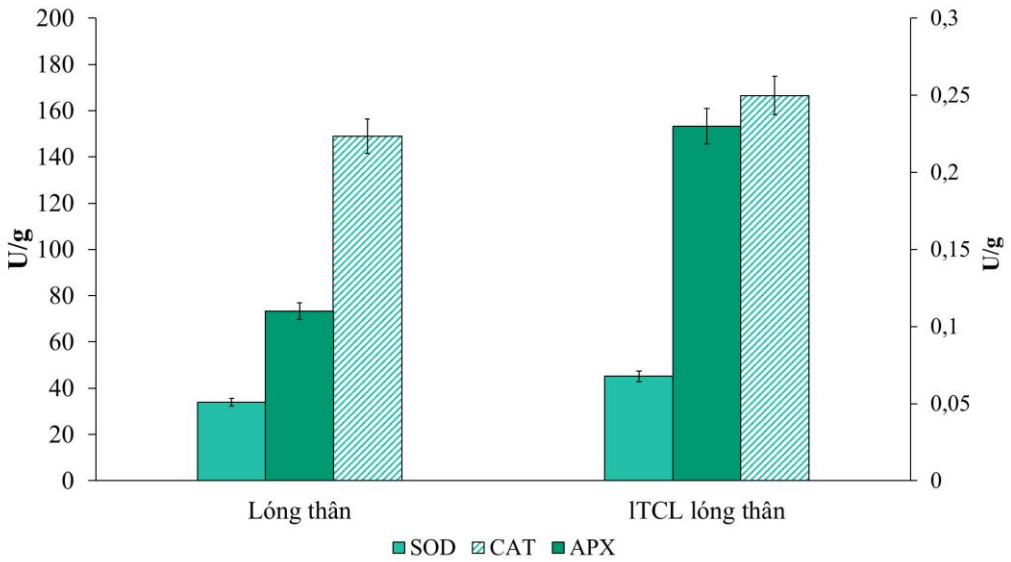
Hình 3.36. Mối tương quan giữa khí ethylene và sự hình thành rễ bất định của mẫu cấy **A.** lóng thân và **B.** lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu. Hệ số tương quan được tính toán dựa trên hệ số tương quan Pearson. Màu đỏ sẫm hơn biểu thị mối tương quan thuận cao hơn.

ET (một loại hormone thực vật dạng khí) là chất điều hòa chính của nhiều quá trình phát triển và phản ứng với stress ở thực vật [212]. Việc sản xuất ET thường tăng lên để đáp ứng với vết thương, ảnh hưởng đến sự hình thành rễ và tái sinh toàn bộ cơ thể của thực vật. Trong điều kiện tự nhiên, sự hình thành rễ bất định thường diễn ra sau sự gia tăng nhanh chóng của ET, chủ yếu là do sự tích lũy của hormone này trong rễ ngập nước, làm tăng độ nhạy cảm của mô với AUX nội sinh [213]. Tuy nhiên, trong điều kiện *in vitro*, việc giải phóng ET có liên quan đến các tổn thương cơ học như cắt mẫu cấy, do đó cung cấp các tín hiệu cần thiết để thu nhận cả AUX nội sinh và ngoại sinh để hình thành mô chưa có tổ chức (mô sẹo) hoặc rễ và chồi bất định [214]. Kết quả hiện tại cho thấy việc sản xuất ET của mẫu lTCL cao hơn mẫu cấy truyền thống ở cả 3 đối tượng nghiên cứu. Phản ứng tăng cao của ET có thể là do diện tích bề mặt và hoạt động tế bào tăng lên ở mẫu lTCL, tạo điều kiện cho quá trình tổng hợp ET.

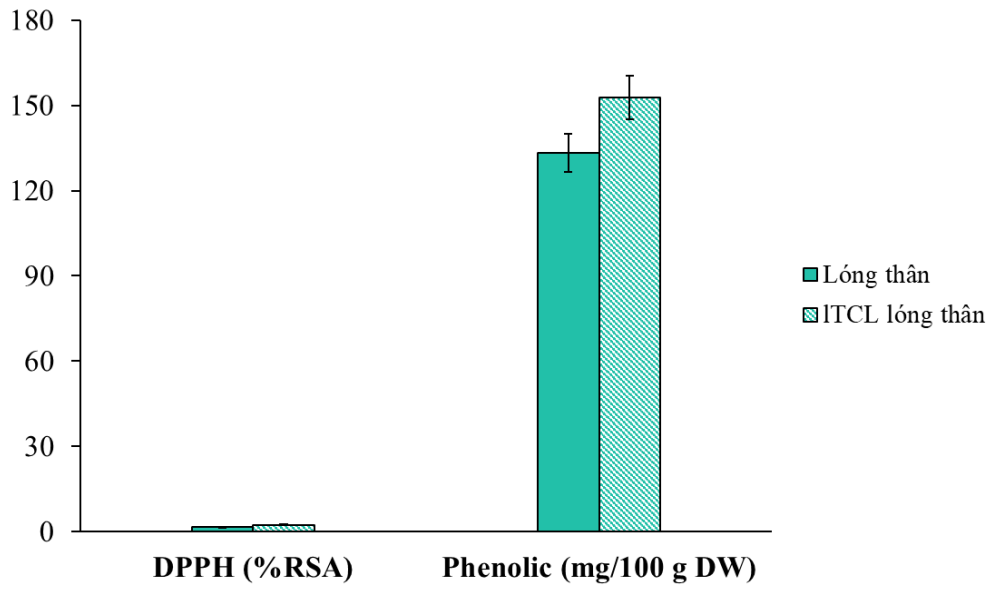
3.3.2. Ảnh hưởng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong quá trình phát sinh chồi cây chanh dây, phôi soma cây hoa đồng tiền và rễ bất định cây diệp hạ châu

Đối với cây chanh dây, kết quả hoạt độ của các enzyme và hợp chất chống oxy hóa trong hai mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây sau 90 ngày nuôi cấy được ghi nhận trong Hình 3.37 và 3.38. Mẫu lTCL lóng thân thể hiện hoạt động chống oxy hóa mạnh mẽ hơn ở tất cả các chỉ tiêu so với mẫu lóng thân. Cụ thể, hoạt độ SOD trong mẫu lóng thân là 33,87 U/g, thấp hơn so với mẫu lTCL lóng thân (45,12 U/g), cho thấy khả năng quét gốc tự do superoxide của mẫu lTCL lóng thân tốt hơn. Về CAT, mẫu lóng thân có giá trị là 148,85 U/g, trong khi mẫu lTCL lóng thân có giá trị cao hơn là 166,53 U/g, chỉ ra rằng mẫu lTCL lóng thân phân hủy H_2O_2 hiệu quả hơn.

Đối với APX, mẫu lóng thân có giá trị 0,11, thấp hơn so với mẫu lTCL lóng thân (0,23 U/g), cho thấy hoạt động của enzyme APX trong mẫu lTCL lóng thân mạnh mẽ hơn, giúp bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa. Về khả năng quét gốc tự do DPPH, mẫu lóng thân có giá trị 1,52 %RSA, trong khi mẫu lTCL lóng thân cao hơn với giá trị 2,41 %RSA, cho thấy mẫu lTCL lóng thân có khả năng trung hòa gốc tự do mạnh mẽ hơn. Cuối cùng, hàm lượng phenolic trong mẫu lóng thân là 133,18 mg/100 g DW, thấp hơn so với mẫu lTCL lóng thân (152,67 mg/100 g DW), cho thấy mẫu lTCL lóng thân có chứa nhiều hợp chất phenolic hơn, góp phần vào khả năng chống oxy hóa vượt trội của mẫu này.



Hình 3.37. Hoạt độ của SOD, CAT và APX trong mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây chanh dây sau 90 ngày nuôi cấy.



Hình 3.38. Hàm lượng DPPH và phenolic trong mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây chanh dây sau 90 ngày nuôi cấy.

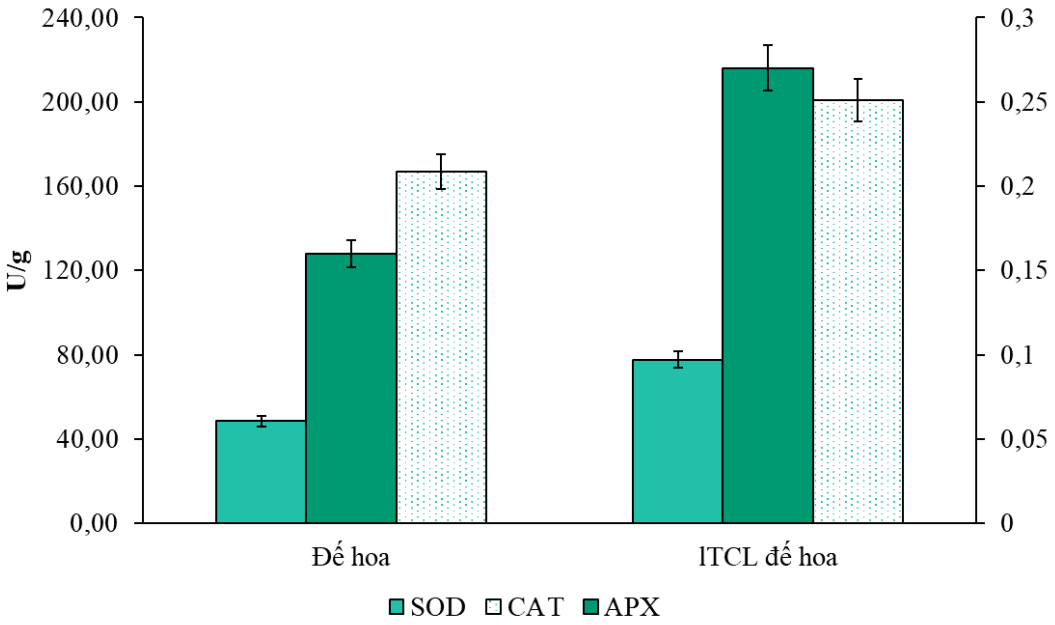
Kết quả hoạt độ của các enzyme và hợp chất chống oxy hóa trong hai mẫu đế hoa và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền sau 120 ngày nuôi cấy được ghi nhận ở Hình 3.39 và 3.40. Cụ thể, mẫu lTCL đế hoa có hoạt độ cao hơn ở tất cả các chỉ tiêu so với mẫu đế hoa.

Cụ thể, hoạt độ SOD trong mẫu đế hoa là 48,51 U/g, thấp hơn so với mẫu lTCL đế hoa (77,62 U/g), cho thấy mẫu lTCL đế hoa có khả năng quét gốc tự do superoxide mạnh mẽ hơn. CAT trong mẫu đế hoa là 166,77 U/g, nhưng mẫu lTCL đế hoa lại có giá trị cao hơn là 200,91 U/g. APX trong mẫu đế hoa có giá trị 0,16 U/g, còn trong mẫu lTCL đế hoa là 0,27 U/g, cho thấy hoạt động của enzyme APX trong mẫu lTCL đế hoa cũng mạnh hơn, giúp bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa và sự tích lũy quá mức của ET.

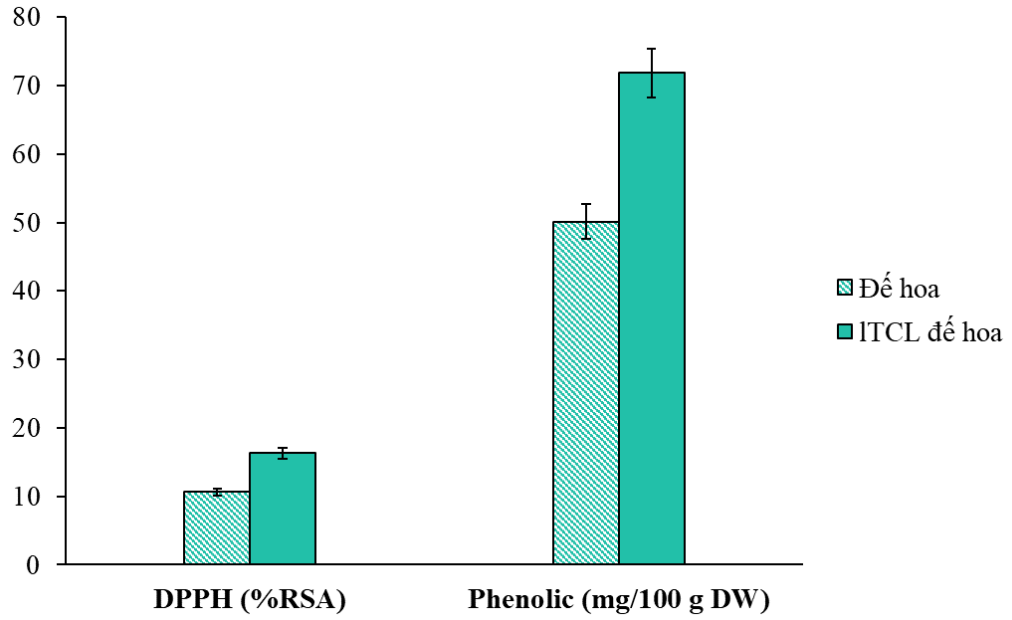
Về khả năng quét gốc tự do DPPH, mẫu đế hoa có giá trị 10,63 %RSA, trong khi mẫu lTCL đế hoa có giá trị cao hơn là 16,32 %RSA, cho thấy mẫu lTCL đế hoa có khả năng trung hòa gốc tự do mạnh mẽ hơn. Cuối cùng, hàm lượng phenolic trong mẫu đế hoa là 50,16 mg/100 g DW, thấp hơn so với mẫu lTCL đế hoa (71,87 mg/100 g DW), cho thấy mẫu lTCL đế hoa có nhiều hợp chất phenolic hơn, góp phần vào khả năng chống oxy hóa của mẫu này.

Tóm lại, các kết quả này cho thấy mẫu lTCL đế hoa có hoạt động chống oxy hóa mạnh mẽ hơn, với các chỉ tiêu SOD, CAT, APX, DPPH và hàm lượng phenolic

đều cao hơn so với mẫu đế hoa cho thấy mẫu này có khả năng bảo vệ tốt hơn trước các tác nhân gây stress oxy hóa.



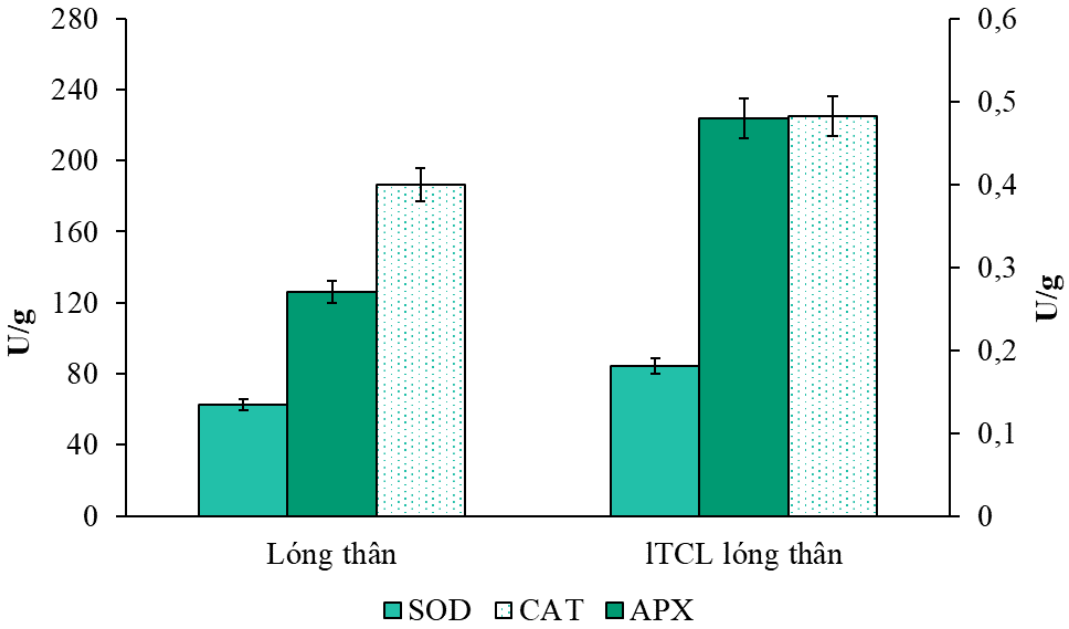
Hình 3.39. Hoạt độ của SOD, CAT và APX trong mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền sau 120 ngày nuôi cấy.



Hình 3.40. Hàm lượng DPPH và phenolic trong mẫu đế hoa và lTCL đế hoa cây hoa đồng tiền sau 120 ngày nuôi cấy.

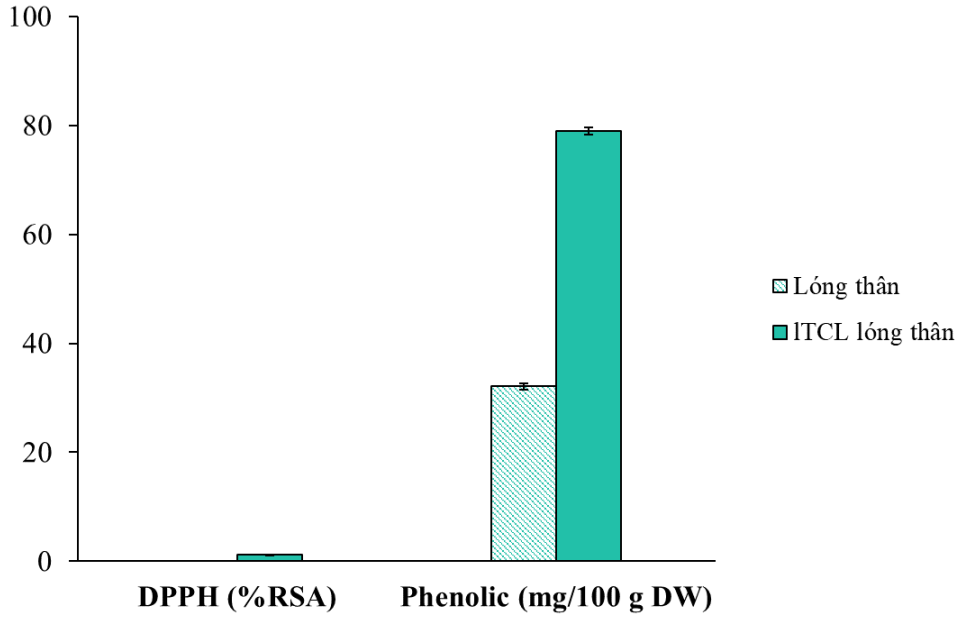
Đối với đối tượng cây diệp hạ châu, sau 60 ngày nuôi cấy, hoạt động của enzyme chống oxy hóa trong mẫu cấy lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu đã được ghi nhận (Hình 3.41). Kết quả cho thấy hoạt động của các enzyme chống oxy

hóa, bao gồm SOD, CAT và APX, trong mẫu cấy lTCL lóng thân cao hơn đáng kể so với mẫu cấy lóng thân (Hình 3.41). Hơn nữa, DPPH chỉ được quan sát thấy ở rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu cấy lTCL lóng thân (Hình 3.42).



Hình 3.41. Hoạt độ của SOD, CAT và APX trong mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu sau 60 ngày nuôi cấy.

Ngoài ra, mức độ hoạt động của các hợp chất chống oxy hóa (non-enzyme), như hợp chất phenolic, cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy các hoạt động chống oxy hóa của các non-enzyme này trong mẫu cấy lTCL lóng thân cũng cao hơn đáng kể so với các hoạt động trong mẫu cấy lóng thân (Hình 3.42). Điều này cho thấy cơ chế bảo vệ của các chất chống oxy hóa diễn ra mạnh mẽ hơn trong mẫu cấy lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu.



Hình 3.42. Hàm lượng DPPH và phenolic trong mẫu lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu sau 60 ngày nuôi cấy.

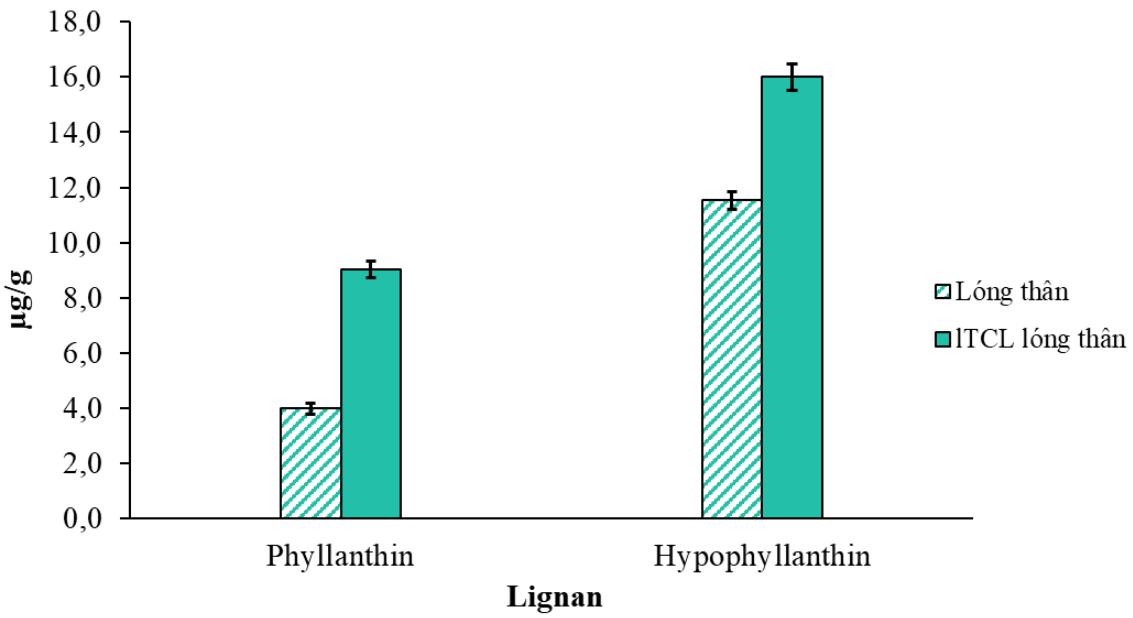
Khi thực vật tiếp xúc với các điều kiện bất lợi, chúng tạo ra ROS [215]. Stress oxy hóa thường phát sinh khi sự cân bằng sản xuất ROS bị phá vỡ, dẫn đến sự hình thành oxy đơn, tạo ra siêu oxit và H_2O_2. Để giảm thiểu tác hại của ROS, thực vật đã phát triển các cơ chế phòng vệ để loại bỏ ROS dư thừa. Các hệ thống phòng vệ này bao gồm cả các con đường enzyme và non-enzyme, cho phép thực vật kiểm soát stress oxy hóa [216]. Đồng thời, hệ thống chống oxy hóa, bao gồm các chất như SOD, CAT, APX, phenolic và DPPH, được kích hoạt để giảm thiểu thiệt hại oxy hóa do ROS tạo ra trong quá trình thực vật bị thương. Phòng vệ chống oxy hóa rất quan trọng để duy trì cân bằng tế bào và thúc đẩy sự phát triển của rễ. Các mẫu cấy TCL, với bề mặt vết thương lớn, có thể gây ra phản ứng stress do vết thương lớn hơn so với các mẫu cấy bình thường, điều này có thể thúc đẩy đáng kể các hệ thống chống oxy hóa trong mẫu cấy.

Thực vật thường gặp phải nhiều tác nhân gây stress sinh học và phi sinh học, kích hoạt các phản ứng phân tử và tế bào phức tạp. Các phản ứng stress này liên quan đến một mạng lưới các con đường truyền tín hiệu dẫn đến sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp đóng vai trò quan trọng trong quá trình phòng vệ và thích nghi của thực vật [217]. Thực vật đã phát triển các cơ chế để phát hiện stress, bao gồm các thụ thể xuyên màng nhận biết các phân tử liên quan đến mầm bệnh và các intracellular nucleotide-binding leucine-rich repeat proteins (protein có trong tế bào, đóng vai trò

quan trọng trong cơ chế nhận diện và phản ứng của tế bào với các tín hiệu từ môi trường bên ngoài), cả hai đều đóng vai trò quan trọng trong việc khởi tạo các phản ứng phòng vệ [218]. Các con đường truyền tín hiệu được kích hoạt khi thực vật phát hiện ra stress, dẫn đến những thay đổi về mặt sinh lý, chẳng hạn như điều hòa thẩm thấu, phòng vệ chống oxy hóa và ức chế sự phát triển của mầm bệnh. Các quá trình này thường liên quan đến việc điều hòa tăng các gene phản ứng với stress, dẫn đến sản xuất các phân tử, chẳng hạn như chất bảo vệ thẩm thấu, enzyme giải độc và chaperone, giúp bảo vệ tế bào khỏi bị tổn thương [219]. Các yếu tố chính của phản ứng stress bao gồm sản xuất ROS, hormone nội sinh, ET và kích hoạt các dòng ion và các yếu tố phiên mã điều chỉnh quá trình tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp [220].

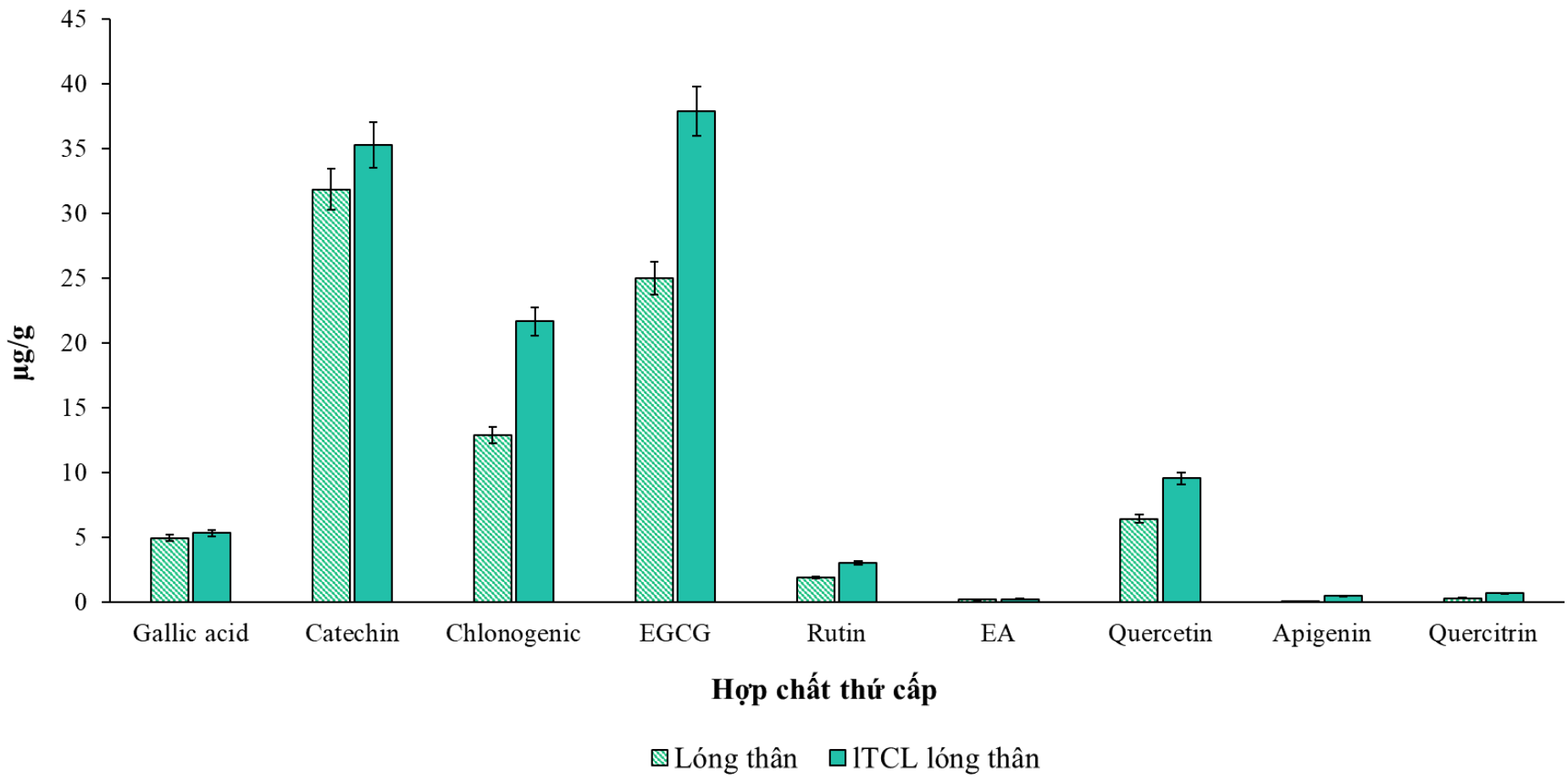
3.3.3. Sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp của rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu

Hàm lượng các hợp chất thứ cấp giữa hai loại mẫu cấy lóng thân và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu đã được ghi nhận (Hình 3.43 và 3.44). Mẫu cấy lTCL lóng thân cho thấy sự gia tăng đáng kể nồng độ các chất chuyển hóa thứ cấp so với mẫu cấy lóng thân. Cụ thể, hàm lượng của hai hợp chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng, phyllanthin và hypophyllanthin, trong rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lTCL lóng thân (lần lượt là 9,03 và 16,01 µg/g) cao hơn đáng kể so với mẫu cấy lóng thân (lần lượt là 3,99 đến 11,54 µg/g) sau 60 ngày nuôi cấy (Hình 3.43). Hơn nữa, các hợp chất như gallic acid, catechin, chlorogenic acid, EGCG, rutin, ellagic acid (EA), quercetin, apigenin và quercitrin đều có nồng độ tăng lên trong mẫu lTCL lóng thân. Cụ thể, trong mẫu lTCL lóng thân, hàm lượng catechin đạt 35,2389 µg/g, chlorogenic acid đạt 21,6570 µg/g và EGCG đạt 37,9013 µg/g, cao hơn so với mẫu lóng thân tương ứng (31,8367; 12,8887 và 24,9792 µg/g) (Hình 3.44). Đồng thời, các hợp chất phenolic khác như quercetin và rutin cũng tăng đáng kể ở mẫu lTCL lóng thân (Hình 3.44). Sự gia tăng hàm lượng các hợp chất thứ cấp này cho thấy kỹ thuật TCL không chỉ thúc đẩy phát sinh hình thái mà còn kích hoạt quá trình tái lập trình chuyển hóa thứ cấp, góp phần nâng cao giá trị dược liệu của cây diệp hạ châu trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.



Hình 3.43. Sự sinh tổng hợp phyllanthin và hypophyllanthin trong rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu sau 60 nuôi cấy.

Thực vật thường xuyên phải đối mặt với tổn thương cơ học nên sở hữu một hệ thống trao đổi chất phức tạp nhằm tổng hợp nhanh chóng các protein và chất chuyển hóa thứ cấp để ngăn chặn sự xâm nhập mầm bệnh vào vùng bị thương [221]. Một trong những phản ứng sớm nhất là tạo ra ROS, đóng vai trò quan trọng trong cơ chế phòng vệ của thực vật. Các con đường truyền tín hiệu ROS kích hoạt và ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp, bao gồm phenolic, alkaloids và terpenoid. Việc sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp do vết thương gây ra có thể được khai thác như một chiến lược thiết thực và hiệu quả để tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học ở mức cao [222, 223]. Ngoài ROS, các phân tử truyền tín hiệu khác, chẳng hạn như ET, đã được báo cáo là có tác dụng trung gian cho các phản ứng stress ở thực vật [223]. Tận dụng sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp do stress vết thương tạo ra là một phương pháp thực tế và hiệu quả để tạo ra một số lượng lớn các hợp chất có hoạt tính sinh học [223]. Ví dụ, cây cà rốt phản ứng với stress do vết thương, sản xuất và tích tụ các hợp chất phenolic (caffeoylquinic acid) [223]. Trong nghiên cứu này, sự gia tăng các chất chuyển hóa thứ cấp, đặc biệt là phyllanthin và hypophyllanthin, trong mẫu có nguồn gốc từ lTCL lóng thân so với mẫu lóng thân. Điều này có thể là do các đặc điểm của mẫu lTCL (mẫu mỏng, bề mặt vết thương lớn, v.v.) ảnh hưởng đáng kể đến quá trình tổng hợp ET và hệ thống chống oxy hóa, do đó làm tăng quá trình tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp này trong mẫu cấy.



Hình 3.44. Sự sinh tổng hợp của 9 hợp chất thứ cấp trong mẫu cấy lóng thân và lTCL lóng thân cây diệp hạ châu sau 60 ngày nuôi cấy.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nội dung 1: Nghiên cứu chọn nguồn mẫu cấy 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 đã xác định được nguồn mẫu cấy tối ưu cho quá trình phát sinh hình thái in vitro ở ba đối tượng nghiên cứu. Ở cây chanh dây, lóng thân thứ 3 cho khả năng tái sinh chồi bất định cao nhất. Ở cây hoa đồng tiền, giai đoạn nụ hoa là nguồn mẫu thích hợp nhất cho phát sinh phôi soma. Ở cây diệp hạ châu, lóng thân thứ 2 tối ưu cho hình thành mô sẹo, trong khi lóng thân thứ 3 thúc đẩy mạnh quá trình phát sinh rễ bất định. Kỹ thuật lTCL cho hiệu quả vượt trội so với phương pháp cấy truyền thống, thể hiện qua việc tăng tỷ lệ và chất lượng chồi, phôi soma, mô sẹo và rễ bất định ở cả ba loài TCL đã được chứng minh là hiệu quả vượt trội so với các kỹ thuật cấy truyền thống. Trong nghiên cứu này, các mẫu lTCL 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 phát sinh 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, GA_3, 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 GA_3 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 lTCL góp phần tối ưu hóa cân bằng hormone nội sinh, qua đó nâng cao hiệu quả phát sinh hình thái so với mẫu cấy 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 cấy 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, nghiên cứu này 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, 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.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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, Journal of forestry research, 30, pp.1535-9.

2. Nhut D., Murthy H., Teixeira da Silva J., 2003, Usefulness of thin cell layers in plant transformation, Propagation of ornamental plants, 2(2), pp.30-8.

3. da Silva J.A.T., Dobránszki J., 2015, Plant thin cell layers: update and perspectives, Folia horticulturae, 27(2), pp.183-90.

4. Van T.T., 1973, In vitro control of de novo flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissues, Nature, 246(5427), pp.44-5.

5. Nhut D.T., Hai N.T., Huyen P.X., Huong D.T.Q., Hang N.T.T., da Silva J.A.T., 2005, Thidiazuron induces high frequency shoot bud formation from Begonia petiole transverse thin cell layer culture, Propagation of ornamental plants, 5(3), pp.151-7.

6. Porcel R., Zamarreño Á.M., García-Mina J.M., Aroca R., 2014, Involvement of plant endogenous ABA in Bacillus megaterium PGPR activity in tomato plants, BMC plant biology, 14, pp.1-12.

7. Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M., Thorpe T.A., 1996, Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture, In vitro cellular & developmental biology – plant, 32, pp.272-89.

8. George E.F., Hall M.A., Klerk G.-J.D. Plant tissue culture procedure-background. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background: Springer; 2008. p. 1-28.

9. Pal A.K., Acharya K., Ahuja P.S., 2012, Endogenous auxin level is a critical determinant for in vitro adventitious shoot regeneration in potato (Solanum tuberosum L.), Journal of plant biochemistry and biotechnology, 21(2), pp.205-12.

10. Raspor M., Motyka V., Kaleri A.R., Ninković S., Tubić L., Cingel A., Ćosić T., 2021, Integrating the roles for cytokinin and auxin in de novo shoot organogenesis: from hormone uptake to signaling outputs, International journal of molecular sciences, 22(16), pp.8554.

11. Hnatuszko-Konka K., Gerszberg A., Weremczuk-Jeżyna I., Grzegorczyk-Karolak I., 2021, Cytokinin signaling and de novo shoot organogenesis, Genes, 12(2), pp.265.

12. Hu W., Fagundez S., Katin-Grazzini L., Li Y., Li W., Chen Y., Wang X., Deng Z., Xie S., McAvoy R., 2017, Endogenous auxin and its manipulation influence in vitro shoot organogenesis of citrus epicotyl explants, Horticulture research, 4.

13. Oğuz M.Ç., Karataş M.D., Oğuz E., Mujtaba M., Altintaş S., Ergül A., 2021, The Comparison of Regeneration from Root Node Explants in Solanaceae, Polish journal of environmental studies, 30(5).

14. Zeng Q., Han Z., Kang X., 2019, Adventitious shoot regeneration from leaf, petiole and root explants in triploid (Populus alba× P. glandulosa)× P. tomentosa, Plant cell, tissue organ culture, 138(1), pp.121-30.

15. Butenko R. Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove: ucheb. posobie. Biology of Higher Plant Cells in vitro and Biotechnologies Based on Them; 1999.

16. Batygina T.B., I͡Akovlev M.S., 1987, Khlebnoe zerno.

17. Belintsev B., Beloussov L., Zaraisky A., 1987, Model of pattern formation in epithelial morphogenesis, Journal of theoretical biology, 129(4), pp.369-94.

18. Marchenko A., 1996, Realization of the morphogenetic potential of plant organisms, Uspekhi sovremennoĭ biologii, 60, pp.654.

19. Zhuravlev Y.N., Omelko A., 2008, Plant morphogenesis in vitro, Russian journal of plant physiology, 55, pp.579-96.

20. Duclercq J., Sangwan-Norreel B., Catterou M., Sangwan R.S., 2011, De novo shoot organogenesis: from art to science, Trends in plant science, 16(11), pp.597-606.

21. Yang X., Zhang X., 2010, Regulation of somatic embryogenesis in higher plants, Critical reviews in plant science, 29(1), pp.36-57.

22. Haberlandt M. “Die” Haupt-Literaturen des Orients: Die Literaturen der Perser, Semiten und Türken: GJ Göschen; 1902.

23. Hannig E.E. Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen: A. Felix; 1904.

24. Helm J., 1908, Über die Beeinflussung der Sprossgewebe-Differenzierung durch Entfernen junger Blattanlagen. Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Planta, 16(4), pp.607-21.

25. Skoog F., 1957, Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro, Symposia of the society for experimental biology, 11, pp.118-31.

26. Che P., Lall S., Howell S.H., 2007, Developmental steps in acquiring competence for shoot development in Arabidopsis tissue culture, Planta, 226(5), pp.1183-94.

27. Oinam G., Yeung E., Kurepin L., Haslam T., Lopez-Villalobos A., 2011, Adventitious root formation in ornamental plants: I. General overview and recent successes, Propagation of ornamental plants, 11, pp.78-90.

28. Ikeuchi M., Ogawa Y., Iwase A., Sugimoto K., 2016, Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms, Development, 143(9), pp.1442-51.

29. Sugiyama M., 1999, Organogenesis in vitro, Current opinion in plant biology, 2(1), pp.61-4.

30. Gordon S.P., Heisler M.G., Reddy G.V., Ohno C., Das P., Meyerowitz E.M., 2007, Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem.

31. Praveen N., Manohar S., Naik P., Nayeem A., Jeong J., Murthy H., 2009, Production of andrographolide from adventitious root cultures of Andrographis paniculata, Current science, pp.694-7.

32. Khan N., Bano A., Zandi P., 2018, Effects of exogenously applied plant growth regulators in combination with PGPR on the physiology and root growth of chickpea (Cicer arietinum) and their role in drought tolerance, Journal of plant interactions, 13(1), pp.239-47.

33. Peng C., Gao F., Wang H., Shen H., Yang L., 2021, Optimization of maturation process for somatic embryo production and cryopreservation of embryogenic tissue in Pinus koraiensis, Plant cell, tissue and organ culture, 144(1), pp.185-94.

34. Nic-Can G.I., Galaz-Ávalos R.M., De-la-Peña C., Alcazar-Magaña A., Wrobel K., Loyola-Vargas V.M., 2015, Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus, Plos one, 10(6), pp.e0126414.

35. Fehér A., 2015, Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate, Biochim Biophys Acta Gene Regulatory Mechanisms, 1849(4), pp.385-402.

36. Gao F., Peng C., Wang H., Tretyakova I.N., Nosov A.M., Shen H., Yang L., 2020, Key techniques for somatic embryogenesis and plant regeneration of Pinus koraiensis, Forests, 11(9), pp.912.

37. Neely D., 1979, Tree wounds and wound closure, Arboriculture & urban forestry, 5(6), pp.135-40.

38. Nagata T., Takebe I., 1971, Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium, Planta, 99(1), pp.12-20.

39. Steward F., Mapes M.O., Mears K., 1958, Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells, American journal of botany, pp.705-8.

40. Frank M., Rupp H.-M., Prinsen E., Motyka V., Van Onckelen H., Schmülling T., 2000, Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of Arabidopsis with altered cytokinin and auxin content or signaling, Plant physiology, 122(3), pp.721-30.

41. Iwase A., Mitsuda N., Koyama T., Hiratsu K., Kojima M., Arai T., Inoue Y., Seki M., Sakakibara H., Sugimoto K., 2011, The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis, Current biology, 21(6), pp.508-14.

42. Butenko R., 1964, Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis, Moskva: Nauka.

43. Filipović B.K., Simonović A.D., Trifunović M.M., Dmitrović S.S., Savić J.M., Jevremović S.B., Subotić A.R., 2015, Plant regeneration in leaf culture of Centaurium erythraea Rafn. Part 1: The role of antioxidant enzymes, Plant cell, tissue and organ culture, 121, pp.703-19.

44. Lup S.D., Tian X., Xu J., Pérez-Pérez J.M., 2016, Wound signaling of regenerative cell reprogramming, Plant science, 250, pp.178-87.

45. Santarem E.R., Pelissier B., Finer J.J., 1997, Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos, In vitro cellular & developmental biology-plant, 33, pp.13-9.

46. Bhatia S., Dubey R., Maheshwari D., 2005, Enhancement of plant growth and suppression of collar rot of sunflower caused by Sclerotium rolfsii through fluorescent Pseudomonas, Indian phytopathology, 58(1), pp.17-24.

47. Roberts I., Lloyd C., Roberts K., 1985, Ethylene-induced microtubule reorientations: mediation by helical arrays, Planta, 164, pp.439-47.

48. Teixeira da Silva J.A., 2013, The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids, Plant cell, tissue and organ culture, 113, pp.149-61.

49. Teixeira da Silva J.A., Dobránszki J., 2015, Problems with traditional science publishing and finding a wider niche for post-publication peer review, Accountability in research, 22(1), pp.22-40.

50. Tung H.T., Hieu T., Phong T.H., Khai H.D., Hanh N.T.M., Van K.T.T., Nhut D.T. The application of thin cell layer culture technique in plant regeneration and micropropagation: latest achievements. Plant tissue culture: new techniques and application in horticultural species of tropical region: Springer; 2022. p. 231-57.

51. Rademacher W., 2015, Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production, Journal of plant growth regulation, 34(4), pp.845-72.

52. Bhatla S.C.L., Manju A., 2023, Plant physiology, development and metabolism, In: Plant growth regulators: an overview. pp.391-398.

53. Waadt R., 2020, Phytohormone signaling mechanisms and genetic methods for their modulation and detection, Current opinion in plant biology, 57, pp.31-40.

54. Srivastava L.M., 2002, Structure-activity relationship of cytokinins: Crystal structure and conformation of 6-furfurylaminopurine (kinetin), In: Plant growth and development: hormones and environment, pp. 191-202.

55. Méndez-Hernández H.A., Ledezma-Rodríguez M., Avilez-Montalvo R.N., Juárez-Gómez Y.L., Skeete A., Avilez-Montalvo J., De-la-Peña C., Loyola-Vargas V.M., 2019, Signaling overview of plant somatic embryogenesis, Frontiers in plant science, 10, pp.77.

56. Küpers J.J., Oskam L., Pierik R., 2020, Photoreceptors regulate plant developmental plasticity through auxin, Plants, 9(8), pp.940.

57. Ullah A., Manghwar H., Shaban M., Khan A.H., Akbar A., Ali U., Ali E., Fahad S., 2018, Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy, Environmental science pollution research, 25, pp.33103-18.

58. Pierre-Jerome E., Drapek C., Benfey P.N., 2018, Regulation of division and differentiation of plant stem cells, Annual review of cell and developmental biology, 34(1), pp.289-310.

59. Went F., Thimann K., 1937, Phytohormones, The Macmillan Company New York, Journal of the history of biology, 301p.

60. Tarakhovskaya E., Maslov Y.I., Shishova M., 2007, Phytohormones in algae, Russian journal of plant physiology, 54, pp.163-70.

61. Rademacher W., 1994, Gibberellin formation in microorganisms, Plant growth regulation, 15, pp.303-14.

62. Wani S.H., Kumar V., Shriram V., Sah S.K., 2016, Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants, The crop journal, 4(3), pp.162-76.

63. Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M., 2014, Quo vadis plant hormone analysis?, Planta, 240, pp.55-76.

64. Teale W.D., Paponov I.A., Palme K., 2006, Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development, Nature reviews molecular cell biology, 7(11), pp.847-59.

65. Mok M.C., 2019, Cytokinins and plant development - an overview, CRC press, 155-166.

66. Aremu A.O., Plačková L., Bairu M.W., Novák O., Szüčová L., Doležal K., Finnie J.F., Van Staden J., 2014, Endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured and acclimatized 'Williams' bananas subjected to different aromatic cytokinin treatments, Plant science, 214, pp.88-98.

67. Kamínek M., 1992, Progress in cytokinin research, Trends in biotechnology, 10, pp.159-64.

68. Soriano-Garcia M., Parthasarathy R., 1975, Structure-activity relationship of cytokinins: Crystal structure and conformation of 6-furfurylaminopurine (kinetin), Biochemical and biophysical research communications, 64(3), pp.1062-8.

69. Barciszewski J., Siboska G.E., Pedersen B.O., Clark B.F., Rattan S.I., 1996, Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts, FEBS letters, 393(2-3), pp.197-200.

70. Ge L., Yong J.W.H., Goh N.K., Chia L.S., Tan S.N., Ong E.S., 2005, Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (Cocos nucifera L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry,

high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, Journal of chromatography B, 829(1-2), pp.26-34.

71. Letham D.S., 1963, Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*, 8, pp. 569-573.

72. Lukaszewska A.J., Bianco J., Barthe P., Le Page-Degivry M.T., 1994, Endogenous cytokinins in rose petals and the effect of exogenously applied cytokinins on flower senescence, Plant growth regulation, 14(2), pp.119-26.

73. Manokari M., Badhepuri M.K., Cokulraj M., Sandhya D., Dey A., Kumar V., Faisal M., Alatar A.A., Singh R.K., Shekhawat M.S., 2022, Validation of meta-Topolin in organogenesis, improved morpho-physio-chemical responses, and clonal fidelity analysis in Dioscorea pentaphylla L.–an underutilized yam species, South african journal of botany, 145, pp.284-92.

74. Badhepuri M.K., Manokari M., Raj M.C., Jogam P., Dey A., Faisal M., Alatar A.A., Joshee N., Singisala N.R., Shekhawat M., 2023, Meta-Topolin enhanced direct shoot organogenesis and regeneration from leaf explants of Coleus forskohlii (Willd.) Briq, Industrial crops and products, 197, pp.116584.

75. Hedden P., Thomas S.G., 2012, Gibberellin biosynthesis and its regulation, The biochemical journal, 444(1), pp.11-25.

76. Camara M.C., Vandenberghe L.P., Rodrigues C., de Oliveira J., Faulds C., Bertrand E., Soccol C.R., 2018, Current advances in gibberellic acid (GA3) production, patented technologies and potential applications, Planta, 248(5), pp.1049-62.

77. Urbanova T., Leubner-Metzger G.J.A.P.R., Volume 49: Gibberellins, The. 2016, Gibberellins and seed germination, pp.253-84.

78. Colebrook E.H., Thomas S.G., Phillips A.L., Hedden P., 2014, The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress, Journal of experimental biology, 217(1), pp.67-75.

79. Li Y.-H., Wu Y.-J., Wu B., Zou M.-H., Zhang Z., Sun G.-M., 2011, Exogenous gibberellic acid increases the fruit weight of ‘Comte de Paris’ pineapple by enlarging flesh cells without negative effects on fruit quality, Acta physiologiae plantarum, 33(5), pp.1715-22.

80. Wang Y., Zhao J., Lu W., Deng D., 2017, Gibberellin in plant height control: old player, new story, Plant cell reports, 36(3), pp.391-8.

81. Muñoz-Fambuena N., Mesejo C., González-Mas M.C., Iglesias D.J., Primo-Millo E., Agustí M., 2012, Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange [Citrus sinensis (L.) Osbeck] by repressing CiFT gene expression, Journal of plant growth regulation, 31(4), pp.529-36.

82. Hedden P., Sponsel V., 2015, A century of gibberellin research, Journal of plant growth regulation, 34(4), pp.740-60.

83. Cornforth J., Milborrow B., Ryback G., Wareing P., 1965, Chemistry and physiology of ‘dormins’ in sycamore: identity of sycamore ‘dormin’with abscisin II, Nature, 205(4978), pp.1269-70.

84. Patterson S.E., 2001, Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis, Plant physiology, 126(2), pp.494-500.

85. Nambara E., Marion-Poll A., 2005, Abscisic acid biosynthesis and catabolism, Annual review of plant biology, 56(1), pp.165-85.

86. Kuwabara A., Ikegami K., Koshiba T., Nagata T., 2003, Effects of ethylene and abscisic acid upon heterophylly in Ludwigia arcuata (Onagraceae), Planta, 217(6), pp.880-7.

87. Sharp R.E., LeNoble M.E., 2002, ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress, Journal of experimental botany, 53(366), pp.33-7.

88. Gane R., 1934, Production of ethylene by some ripening fruits, Nature, 134(3400), pp.1008-.

89. Crocker W., Zimmerman P., Hitchcock A., 1932, Ethylene-induced epinasty of leaves and the relation of gravity to it, Boyce Thompson institute for plant research, 4(177-218), pp.328.

90. Lund S.T., Stall R.E., Klee H.J., 1998, Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato, The plant cell,, 10(3), pp.371-82.

91. Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.-C., Nam K.H., Li J., Chory J., 2004, BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis.

92. Choe S., 2004, Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!

93. Fujioka S., Sakurai A., 1997, Brassinosteroids, Natural product reports, 14(1), pp.1-10.

94. Wasternack C., Kombrink E., 2010, Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development, ACS chemical biology, 5(1), pp.63-77.

95. Creelman R.A., Tierney M.L., Mullet J.E., 1992, Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression, Proceedings of the National Academy of Sciences, 89(11), pp.4938-41.

96. Mueller M.J., Brodschelm W., Spannagl E., Zenk M.H., 1993, Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid, Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(16), pp.7490-4.

97. Parthier B., Bruckner C., Dathe W., Hause B., Herrmann G., Knöfel H.-M., Kramell H.-M., Kramell R., Lehmann J., Miersch O., editors. Jasmonates: metabolism, biological activities, and modes of action in senescence and stress responses. Progress in Plant Growth Regulation: Proceedings of the 14th International Conference on Plant Growth Substances, Amsterdam, 21–26 July, 1991; 1992: Springer.

98. Wasternack C., Hause B., 2013, Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany, Annals of botany, 111(6), pp.1021-58.

99. Singh V., Roy S., Giri M.K., Chaturvedi R., Chowdhury Z., Shah J., Nandi A.K., 2013, Arabidopsis thaliana FLOWERING LOCUS D is required for systemic acquired resistance, Molecular plant-microbe interactions, 26(9), pp.1079-88.

100. Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K., 2010, The strigolactone story, Annual review of phytopathology, 48(1), pp.93-117.

101. Arif Y., Zaidi S., Bajguz A., Hayat S., 2024, Strigolactones as plant hormone: An overview, Strigolactones, pp.1-13.

102. Umehara M., Cao M., Akiyama K., Akatsu T., Seto Y., Hanada A., Li W., Takeda-Kamiya N., Morimoto Y., Yamaguchi S., 2015, Structural requirements of strigolactones for shoot branching inhibition in rice and Arabidopsis, Plant and cell physiology, 56(6), pp.1059-72.

103. Arnao M.B., Hernández-Ruiz J., 2020, Is phytomelatonin a new plant hormone?, Agronomy, 10(1), pp.95.

104. Wei J., Li D.X., Zhang J.R., Shan C., Rengel Z., Song Z.B., Chen Q., 2018, Phytomelatonin receptor PMTR 1-mediated signaling regulates stomatal closure in Arabidopsis thaliana, Journal of pineal research, 65(2), pp.e12500.

105. Arnao M.B., Hernández-Ruiz J., 2019, Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: a model for the plant redox network, Melatonin research, 2(3), pp.152-68.

106. Abdulqader B.K., 2023, Effect of endogenous melatonin hormone on cardiovascular system: A review of literature, Annals of the college of medicine mosul, 45(1), pp.84.0-91.0.

107. Erland L.A., Behavior. 2024, Views and perspectives on the indoleamines serotonin and melatonin in plants: past, present and future, Plant Signaling and Behavior, 19(1), pp.2366545.

108. Ramlal A., Rajendran R.A., Raju D., Singh V.P. Introduction to Phytohormones. Phytohormones in Abiotic Stress: CRC Press; 2024. p. 3-14.

109. Öpik H., Rolfe S.A., Willis A.J., Street H.E., 2005, 4th The physiology of flowering plants, Cambridge University Press, 404p.

110. Davies P.J. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology: Springer Science & Business Media; 2013.

111. Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., Van Der Straeten D., Beemster G.T., Sandberg G., Bhalerao R., Ljung K., Bennett M.J., 2007, Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation, The plant cell, 19(7), pp.2186-96.

112. George E.F., Hall M.A., Klerk G.-J.D. Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background: Springer; 2008. p. 175-204.

113. Montalbán I.A., Novák O., Rolčik J., Strnad M., Moncaleán P., 2013, Endogenous cytokinin and auxin profiles during in vitro organogenesis from vegetative buds of Pinus radiata adult trees, Physiologia plantarum, 148(2), pp.214-31.

114. Valdés A.E., Ordás R.J., Fernández B., Centeno M.L., Biochemistry. 2001, Relationships between hormonal contents and the organogenic response in Pinus pinea cotyledons, Plant physiology, 39(5), pp.377-84.

115. Pérez-Jiménez M., Cantero-Navarro E., Pérez-Alfocea F., Le-Disquet I., Guivarc'h A., Cos-Terrer J., 2014, Relationship between endogenous hormonal content and somatic organogenesis in callus of peach (Prunus persica L. Batsch) cultivars and Prunus persica× Prunus dulcis rootstocks, Journal of plant physiology, 171(8), pp.619-24.

116. Charrière F., Sotta B., Miginiac É., Hahne G., 1999, Induction of adventitious shoots or somatic embryos on in vitro cultured zygotic embryos of Helianthus annuus: variation of endogenous hormone levels, Plant physiology and biochemistry, 37(10), pp.751-7.

117. Grossmann K., Kwiatkowski J., Siebecker H., Jung J., 1987, Regulation of plant morphology by growth retardants: effects on phytohormone levels in soybean seedlings determined by immunoassay, Plant physiology, 84(4), pp.1018-21.

118. Betti C., Della Rovere F., Ronzan M., Fattorini L., 2019, EIN2 and COI1 control the antagonism between ethylene and jasmonate in adventitious rooting of Arabidopsis thaliana thin cell layers, Plant cell, tissue and organ culture, 138(1), pp.41-51.

119. Chi Z.-H., Wang Y.-Q., Deng Q.-X., Zhang H., Pan C.-P., Yang Z.-W., 2020, Endogenous phytohormones and the expression of flowering genes synergistically induce flowering in loquat, Journal of integrative agriculture, 19(9), pp.2247-56.

120. Li X., Wu P., Lu Y., Guo S., Zhong Z., Shen R., Xie Q., 2020, Synergistic interaction of phytohormones in determining leaf angle in crops, International journal of molecular sciences, 21(14), pp.5052.

121. Kępczyńska E., Orłowska A., 2021, Profiles of endogenous ABA, bioactive GAs, IAA and their metabolites in Medicago truncatula Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues during induction phase in relation to somatic embryo formation, Planta, 253, pp.1-13.

122. Guo B., He W., Zhao Y., Wu Y., Fu Y., Guo J., Wei Y., 2017, Changes in endogenous hormones and H 2 O 2 burst during shoot organogenesis in TDZ-treated Saussurea involucrate explants, Plant cell, tissue and organ culture, 128, pp.1-8.

123. Yuan X.K., Yang Z.Q., 2018, The effect of endogenous hormones on plant morphology and fruit quality of tomato under difference between day and night temperature, Horticultural science, 45(3).

124. Jiang Y., Ding X., Wang J., Zou J., Nie W.-F., 2021, Decreased low-light regulates plant morphogenesis through the manipulation of hormone biosynthesis in Solanum lycopersicum, Environmental and experimental botany, 185, pp.104409.

125. Chen H., Lei Y., Sun J., Ma M., Deng P., Quan J.e., Bi H., 2023, Effects of different growth hormones on rooting and endogenous hormone content of two Morus alba L. cuttings, Horticulturae, 9(5), pp.552.

126. Jin M., Liu Y., Shi B., Yuan H., 2023, Exogenous IAA improves the seedling growth of Syringa villosa via regulating the endogenous hormones and enhancing the photosynthesis, Scientia horticulturae, 308, pp.111585.

127. Khai H.D., Vinh N.Q., Dung D.M., Dai Nghiep N., Mai N.T.N., Tung H.T., Luan V.Q., 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 Science, 312, pp.111045.

128. Anh T.T.L., Mai N.T.N., Tung H.T., Khai H.D., Luan V.Q., Phuong H.T.N., Van Binh N., Vinh B.V.T., Thuy N.T.T., Thao N.P., 2023, Effect of spermidine, glutamine, and proline on somatic embryogenesis and silver nanoparticles supplied culture improved rhizome formation of Panax vietnamensis var. langbianensis, South african journal of botany, 163, pp.226-36.

129. Liang Y., Xu X., Shen H., Gao M., Zhao Y., Bai X., 2022, Morphological and endogenous phytohormone changes during long-term embryogenic cultures in Korean pine, Plant cell, tissue and organ culture, 151(2), pp.253-64.

130. Khai H.D., Hiep P.P.M., Tung H.T., Phong T.H., Mai N.T.N., Luan V.Q., Vinh B.V.T., Nhut D.T., 2024, Selenium nanoparticles promote adventitious rooting without callus formation at the base of passion fruit cuttings via hormonal homeostasis changes, Scientia horticulturae 323, pp.112485.

131. Phong T.H., Mai N.T.N., Cuong D.M., Luan V.Q., Tung H.T., Phuong H.T.N., Nhut D.T., 2025, Cobalt nanoparticles enhance the efficiency of in vitro propagation in purple passion fruit (Passiflora edulis Sims), Plant cell, tissue and organ culture, 162(2), pp.1-15.

132. Li K., Qin J.-C., Liu C.-G., Bai F.-W., 2016, Optimization of pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation for more efficient ethanol production by Jerusalem artichoke stalk, Bioresource technology, 221, pp.188-94.

133. Berens M.L., Berry H.M., Mine A., Argueso C.T., Tsuda K., 2017, Evolution of hormone signaling networks in plant defense, Annual review of phytopathology, 55(1), pp.401-25.

134. Pieterse C.M., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S.C., 2009, Networking by small-molecule hormones in plant immunity, Nature chemical biology, 5(5), pp.308-16.

135. Shigenaga A.M., Argueso C.T., 2016, No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens, Seminars in cell & developmental biology, 56, pp.174-89.

136. Yockteng R., d'Eeckenbrugge G.C., Souza-Chies T.T. Passiflora. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Tropical and Subtropical Fruits: Springer; 2011. p. 129-71.

137. Schotsmans W., Fischer G. Passion fruit (Passiflora edulis Sim.). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: Elsevier; 2011. p. 125-43e.

138. Thokchom R., Mandal G., 2017, Production preference and importance of passion fruit (Passiflora edulis): A review, Journal of agricultural engineering food technology, 4(1), pp.27-30.

139. 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, Frontiers in pharmacology, 11, pp.617.

140. Ramaiya S.D., Bujang J.S., Zakaria M.H., 2018, Nutritive values of passion fruit (Passiflora species) seeds and its role in human health, Journal of agriculture food and development, 4(1), pp.23-30.

141. Hansen H.V., 1999, A story of the cultivated Gerbera, New Plantsman, 6(2), pp.85-95.

142. Katinas L., 2004, The Gerbera complex (Asteraceae: Mutisieae): to split or not to split, Contributions to botany, pp.935-40.

143. The Vinh B.V., Tung H.T., Ha Nguyen P.L., Ngan H.T.M., Cuong D.M., Mai N.T.N., Dang H.H., Phuong H.T.N., Vinh N.Q., Nhut D.T., 2024, Iron nanoparticle

enhanced in vitro rooting and physiological–biochemical changes in Gerbera jamesonii var. Revolution Yellow plantlets, Plant cell, tissue organ culture, 159(2), pp.54.

144. Ye J., Wang T., Cai S., Komatsu K., Mikage M., Namba T., 1990, Pharmacognostical studies on folk medicine in Sichuan Province, China. II. On Tu-er-feng derived from Gerbera plants.

145. Ghanti K.S., Govindaraju B., Venugopal R., Rao S.R., Kaviraj C., Jabeen F., Barad A., Rao S., 2004, High frequency shoot regeneration from Phyllanthus amarus Schum. & Thonn, Council of scientific and industrial research.

146. Lợi Đ.T. Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 1997.

147. Bhattacharjee R., Sil P.C., 2007, Protein isolate from the herb, Phyllanthus niruri L.(Euphorbiaceae), plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidant properties, Food and chemical toxicology, 45(5), pp.817-26.

148. Sagar K.S., Chang C.-C., Wang W.-K., Lin J.-Y., Lee S.-S., 2004, Preparation and anti-HIV activities of retrojusticidin B analogs and azalignans, Bioorganic & medicinal chemistry, 12(15), pp.4045-54.

149. Hiếu T. 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 2022.

150. Murashige T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, Physiologia plantarum, 15(3).

151. Hien V.T., Tung H.T., Khai H.D., Luan V.Q., Van Lich T., Huong T.T., Nhut D.T., 2021, Effect of silver nanoparticles on sterilization of different explant sources of Gerbera jamesonii cultured in vitro, Vietnam journal of biotechnology, 19(4), pp.705-15.

152. Nhut D.T., An T.T.T., Huong N.T.D., Don N.T., Hai N.T., Thien N.Q., Vu N.H., 2007, Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of Gerbera jamesonii by receptacle transverse thin cell layer culture, Scientia horticulturae, 111(2), pp.146-51.

153. Cristescu S.M., Mandon J., Arslanov D., De Pessemier J., Hermans C., Harren F.J., 2013, Current methods for detecting ethylene in plants, Annals of botany, 111(3), pp.347-60.

154. Marklund S., Marklund G., 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, European journal of biochemistry, 47(3), pp.469-74.

155. Goth L., 1991, A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, Clinica chimica acta, 196(2-3), pp.143-51.

156. Nakano Y., Asada K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, Plant and cell physiology, 22(5), pp.867-80.

157. Desmarchelier C., Novoa Bermudez M., Coussio J., Ciccia G., Boveris A., 1997, Antioxidant and prooxidant activities in aqueous extracts of Argentine plants, International journal of pharmacognosy, 35(2), pp.116-20.

158. Wolfe K., Wu X., Liu R.H., 2003, Antioxidant activity of apple peels, Journal of agricultural food chemistry, 51(3), pp.609-14.

159. Harikrishnan H., Jantan I., Haque M.A., Kumolosasi E., 2018, Anti-inflammatory effects of Phyllanthus amarus Schum. & Thonn. through inhibition of NF-κB, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in LPS-induced human macrophages, BMC complementary and alternative medicine, 18, pp.1-13.

160. Peterson R.L., Peterson C.A., Melville L.H. Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises: NRC Research Press; 2008.

161. Duncan D.B., 1955, Multiple range and multiple F tests, Biometrics, 11(1), pp.1-42.

162. Nhut D.T., Khai H.D., Hung N.V., Vinh N.Q., Dung D.M., Tung H.T., Mai N.T.N., Luan V.Q., Cuong D.M., 2023, Effect of explant age on phytochemicals and morphogenesis in begonia, Plant cell, tissue and organ culture, 155(1), pp.267-82.

163. Antonelli M., Druart P., editors. The use of a brief 2, 4-D treatment to induce leaf regeneration on Prunus canescens Bois. I International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 280; 1989.

164. Zhang Y., Zhou J., Wu T., Cao J., 2008, Shoot regeneration and the relationship between organogenic capacity and endogenous hormonal contents in pumpkin, Plant cell, tissue organ culture, 93, pp.323-31.

165. Distabanjong K., Geneve R.L., 1997, Multiple shoot formation from cotyledonary node segments of Eastern redbud, Plant cell, tissue and organ culture, 47, pp.247-54.

166. Murthy H., Pyati A., 2001, Micropropagation of Aerides maculosum lindl.(Orchidaceae), In vitro cellular & developmental biology - plant, 37, pp.223-6.

167. Ibrahim R., Debergh P.C., 2001, Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (Rosa hybrida L.), Scientia horticulturae, 88(1), pp.41-57.

168. Thomas T.D., 2003, Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of mulberry, Biologia plantarum, 46, pp.529-33.

169. Dayal S., Lavanya M., Devi P., Sharma K., 2003, An efficient protocol for shoot regeneration and genetic transformation of pigeonpea [Cajanus cajan (L.) Millsp.] using leaf explants, Plant cell reports, 21, pp.1072-9.

170. Tang L.P., Zhang X.S., Su Y.H., 2020, Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis, ABiotech, 1(3), pp.185-93.

171. Hoque M.E., Mansfield J.W., 2004, Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes, Plant cell, tissue and organ culture, 78, pp.217-23.

172. Sun Y., Zhao Y., Wang X., Qiao G., Chen G., Yang Y., Zhou J., Jin L., Zhuo R., 2009, Adventitious bud regeneration from leaf explants of Platanus occidentalis L. and genetic stability assessment, Acta physiologiae plantarum, 31, pp.33-41.

173. Nhut D.T., Van Le B., Fukai S., Tanaka M., Van K.T.T., 2001, Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of Lilium longiflorum via young stem culture, Plant growth regulation, 33, pp.59-65.

174. Bramhanapalli M., Thogatabalija L., Gudipalli P., 2017, Efficient in vitro plant regeneration from seedling-derived explants and genetic stability analysis of

regenerated plants of Simarouba glauca DC. by RAPD and ISSR markers, In vitro cellular & developmental biology – plant, 53(1), pp.50-63.

175. Beyaz R., Aycan, Murat, Yildiz, Mustafa %J Journal of Biotechnology. 2017, The effect of explant position on Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer in flax (Linum usitatissimum L.), Journal of biotechnology, 256, pp.S39.

176. León J., Rojo E., Sánchez-Serrano J., 2001, Wound signalling in plants, Journal of experimental botany, 52(354), pp.1-9.

177. Zhou X., Zheng R., Liu G., Xu Y., Zhou Y., Laux T., Zhen Y., Harding S.A., Shi J., Chen J., 2017, Desiccation treatment and endogenous IAA levels are key factors influencing high frequency somatic embryogenesis in Cunninghamia lanceolata (Lamb.) Hook, Frontiers in plant science, 8, pp.2054.

178. Jiménez V., Guevara E., Herrera J., Bangerth F., 2005, Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis, Plant cell reports, 23(8), pp.567-72.

179. Nic-Can G.I., Loyola-Vargas V.M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications: Springer; 2016. p. 171-82.

180. Jiménez V.M., Bangerth F., 2001, Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot, Physiologia plantarum, 111(3), pp.389-95.

181. Ribnicky D.M., Cohen J.D., Hu W.-S., Cooke T.J., 2002, An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency, Planta, 214(4), pp.505-9.

182. Tokuji Y., Kuriyama K., 2003, Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (Daucus carota), Journal of plant physiology, 160(2), pp.133-41.

183. Grzyb M., Kalandyk A., Waligórski P., Mikuła A., 2017, The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern Cyathea delgadii Sternb, Plant cell, tissue and organ culture, 129(3), pp.387-97.

184. Pérez-Jiménez M., Cantero-Navarro E., Acosta M., Cos-Terrer J., 2013, Relationships between endogenous hormonal content and direct somatic

embryogenesis in Prunus persica L. Batsch cotyledons, Plant growth regulation, 71(3), pp.219-24.

185. Wu G., Wei X., Wang X., Wei Y., 2021, Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in Ormosia henryi Prain, Plant cell, tissue and organ culture, 144(3), pp.505-17.

186. Li Q., Deng C., Zhu T., Ling J., Zhang H., Kong L., Zhang S., Wang J., Chen X., 2019, Dynamics of physiological and miRNA changes after long-term proliferation in somatic embryogenesis of Picea balfouriana, Trees, 33(2), pp.469-80.

187. Garcia C., Furtado de Almeida A.-A., 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, tissue and organ culture, 137(2), pp.193-212.

188. Rasool S., Urwat U., Nazir M., Zargar S.M., Zargar M. Cross talk between phytohormone signaling pathways under abiotic stress conditions and their metabolic engineering for conferring abiotic stress tolerance. Singapore: Springer; 2018. 329-50 p.

189. Khan N., Bano A., Ali S., Babar M.A., 2020, Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses, Plant growth regulation, 90, pp.189-203.

190. Rajasekaran K., Hein M.B., Vasil I.K., 1987, Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of Pennisetum purpureum Schum. Effects in vivo and in vitro of glyphosate, fluridone, and paclobutrazol, Plant physiology, 84(1), pp.47-51.

191. Hisano H., Matsuura T., Mori I.C., Yamane M., Sato K., 2016, Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley, Plant physiology and biochemistry, 99, pp.66-72.

192. Fan G., Cao X., Zhao Z., Deng M., 2015, Transcriptome analysis of the genes related to the morphological changes of Paulownia tomentosa plantlets infected with phytoplasma, Acta physiologiae plantarum, 37, pp.1-12.

193. Li K., Liang Y., Xing L., Mao J., Liu Z., Dong F., Meng Y., Han M., Zhao C., Bao L., 2018, Transcriptome analysis reveals multiple hormones, wounding and sugar signaling pathways mediate adventitious root formation in apple rootstock, International journal of molecular sciences, 19(8), pp.2201.

194. Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M.B., 2007, Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation, The plant cell, 19(12), pp.3889-900.

195. Ramírez-Carvajal G.A., Morse A.M., Dervinis C., Davis J.M., 2009, The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in Populus, Plant physiology, 150(2), pp.759-71.

196. Saeedpour A., Godehkahriz S.J., Lohrasebi T., Esfahani K., Salmanian A.H., Razavi K., 2021, The effect of endogenous hormones, total antioxidant and total phenol changes on regeneration of barley cultivars, Iranian journal of biotechnology, 19(1), pp.e2838.

197. Weiss D., Ori N., 2007, Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones, Plant physiology, 144(3), pp.1240-6.

198. Wen S., Miao D., Cui H., Li S., Gu Y., Jia R., Leng Y., 2023, Physiology and transcriptomic analysis of endogenous hormones regulating in vitro adventitious root formation in tree peony, Scientia horticulturae, 318, pp.112122.

199. Pye M.F., Dye S.M., Resende R.S., MacDonald J.D., Bostock R.M., 2018, Abscisic acid as a dominant signal in tomato during salt stress predisposition to Phytophthora root and crown rot, Frontiers in plant science, 9, pp.525.

200. Singh P.K., Gautam S., 2013, Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants, Acta physiologiae plantarum, 35, pp.2345-53.

201. Wang Q., An B., Wei Y., Reiter R.J., Shi H., Luo H., He C., 2016, Melatonin regulates root meristem by repressing auxin synthesis and polar auxin transport in Arabidopsis, Frontiers in plant science, 7, pp.1882.

202. Chen Q., Qi W.-b., Reiter R.J., Wei W., Wang B.-m., 2009, Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of Brassica juncea, Journal of plant physiology, 166(3), pp.324-8.

203. Giridhar A.R.P., Ravishankar G., 2009, Indoleamines and calcium channels influence morphogenesis in in vitro cultures of Mimosa pudica L, Plant signaling and behavior, 4(12), pp.1136-41.

204. Ren S., Rutto L., Katuuramu D., 2019, Melatonin acts synergistically with auxin to promote lateral root development through fine tuning auxin transport in Arabidopsis thaliana, PLoS one, 14(8), pp.e0221687.

205. Singh A., Banerjee A., Roychoudhury A., 2022, Fluoride tolerance in rice is negatively regulated by the 'stress-phytohormone'abscisic acid (ABA), but promoted by ABA-antagonist growth regulators, melatonin, and gibberellic acid, Protoplasma, 259(5), pp.1331-50.

206. Emenecker R.J., Strader L.C., 2020, Auxin-abscisic acid interactions in plant growth and development, Biomolecules, 10(2), pp.281.

207. Huang F., Tang L., Wang X., Cai N., Qiao Z., 2022, Study on in vitro induction of rooting and changes in endogenous hormone content of Lagerstroemia indica 'Zijingling', Acta scientiarum polonorum hortorum cultus, 21(3), pp.39-52.

208. Sun L.R., Wang Y.B., He S.B., Hao F.S., 2018, Mechanisms for abscisic acid inhibition of primary root growth, Plant signaling & behavior, 13(9), pp.e1500069.

209. Bais H.P., Loyola-Vargas V.M., Flores H.E., Vivanco J.M., 2001, Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs, In vitro cellular & developmental biology – plant, 37, pp.730-41.

210. Khanam M.N., Anis M., Javed S.B., Mottaghipisheh J., Csupor D., 2022, Adventitious root culture-an alternative strategy for secondary metabolite production: a review, Agronomy, 12(5), pp.1178.

211. Sivakumar G., 2006, Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots, Biotechnology journal: healthcare nutrition technology, 1(12), pp.1419-27.

212. Xu J., Zhang S., 2015, Ethylene biosynthesis and regulation in plants, Dordrecht, Springer Netherlands, 25p

213. Hasan N., Hussien S., 2013, Adventitious root induction of Labisia pumila in respond to plant growth regulators and different plant growth regulators, Science letters, 7, pp.9-18.

214. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. he Netherland: Springer; 2008. 65-175 p.

215. Neill S., Desikan R., Hancock J., 2002, Hydrogen peroxide signalling, Current opinion in plant biology, 5(5), pp.388-95.

216. Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T., 2002, Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants, The journal of experimental botany, 53(372), pp.1237-47.

217. Rai K.K., Pandey N., Rai S.P., 2020, Salicylic acid and nitric oxide signaling in plant heat stress, Physiologia plantarum, 168(2), pp.241-55.

218. Jones J.D., Dangl J.L., 2006, The plant immune system, Nature, 444(7117), pp.323-9.

219. Seki M., Umezawa T., Urano K., Shinozaki K., 2007, Regulatory metabolic networks in drought stress responses, Current opinion in plant biology, 10(3), pp.296-302.

220. Mishra A., Tanna B., 2017, Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters, Frontiers in plant science, 8, pp.829.

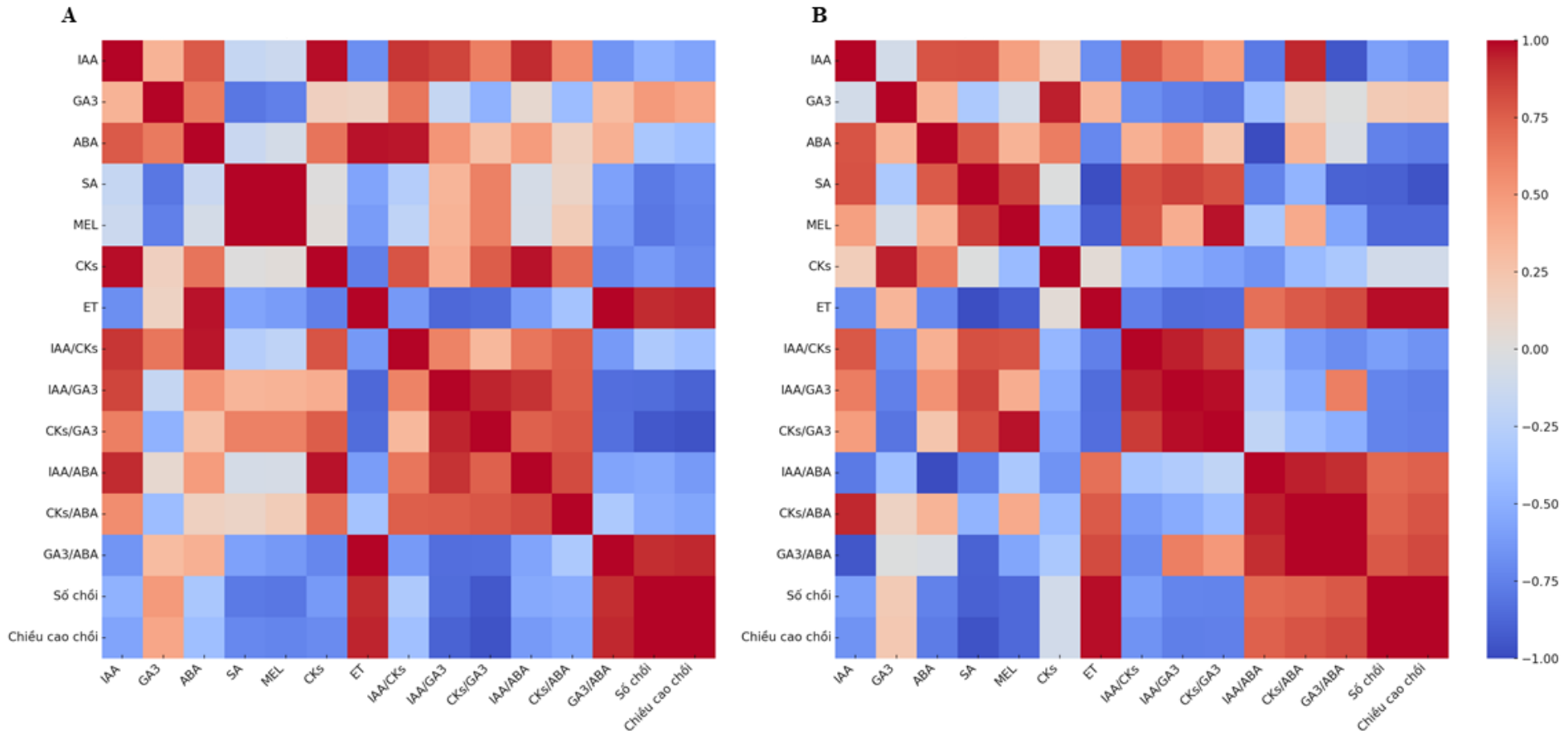
221. Jacobo-Velázquez D.A., González-Agüero M., Cisneros-Zevallos L., 2015, Cross-talk between signaling pathways: the link between plant secondary metabolite production and wounding stress response, Scientific reports, 5(1), pp.8608.

222. Cisneros-Zevallos L., 2003, The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables, Journal of food ccience, 68(5), pp.1560-5.

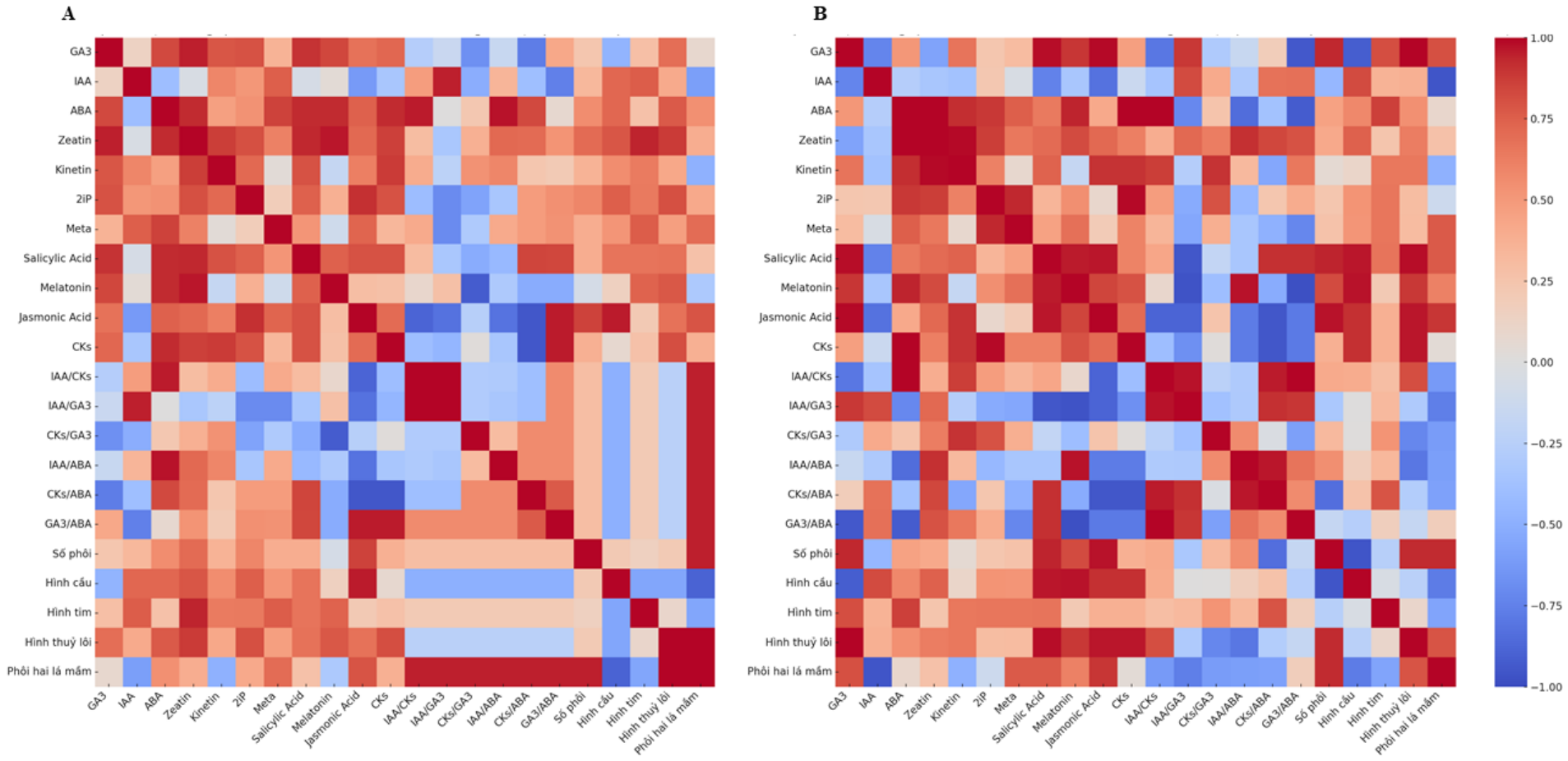
223. Jacobo-Velázquez D.A., Martínez-Hernández G.B., del C. Rodríguez S., Cao C.-M., Cisneros-Zevallos L., 2011, Plants as biofactories: Physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress, Journal of agricultural and food chemistry, 59(12), pp.6583-93.

PHỤ LỤC

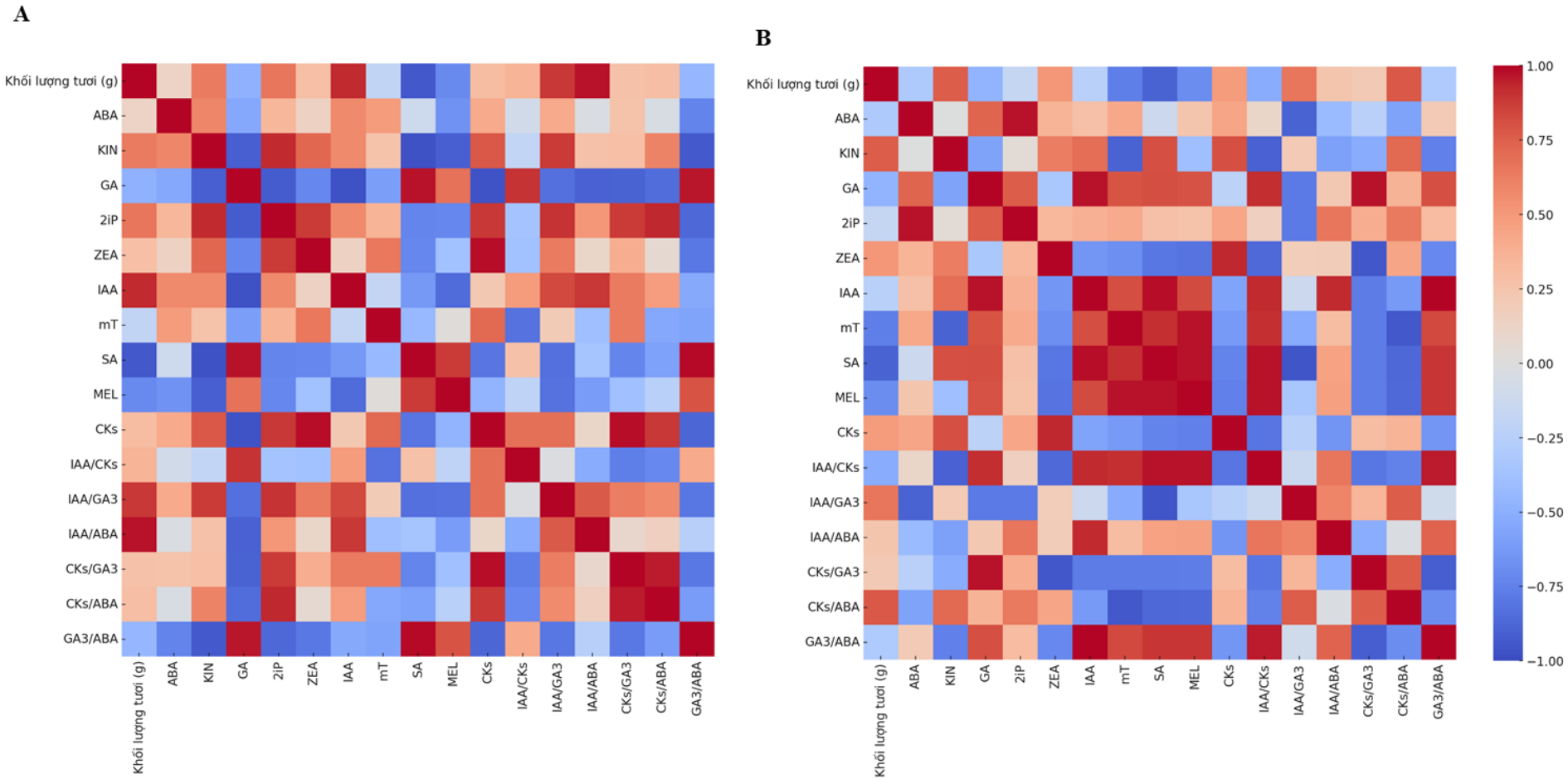
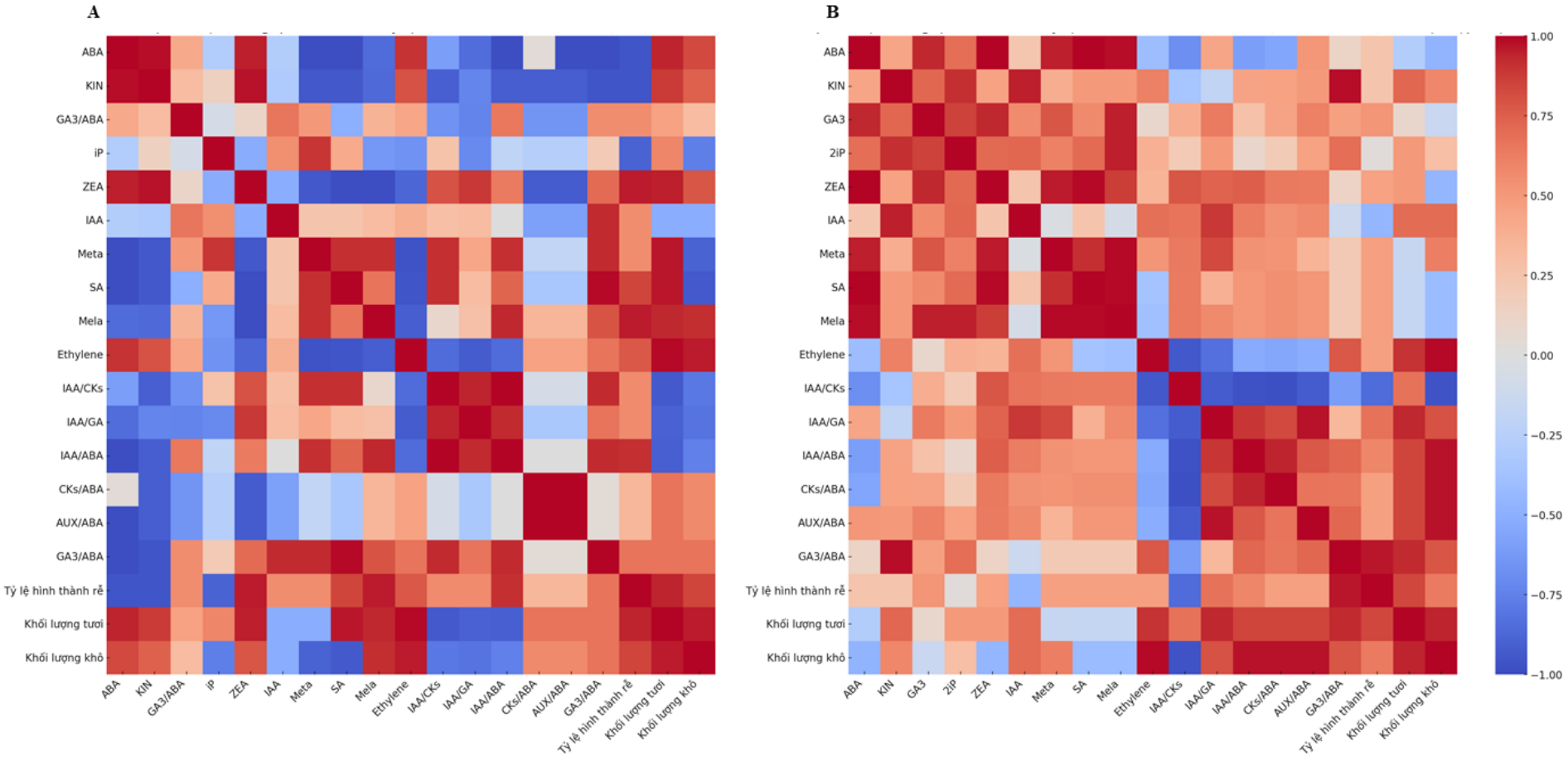
S.1. Mối tương quan của các hormone nội sinh và quá trình phát sinh chồi bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân **(A)** và lTCL lóng thân của cây chanh dây **(B)**. Hệ số tương quan được tính toán dựa trên tương quan Pearson. Màu đỏ biểu thị mối tương quan thuận, trong khi màu xanh biểu thị mối tương quan nghịch.



S.2. Mối tương quan của các hormone nội sinh và quá trình phát sinh phôi soma có nguồn gốc từ mẫu đế hoa **(A)** và lTCL đế hoa của cây hoa đồng tiền **(B)**. 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.



S.3. Mối tương quan của các hormone nội sinh và quá trình phát sinh mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lóng thân **(A)** và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu **(B)**. 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.



S.4. Mối tương quan của các hormone nội sinh và quá trình phát sinh rễ bất định có nguồn gốc từ mẫu lóng thân **(A)** và lTCL lóng thân của cây diệp hạ châu **(B)**. 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.