

## NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ HÌNH THÀNH HOA *IN VITRO* Ở CÂY TORENIA (*TORENIA FOURNIERI* L.)

Dương Tấn Nhựt\*, Lê Văn Thức, Trần Trọng Tuấn, Trương Thị Diệu Hiền,  
Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận

Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KHCNVN, Đà Lạt, Lâm Đồng

\*Email: duongtannhut@gmail.com

Đến Tòa soạn: 16/8/2012; Chấp nhận đăng: 10/11/2013

### TÓM TẮT

Sự chuyển đổi từ giai đoạn sinh dưỡng sang sinh sản (giai đoạn ra hoa) phụ thuộc vào những yếu tố hóa học, vật lý, các yếu tố vi lượng độ tuổi của mẫu và các chất điều hòa sinh trưởng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành kiểm tra một vài yếu tố ảnh hưởng đến khả năng biệt hóa của những chồi hoa *Torenia fournieri* L. *in vitro*. Kết quả chỉ ra rằng những chồi già hơn cho tỷ lệ hình thành hoa cao hơn. Các chồi 60 ngày tuổi có tỷ lệ hình thành hoa là cao nhất (65 %) sau 30 ngày nuôi cấy. Hơn thế nữa, hàm lượng khoáng vi lượng, khoáng đa lượng, nồng độ đường, các chất điều hòa sinh trưởng, than hoạt tính và điều kiện chiếu sáng cũng có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng ra hoa. Những chồi được nuôi cấy trên môi trường  $\frac{1}{4}$ MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, có bổ sung thêm 60 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính với chu kỳ chiếu sáng là 10 giờ sáng ( $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )/14 giờ tối cho tỷ lệ ra hoa là cao nhất 87,18 % với 2,8 nụ hoa/mẫu cấy. Các hoa *in vitro* và *ex vitro* không có sự khác biệt về hình thái và màu sắc.

**Từ khóa:** chất điều hòa sinh trưởng thực vật, giai đoạn sinh dưỡng, giai đoạn sinh sản, ra hoa *in vitro*, *Torenia fournieri* L.

### 1. GIỚI THIỆU

Sự tiến bộ của công nghệ tế bào và kỹ thuật nuôi cấy mô đã nhanh chóng trở thành một công cụ hữu ích, một hệ thống nuôi cấy lí tưởng cho các nghiên cứu ở mức tế bào và quá trình phát sinh hình thái thực vật. Dưới góc độ *in vitro*, kỹ thuật nở hoa trong ống nghiệm (hoa *in vitro*) không những cung cấp một mô hình hoa mini mà còn đi sâu tìm hiểu các yếu tố nội sinh và ngoại sinh tác động lên khả năng biệt hóa chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản. Quá trình ra hoa *in vitro* đã được nghiên cứu trên rất nhiều đối tượng thực vật [1] và cơ chế điều khiển thời gian ra hoa cũng được nghiên cứu rộng rãi ở *Arabidopsis* [2]. Sự nở hoa được cho là kết quả của sự tương tác giữa các chất khoáng đa vi lượng, các chất điều hòa tăng trưởng thực vật như cytokinin, auxin, gibberellin, ethylen, acid abscisic... [3, 4]. Sự hiện diện của gibberellin và BA thúc đẩy mạnh sự tạo hoa ở *Zantedeschia* spp. [5] và auxin đóng vai trò chính trong sự hình thành hoa của một số loài thực vật như: *Capsicum annuum*, *Pisum sativum*, *Vigna mugo* cv.

VBNI [6, 7, 8]. Bên cạnh đó, loại đường và nồng độ đường cũng gây ra những ảnh hưởng không nhỏ đến quá trình hình thành hoa *in vitro* ở *Plumbago indica* L. [9].

Cùng với các nghiên cứu ở các loài khác nhau, *Torenia* (*Torenia fournieri* L.) hay còn được gọi là hoa Mất biếc, một loài cây thân thảo có nguồn gốc từ châu Á và châu Phi với vẻ đẹp giản dị, cánh hoa mềm mại, nhiều màu sắc, vòng đời ngắn và đáp ứng khá nhanh với điều kiện nuôi cấy *in vitro* nên phù hợp cho việc nghiên cứu các hiện tượng sinh lý cơ bản trong quá trình ra hoa. Các nghiên cứu *in vitro* về loài này đã được thực hiện khá nhiều như nhân giống vô tính, chuyển gen, biến dị dòng soma, tạo hoa *in vitro*... [10, 11]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về ra hoa chỉ dừng ở giai đoạn lựa chọn mẫu cấy hay chuyển gen mà chưa đi sâu vào nghiên cứu ảnh hưởng của nhiều nhân tố cụ thể như: ánh sáng, hàm lượng dinh dưỡng, nồng độ đường, chất điều hòa sinh trưởng thực vật... lên sự ra hoa. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi mẫu, thành phần môi trường và điều kiện chiếu sáng đến sự hình thành hoa *in vitro* ở cây *Torenia* (*Torenia fournieri* L.). Kết quả đạt được sẽ mở ra triển vọng mới phát triển ngành kinh doanh hoa cảnh - hoa mini *in vitro* và ứng dụng quy trình ra hoa *in vitro* để thực hiện các nghiên cứu liên quan khác.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Nguồn mẫu là các chồi cây *Torenia* (*Torenia fournieri* L.) màu trắng viền tím và màu trắng viền hồng nuôi cấy *in vitro* đã ổn định qua nhiều lần cấy chuyển trên môi trường MS cơ bản [12], đạt chiều cao khoảng 3,5 cm được làm vật liệu cho tất cả các thí nghiệm.

### 2.2. Phương pháp

2.2.1. *Khảo sát ảnh hưởng của tuổi mẫu lên khả năng biệt hóa từ chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản ở cây T. fournieri in vitro*

Các chồi *T. fournieri* tái sinh từ mẫu lá được cấy chuyển 3 lần (20 ngày/lần). Sau đó, các chồi 3,5 cm được thu lấy vào các thời gian khác nhau (30, 45 và 60 ngày) để khảo sát tuổi mẫu và nuôi cấy trên môi trường  $\frac{1}{2}$ MS (thành phần đa lượng giảm đi một nửa) có bổ sung 30 g/l đường sucrose và 8 g/l agar.

2.2.2. *Khảo sát ảnh hưởng của một số thành phần môi trường lên khả năng biệt hóa từ chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản ở cây T. fournieri in vitro*

#### Muối khoáng

Các chồi 3,5 cm được nuôi cấy trên môi trường 2MS, MS,  $\frac{3}{4}$ MS,  $\frac{1}{2}$ MS,  $\frac{1}{4}$ MS, MS $\frac{3}{4}$ , MS $\frac{1}{2}$ , MS $\frac{1}{4}$  có bổ sung 30 g/l đường sucrose và 8 g/l agar (trong đó: môi trường 2MS tăng thành phần đa lượng lên 2 lần;  $\frac{3}{4}$ MS,  $\frac{1}{2}$ MS,  $\frac{1}{4}$ MS giảm thành phần đa lượng theo tỉ lệ tương ứng; môi trường MS $\frac{3}{4}$ , MS $\frac{1}{2}$ , MS $\frac{1}{4}$  giảm cả thành phần đa lượng và vi lượng theo tỉ lệ tương ứng).

*$\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) và 6-benzyladenine (BA)*

Các chồi 3,5 cm được nuôi cấy trên môi trường ¼MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 8 g/l agar, 0,1 mg/l NAA và BA ở các nồng độ (0,0; 0,1; 0,3; 0,5 và 1,0 mg/l BA) hoặc 0,1 mg/l BA và NAA ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,1; 0,3; 0,5 và 1,0 mg/l).

#### *Gibberellin (GA<sub>3</sub>)*

Các chồi 3,5 cm được nuôi cấy trên môi trường ¼MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 8 g/l agar và GA<sub>3</sub> ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,1; 0,5 và 1,0 mg/l).

#### *Than hoạt tính*

Mẫu chồi 3,5 cm được nuôi cấy trên môi trường ¼MS có hoặc không có bổ sung 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l đường sucrose và 8 g/l agar.

#### *Đường sucrose*

Các chồi 3,5 cm được nuôi cấy trên môi trường ¼MS có bổ sung 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar và đường sucrose ở các nồng độ khác nhau (0; 15; 30; 45; 60 và 90 g/l).

#### *2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng và thời gian chiếu sáng lên khả năng biệt hóa từ chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản ở cây *T. fournieri* in vitro*

Các chồi 3,5 cm được nuôi cấy trên môi trường ¼MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 8 g/l agar và cường độ chiếu sáng được điều chỉnh từ 18 - 45  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  với thời gian chiếu sáng (6, 10 và 14 giờ/ngày). Nguồn sáng được sử dụng là đèn neon ánh sáng trắng (Công ty Bóng đèn phích nước Rạng Đông).

#### *2.2.4. Đánh giá sự phát sinh hình thái hoa ở cây *T. fournieri* ra hoa trong điều kiện in vitro và nuôi trồng ex vitro*

Các chồi *T. fournieri* (khoảng 400 chồi) được nuôi cấy trên môi trường ¼MS có bổ sung 60 g/l đường sucrose, 8 g/l agar và 1 g/l than hoạt tính. Sau 15 ngày nuôi cấy các chồi đã hình thành rễ, 198 cây được đưa ra trồng ngoài vườn ươm (*ex vitro*) để so sánh sự phát sinh hình thái giữa hoa nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* và hoa nuôi trồng ở điều kiện *ex vitro*.

### **2.3. Điều kiện thí nghiệm**

*Điều kiện in vitro*: tất cả các môi trường được chỉnh pH đến 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121 °C, 1 atm trong thời gian 35 phút. Các mẫu cấy được cấy vào bình thủy tinh 500 ml chứa 60 ml môi trường. Mỗi nghiệm thức 15 mẫu (3 mẫu/bình) và được lần lặp lại 5 lần. Các thí nghiệm được giữ ở điều kiện nhiệt độ  $25 \pm 2$  °C, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày với cường độ 45  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (cho tất cả các thí nghiệm trừ thí nghiệm khảo sát ánh sáng) và ẩm độ trung bình 75 – 80 %.

*Điều kiện ex vitro*: nhiệt độ nhà lưới 18 – 27 °C, độ ẩm trung bình 85 – 90 %, sử dụng nguồn ánh sáng tự nhiên và có che sáng 40 %.

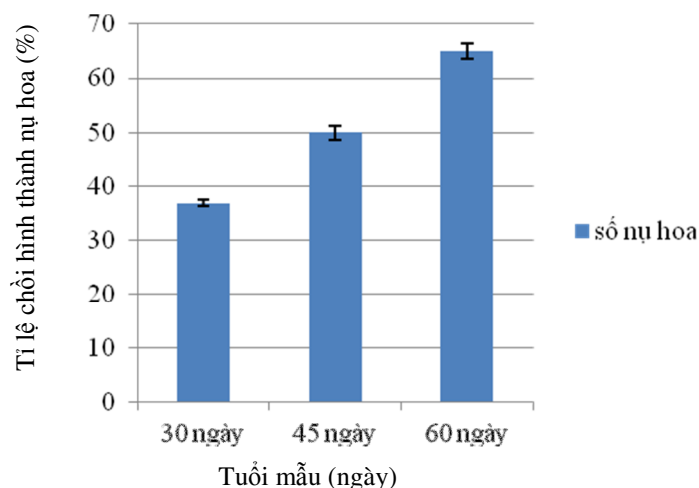
### **2.4. Xử lý thống kê**

Các chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây (cm), tỉ lệ (%) và thời gian hình thành nụ hoa (ngày), số nụ hoa/chồi, hình thái hoa và tình trạng mẫu cây. Kết quả thí nghiệm được ghi nhận sau 20, 30, 45 và 60 ngày nuôi cấy. Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0 (SPSS Inc. Headquarters, United States) bằng phép thử Duncan ở mức xác suất có ý nghĩa  $P = 0,05$  [13].

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của tuổi mẫu lên khả năng biệt hóa chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản ở cây *T. fournieri* *in vitro*

Việc xác định độ tuổi của nguồn mẫu ban đầu luôn là vấn đề đáng quan tâm trong nghiên cứu về sự nở hoa ở thực vật. Trong thí nghiệm này, chúng tôi nhận thấy tỉ lệ hình thành hoa ở những cây mới tái sinh từ mẫu lá là rất thấp và hầu như không xảy ra. Kết quả thu được cho thấy, tỉ lệ chồi hình thành nụ hoa tăng dần khi tuổi mẫu càng cao, hiệu quả cao nhất khi mẫu ở giai đoạn 60 ngày tuổi (65,00 %) và thấp nhất ở giai đoạn 30 ngày tuổi (36,80 %) (biểu đồ 1). Có thể khẳng định rằng, mẫu cây ở giai đoạn 60 ngày tuổi là sự lựa chọn tốt nhất cho quá trình ra hoa *in vitro* ở cây *T. fournieri*, vì trong quá trình cây chuyển mẫu cây ở giai đoạn 75 ngày và 90 ngày tuổi cây phát triển lên đến nắp bình nuôi cấy làm cho các chồi đỉnh bị dị dạng, lá nhỏ và có hiện tượng úa vàng do nguồn dinh dưỡng đã cạn kiệt.



Biểu đồ 1. Số lượng chồi *T. fournieri* hình thành nụ hoa ở các mẫu cây có độ tuổi khác nhau.

Để giải thích cho giai đoạn còn non của thực vật, các nhà khoa học đã thực hiện nhiều nghiên cứu nhưng cho đến nay nó vẫn là một câu hỏi lớn. Có giả thuyết cho rằng, thực vật còn non không có khả năng tạo hoa là do chúng không thể sinh tổng hợp các yếu tố kích thích sự nở hoa hoặc đỉnh sinh trưởng của chúng không thể phản ứng với các yếu tố kích thích đó [14, 15]. Christian Breton (2004) ghi nhận, sự hình thành nụ hoa ở cây Óc chó (*Juglans regia*) phải qua 3 đến 6 lần cây chuyển [16]. Trong khi đó, Nguyễn Hồng Vũ và cộng sự (2006) nghiên cứu về sự ra hoa trên hoa Hồng (hybrid tea) cv. “First Prize” thì thời gian cây chuyển tối ưu để cảm ứng ra hoa *in vitro* là 90 ngày [17]. Như vậy, mỗi loài có một ngưỡng thời gian nhất định để chuyển từ giai đoạn sinh dưỡng sang giai đoạn sinh sản là rất khác nhau và đối với *T. fournieri* mẫu chồi 60 ngày tuổi là phù hợp cho quá trình tạo hoa *in vitro*.

### 3.2. Ảnh hưởng của một số thành phần môi trường lên khả năng biệt hóa từ chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản ở cây *T. fournieri* in vitro

#### Muối khoáng

Tỉ lệ hình thành chồi hoa *T. fournieri* trong điều kiện in vitro phụ thuộc rất lớn vào hàm lượng các chất dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy. Số nụ hoa đạt cao nhất (75,14 %) trên môi trường ¼MS sau 60 ngày nuôi cấy (bảng 1). Tuy nhiên, cũng trên môi trường này chiều cao chồi lại thấp nhất (6,10 cm), trong khi ở các môi trường khác chiều cao chồi có thể lên đến 11,60 cm (MS¼) (bảng 1). Điều này có thể giải thích, môi trường ¼MS có thành phần đa lượng trong môi trường nuôi cấy thấp hơn các môi trường khác làm cho các chồi chuyển đổi từ giai đoạn sinh dưỡng sang giai đoạn sinh sản sớm hơn (sau 20 ngày nuôi cấy đã có 6,38 % chồi hình thành nụ hoa) (bảng 1).

*Bảng 1.* Ảnh hưởng của thành phần khoáng môi trường lên khả năng biệt hóa từ chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản ở cây *T. fournieri* in vitro.

| Môi trường | Tỉ lệ chồi hình thành nụ hoa (%) |         |         | Chiều cao cây trung bình (cm) |
|------------|----------------------------------|---------|---------|-------------------------------|
|            | 20 ngày                          | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày                       |
| 2 MS       | 0,00b                            | 0,00h   | 0,00g   | 0,00g                         |
| MS         | 0,00b                            | 5,17g   | 10,02f  | 8,90d                         |
| ¾ MS       | 0,00b                            | 16,67e  | 20,41e  | 9,83b                         |
| ½ MS       | 0,00b                            | 42,86c  | 56,19c  | 9,60c                         |
| ¼ MS       | 6,38a                            | 51,06a  | 75,14a  | 6,10f                         |
| MS ¾       | 0,00b                            | 28,57d  | 38,09d  | 8,15e                         |
| MS ½       | 0,00b                            | 15,39f  | 20,37e  | 9,03d                         |
| MS ¼       | 0,00b                            | 44,00b  | 60,00b  | 11,60a                        |

**Ghi chú:** Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy P = 0,05 (Duncan's test).

Quá trình hình thành nụ hoa cũng như sự sinh trưởng của cây *T. fournieri* trong điều kiện in vitro chịu ảnh hưởng mạnh của các yếu tố đa lượng (chủ yếu là N, P, K). Nếu xét từ môi trường 2MS, MS, ¾MS và ½MS thì môi trường ¼MS có hàm lượng đa lượng thấp nhất. Các nguyên tố đa lượng hiện diện với hàm lượng cao đã phần nào ức chế quá trình hình thành chồi hoa *T. fournieri* và mỗi loài có một giới hạn thích hợp về chất dinh dưỡng cho quá trình sinh trưởng, phát triển riêng và đặc trưng của nó. Đối với *T. fournieri* chúng tôi nhận thấy, các mẫu chồi nuôi cấy trong môi trường 2MS, nghĩa là thành phần đa lượng tăng gấp đôi, các mẫu hầu như bị chết hoàn toàn sau khoảng 1 tuần nuôi cấy, vì vậy đây có thể xem là giới hạn trên của nó; còn trong môi trường ¼MS thành phần đa lượng thấp, nghĩa là hàm lượng nitrogen (cung cấp dưới dạng NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) giảm, trong khi đó lượng cacbon (đường) không đổi, điều này dẫn đến tỉ lệ C/N tăng và nó đã kích thích sự ra hoa, ngược lại các môi trường khác tỉ lệ C/N thấp hơn nên sự phát triển sinh dưỡng chiếm ưu thế (chiều cao tăng dần khi tỉ lệ C/N giảm). Kết quả này cũng tương tự ở *Arabidopsis* khi hàm lượng nitrogen cao đã làm chậm sự ra hoa (480 mg/l so với 8 mg/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) [18]. Trong nghiên cứu của Bounng-Jun và Igor (2001) về phương pháp ra hoa in vitro ở hoa Lan (*Dendrobium orchid*)

khi xử lí cắt rễ, bổ sung cytokinin, hàm lượng nitrogen thấp và tăng hàm lượng phosphorus đã làm tăng hiệu quả của việc cảm ứng ra hoa [19]. Khi giảm tất cả các thành phần dinh dưỡng trong môi trường ( $MS^{3/4}$ ,  $MS^{1/2}$  và  $MS^{1/4}$ ) thì sự phát triển chiều cao chiếm ưu thế, cây cao, mảnh và yếu ớt. Điều này luận chứng rõ hơn về tầm quan trọng của khoáng vi lượng trong quá trình phát sinh hình thái ở *T. fournieri*. Như vậy, sự hình thành nụ hoa chịu ảnh hưởng mạnh bởi thành phần dinh dưỡng khoáng đa lượng và vi lượng và môi trường  $1/4MS$  là môi trường hình thành nụ hoa cao nhất so với các môi trường khác ở loài *T. fournieri* này.

#### NAA và BA

Kết quả thu được cho thấy, quá trình biệt hóa từ chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản vẫn diễn ra sau 30 ngày nuôi cấy dù trong môi trường không bổ sung BA ngoại sinh (51,06 %) (bảng 2). Tỷ lệ tạo nụ hoa giảm khi môi trường có bổ sung BA (bảng 2). Điều này có thể giải thích, nhu cầu về BA ngoại sinh cho quá trình hình thành nụ hoa đối với loài *T. fournieri* là không cao, khi hàm lượng BA cao lại kích thích quá trình phát sinh chồi bất định. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Tang và cộng sự (1983) ở cây Sắn *Manihot esculenta* Crantz [5]. Ngoài ra, sự ra hoa *in vitro* cũng được kích thích mà không cần bổ sung bất kì loại phytohormone nào vào môi trường nuôi cấy [5] và phản ứng ra hoa *in vitro* ở *Pisum sativum* [7] và sự hiện diện của nhóm cytokinin như BA, zeatin ức chế quá trình hình thành chồi hoa ở *Brassica napus* [20]. Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin ở nồng độ thích hợp là rất quan trọng trong quá trình cảm ứng tạo hoa ở nhiều loài thực vật [21]. Bảng 2 cho thấy, khi lần lượt tăng nồng độ BA (0,1; 0,3; 0,5 và 1,0 mg/l) và giữ nguyên nồng độ NAA (0,1 mg/l) thì sự cảm ứng chồi hình thành hoa cũng như chiều cao chồi giảm dần.

Bảng 2. Ảnh hưởng của NAA và BA lên khả năng biệt hóa từ chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản ở cây *T. fournieri in vitro*.

| Kí hiệu<br>Môi trường | Phytohormone<br>(mg/l) |     | Tỷ lệ chồi hình thành nụ<br>hoa (%) | Chiều cao cây<br>trung bình (cm) |
|-----------------------|------------------------|-----|-------------------------------------|----------------------------------|
|                       | NAA                    | BA  |                                     |                                  |
| BN0                   | 0,0                    | 0,0 | 51,06a                              | 6,10b                            |
| BN1                   | 0,1                    | 0,0 | 41,67b                              | 7,97a                            |
| BN2                   | 0,1                    | 0,1 | 36,80c                              | 4,63d                            |
| BN3                   | 0,1                    | 0,3 | 16,67d                              | 4,27e                            |
| BN4                   | 0,1                    | 0,5 | 6,25f                               | 2,87g                            |
| BN5                   | 0,1                    | 1,0 | 0,00g                               | 2,90g                            |
| BN6                   | 0,0                    | 0,1 | 38,18c                              | 4,87c                            |
| BN7                   | 0,3                    | 0,1 | 14,29e                              | 4,25e                            |
| BN8                   | 0,5                    | 0,1 | 6,67f                               | 4,35e                            |
| BN9                   | 1,0                    | 0,1 | 0,00g                               | 4,01f                            |

**Ghi chú:** Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy  $P = 0,05$  (Duncan's test).

Tương tự, khi cố định BA (0,1 mg/l) và thay đổi nồng độ NAA (0,1; 0,3; 0,5 và 1,0 mg/l) thì kết quả về sự tạo hoa và chiều cao chồi vẫn theo khuynh hướng giảm dần khi tăng nồng độ NAA và chỉ có hệ rễ phát triển nhiều hơn. Cây *T. fournieri* cũng giống như cây *Perilla frutescens* [4], cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) [22, 23] phụ thuộc rất nhiều vào tỉ lệ cytokinin/auxin. Khi nồng độ auxin cao, chồi *in vitro* của các loài này có xu hướng phát triển cơ quan sinh dưỡng hơn là sự biệt hóa thành chồi mang hoa. Không phải lúc nào auxin cũng ức chế quá trình cảm ứng tạo hoa, trong một số trường hợp auxin đóng vai trò chính quyết định sự hình thành hoa ở một số loài thực vật như: *Capsicum annuum*, *Pisum sativum*, *Vigna mungo* cv. VBNI [6, 7, 8]. Tuy nhiên, kết quả trong nghiên cứu này cho thấy sự ra hoa *in vitro* của loài *T. fournieri* không cần sự có mặt của phytohormone.

### Gibberellin ( $GA_3$ )

Gibberellin đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của thực vật bao gồm sự nảy mầm của hạt, kéo dài tế bào và sự ra hoa [24]. Ben-Nissan và cộng sự (2004) quan sát thấy sự tổng hợp của GIP1 (một protein được cảm ứng bởi  $GA_3$ ) đồng nhất với sự kéo dài của tế bào thân và chuyển tiếp ra hoa trên *Petunia hybrida* [25].  $GA_3$  cũng thường thúc đẩy sự ra hoa ở thực vật lá kim nhưng lại ức chế sự ra hoa ở thực vật hạt kín [26]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy  $GA_3$  có thể là một yếu tố giới hạn quá trình ra hoa ở *T. fournieri*. Môi trường không bổ sung  $GA_3$  cho sự cảm ứng tạo hoa đạt tỉ lệ cao nhất (75,14 %) (bảng 3). Ngược lại, môi trường bổ sung  $GA_3$  ở nồng độ cao (1,0 mg/l) tỉ lệ cảm ứng tạo hoa và chiều cao cây là thấp nhất (tương ứng 16,03 % và 4,26 cm/cây) (bảng 3). Bên cạnh đó, khi môi trường có bổ sung 0,1 mg/l  $GA_3$  cho chiều cao cây là cao nhất. Điều này có thể giải thích, khi bổ sung  $GA_3$  vào môi trường ở nồng độ thấp đã làm cho giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng kéo dài hơn, sau 30 ngày mới bắt đầu hình thành nụ hoa, trong khi môi trường không có bổ sung  $GA_3$  ngoại sinh là 25 ngày. Ngược lại, những nghiên cứu của Chaari-Rkhis và cộng sự (2006) nhận thấy  $GA_3$  đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng sinh dưỡng cũng như sự ra hoa ở cây Ôliu *Olea europaea in vitro* [27].

Bảng 3. Ảnh hưởng của  $GA_3$  lên sự hình thành nụ hoa và chiều cao trung bình cây *T. fournieri in vitro*.

| $GA_3$<br>(mg/l) | Tỉ lệ chồi hình thành nụ hoa<br>(%) |         | Chiều cao cây trung bình<br>(cm) |
|------------------|-------------------------------------|---------|----------------------------------|
|                  | 30 ngày                             | 60 ngày | 30 ngày                          |
| 0,0              | 51,06a                              | 75,14a  | 6,10b                            |
| 0,1              | 23,63b                              | 40,47b  | 7,89a                            |
| 0,5              | 9,52c                               | 43,46b  | 5,90b                            |
| 1,0              | 3,19d                               | 16,03c  | 4,26c                            |

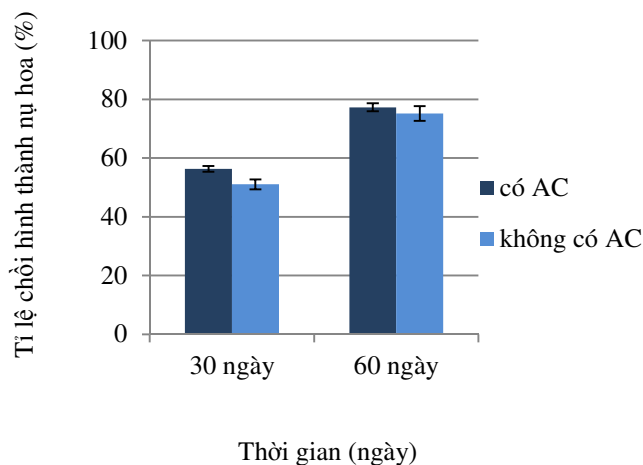
**Ghi chú:** Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy  $P = 0,05$  (Duncan's test).

Tóm lại, khi bổ sung  $GA_3$  vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cao cây *T. fournieri* thì cả chiều cao cây và tỉ lệ biệt hóa chồi hoa đều giảm. Các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, vai trò của  $GA_3$  đối với sự ra hoa nói riêng và sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng rất phức tạp, thay đổi theo từng loài và từng giai đoạn sinh trưởng. Đây cũng là một vấn đề khá thú vị cần được

quan tâm nghiên cứu và làm rõ hơn về cơ chế hoạt động cũng như vai trò của nó. Qua đó có thể thấy, trong điều kiện *in vitro* việc bổ sung GA<sub>3</sub> có thể thúc đẩy sự ra hoa của loài này nhưng lại ức chế sự ra hoa ở một số loài khác và sự ra hoa *in vitro* ở loài *T. fournieri* không cần sự có mặt của GA<sub>3</sub>.

#### Than hoạt tính

Các mẫu cây ở thí nghiệm môi trường 1/4MS, MS<sup>3</sup>/<sub>4</sub>, MS<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, MS<sup>1</sup>/<sub>4</sub> cây có thân mảnh, yếu ớt. Vì vậy, chúng tôi đã nghĩ đến việc bổ sung than hoạt tính (activated charcoal - AC) vào môi trường nuôi cấy để khắc phục nhược điểm này. Bên cạnh đó, quá trình nhân giống cây *T. fournieri* chúng tôi đã bổ sung 1 g/l AC vào môi trường nuôi cấy cây xanh tốt, cứng cáp hơn nên trong thí nghiệm này chúng tôi cũng bổ sung 1 g/l AC để đánh giá ảnh hưởng của AC lên sự hình thành nụ hoa *in vitro*. Kết quả cho thấy cây nuôi cấy trên môi trường bổ sung AC có thân lớn, lá xanh, rễ phát triển mạnh và thời gian hình thành nụ hoa sớm hơn. Sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường 1/4MS bổ sung AC cho tỉ lệ hình thành nụ hoa cao hơn (56,33 %) so với môi trường không bổ sung AC (51,06 %). Ở giai đoạn 60 ngày nuôi cấy thì sự khác biệt không đáng kể (77,25 % so với 75,14 %) (biểu đồ 2). Tuy nhiên, môi trường bổ sung AC sau 60 ngày nuôi cấy có hoa đồng đều, hình thái và màu sắc hoa đẹp hơn cây nuôi cấy trên môi trường không bổ sung AC (hình 1b, c). Theo Pan và Van-Staden (1998) bổ sung AC vào môi trường nuôi cấy sẽ hấp thụ các chất độc như các phenolic hay dịch rỉ nâu sinh ra từ mẫu hay môi trường nuôi cấy [25]. Bên cạnh đó, bổ sung AC vào môi trường nuôi cấy cũng kích thích biệt hoá tế bào Phong lan (*Orchidaceae*), Cà rốt (*Daucus carota* subsp. *sativus*), Cà chua (*Lycopersicum esculentum* Miller)... [21]. Asha và cộng sự (2011) nghiên cứu sự ra hoa ở loài *Heliotropium indicum* L. trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l IBA, 1 mg/l BAP và 5 g/l AC tỉ lệ ra hoa đạt đến 85 % [29]. Trong nghiên cứu này, bổ sung vào môi trường 1 g/l AC làm tăng tỉ lệ hình thành nụ hoa và hoa có hình thái đẹp hơn.



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của than hoạt tính lên sự hình thành nụ hoa *T. fournieri in vitro*.

#### Đường sucrose

Sự cảm ứng ra hoa đã tiêu thụ một lượng lớn carbonhydrat và protein [30]. Đường ở nhiều dạng khác nhau là thành phần cần thiết trong hầu hết các hệ thống nuôi cấy mô với vai trò là nguồn cacbon giúp mô, tế bào thực vật tổng hợp nên các hợp chất hữu cơ làm cho tế bào



phân chia và tăng sinh khối [31]. Do đó, đường cũng chính là nguồn cacbon cần thiết cho quá trình cảm ứng và phát triển của hoa [1]. Các nghiên cứu *in vitro* đã chứng minh, môi trường nuôi cấy với mục đích tạo hoa thì hàm lượng đường sucrose cao hơn so với môi trường nuôi cấy để phát triển sinh dưỡng [32]. Vì vậy, để khảo sát vấn đề này chúng tôi tiến hành khảo sát các nồng độ đường sucrose khác nhau lên quá trình cảm ứng sự ra hoa *T. fournieri in vitro*. Số liệu thu được sau 30 ngày nuôi cấy thể hiện sự khác biệt rõ khi sử dụng các nồng độ đường khác nhau. Tỷ lệ chồi hình thành nụ hoa tăng dần khi tăng nồng độ đường và đạt hiệu quả cao nhất ở nồng độ 60 g/l (87,18 %) (bảng 4). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ đường lên 90 g/l thì cây chậm phát triển, lá và thân cây hoá vàng. Điều này có thể giải thích là do khi bổ sung hàm lượng đường vượt mức giới hạn sẽ gây stress cho cây vì ảnh hưởng đến thể thẩm thấu giữa môi trường và tế bào làm cho cây rất khó hút chất dinh dưỡng từ môi trường để nuôi sống cơ thể và cây sẽ bị thiếu dinh dưỡng, lá và thân cây hóa vàng. Ngược lại, đường bổ sung ở nồng độ thấp (15 g/l) thì sự ra hoa không xảy ra (bảng 4). Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Nguyễn Hồng Vũ và cộng sự (2006) trên đối tượng hoa Hồng hybrid tea cv. “Frist Prize” khi tăng hàm lượng đường sucrose từ 15 g/l lên 45 g/l thì tỷ lệ hình thành hoa tăng lên từ 0,00 - 33,33 % [17]. Đường không chỉ đơn giản làm tăng nhu cầu trao đổi chất mà còn là một tín hiệu trong sự chuyển tiếp ra hoa [3] và nồng độ 60 g/l đường sucrose là tối ưu cho quá trình tạo hoa *in vitro* ở loài *T. fournieri*.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose lên sự hình thành nụ hoa *T. fournieri in vitro*.

| Nồng độ đường (g/l) | Tỷ lệ chồi hình thành nụ hoa (%) | Số nụ/chồi | Hình thái                                 |
|---------------------|----------------------------------|------------|-------------------------------------------|
| 15                  | 0,00e                            | 0,00e      | Thân mảnh, yếu và sinh trưởng chậm        |
| 30                  | 56,33c                           | 0,60c      | Thân cao, lá xanh và hình thành nụ đơn    |
| 45                  | 61,75b                           | 1,67b      | Thân to, cây thấp, hình thành nụ hoa đôi  |
| 60                  | 87,18a                           | 2,80a      | Thân to, cứng cáp, nụ hoa xuất hiện nhiều |
| 90                  | 27,78d                           | 0,35d      | Cây yếu, lá và thân cây hoá vàng          |

**Ghi chú:** Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy  $P = 0,05$  (Duncan's test).

### 3.3. Ảnh hưởng của ánh sáng lên khả năng biệt hóa từ chồi sinh dưỡng thành chồi sinh sản ở cây *T. fournieri in vitro*

Trong nuôi cấy *in vitro*, nguồn carbon thực vật sử dụng thường ở dạng đường bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy và cây tự quang hợp để sinh tổng hợp nên nguồn carbon [1]. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ bổ sung 30 g/l đường sucrose vào môi trường nhằm mục đích khảo sát ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng và thời gian chiếu sáng lên sự hình thành nụ hoa. Sự sinh trưởng, phát triển của cây *T. fournieri* chịu ảnh hưởng nhiều bởi cảm ứng quang kỳ, khi cường độ chiếu sáng thay đổi  $18 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  và giữ nguyên thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày. Kết quả sau 60 ngày cho thấy, cây *T. fournieri* đặt dưới ánh sáng cường độ thấp ( $18$  và  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), cây phát triển yếu ớt, thân mảnh, rễ phát sinh ít, lá chuyển sang màu trắng hay vàng dần và không có mẫu nào hình thành nụ hoa. Hiện tượng này có thể là do khi đặt cây trong điều kiện thiếu ánh sáng, cây sẽ chuyển sang giai đoạn suy thoái ngay khi sử dụng hết chất dinh dưỡng dự trữ. Khi chồi nuôi cấy đặt dưới cường độ chiếu sáng  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  thì hoàn toàn ngược lại, cây phát triển tốt, lá xanh, sinh nhiều

nhánh, rễ phát triển mạnh, tỉ lệ tạo nụ hoa cao (70,06 %), nụ to và chiều cao chồi đạt (7,97 cm) (bảng 5a).

Bảng 5a. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng lên sự hình thành nụ hoa *T. fournieri* *in vitro*.

| Ánh sáng                                          |                 | Tỉ lệ chồi hình thành nụ hoa (%) | Chiều cao cây (cm) | Hình thái                            |
|---------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Cường độ ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Thời gian (giờ) |                                  |                    |                                      |
| 18                                                | 10              | 0,00b                            | 4,60c              | Thân mảnh, yếu, lá gần như hóa vàng  |
| 25                                                | 10              | 0,00b                            | 5,81b              | Thân mảnh, yếu, lá hóa vàng          |
| 45                                                | 10              | 70,06a                           | 7,97a              | Thân to, cứng cáp, lá xanh, ra nụ to |

**Ghi chú:** Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy  $P = 0,05$  (Duncan's test).

Khi xác định được cường độ chiếu sáng  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  là tốt nhất, thí nghiệm về thời gian chiếu sáng được tiến hành với ba mốc thời gian 6, 10, 14 giờ/ngày. Kết quả thu được cho thấy, thời gian chiếu sáng lên đến 14 giờ/ngày thì chiều cao chồi tăng đáng kể (10,17 cm) nhưng tỉ lệ chồi hình thành nụ hoa giảm (28,57 %) so với chiếu sáng 10 giờ/ngày (70,06 %) sau 60 ngày nuôi cấy (bảng 5b). Trong trường hợp chỉ chiếu sáng 6 giờ, quá trình sinh trưởng sinh dưỡng và sinh trưởng sinh sản đều bị hạn chế và không có mẫu nào hình thành nụ hoa. Kết quả này tương tự với kết quả trong nghiên cứu ra hoa cây *Kinnow mandarin* (*Citrus nobilis* Lour x *C. Deliciosa* Tenora) *in vitro* sự ra hoa có hiệu quả cao nhất khi chiếu sáng 12 giờ (số nụ hoa 31,94 %), trong khi ở chu kì 8 giờ chỉ có 1,38 % [33]. Kết quả này cũng tương tự với quá trình tạo hoa ở cây Cam Washington Navel, nếu kéo dài chu kì sáng lên trên 16 giờ thì không diễn ra sự biệt hóa thành chồi mang hoa [34]. Như vậy, cường độ chiếu sáng  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  trong thời gian 10 giờ/ngày là tốt nhất cho quá trình ra hoa *in vitro* ở *T. fournieri*.

Bảng 5b. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng lên sự hình thành nụ hoa *T. fournieri* *in vitro*.

| Ánh sáng                                          |                 | Tỉ lệ chồi hình thành nụ hoa (%) | Chiều cao cây (cm) | Hình thái                                   |
|---------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
| Cường độ ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Thời gian (giờ) |                                  |                    |                                             |
| 45                                                | 6               | 0,00c                            | 7,20c              | Thân đơn, cây yếu, lá xanh, rễ ít nhất      |
| 45                                                | 10              | 70,06a                           | 7,97b              | Thân to, cứng cáp, nhiều rễ, lá xanh, nụ to |
| 45                                                | 14              | 28,57b                           | 10,17a             | Thân đơn, cao mảnh khảnh, rễ ít và ngắn     |

**Ghi chú:** Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy  $P = 0,05$  (Duncan's test).

### 3.4. Quá trình phát sinh hình thái hoa cây *T. fournieri* *in vitro* và *ex vitro*

Tổng số 198 cây *T. fournieri* đưa ra vườn ươm được trồng trên giá thể đất mùn trong các vỉ xốp 66 lỗ ( $6 \times 11$ ), chế độ tưới 2 lần/ngày vào lúc sáng sớm và chiều mát, tưới dung dịch

dinh dưỡng ( $\frac{1}{4}$ MS) mỗi tuần/lần. Số liệu thu được cho thấy, cây có tỉ lệ sống sót rất cao ( $> 90\%$ ), bộ rễ phát triển mạnh, cây xanh tốt, sinh trưởng, phát triển đồng đều và ít bị nấm bệnh. Những cây trồng trong điều kiện *ex vitro* sau khoảng 40 ngày thì cây bắt đầu hình thành nụ hoa và một số cây đã có sự nở hoa. Tương tự như vậy, các cây được nuôi cấy trong môi trường ra hoa *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy nụ hoa hình thành và sự nở hoa diễn ra sau khoảng 45 ngày nuôi cấy. Kết quả so sánh quá trình phát sinh hình thái giữa cây trồng trong điều kiện *in vitro* và cây trồng trong điều kiện *ex vitro* không có sự khác biệt đáng kể về hình thái lá, thân và màu sắc hoa (hình 1a, d, e). Đặc biệt, hình dạng cánh hoa, nhị và nhụy hoa cũng tương đồng so với giống bố mẹ. Như vậy, cây *T. fournieri* ra hoa trong điều kiện *in vitro* hoàn toàn giống với hoa *T. fournieri* được trồng ở điều kiện *ex vitro*.



Hình 1. Sự ra hoa *in vitro* và *ex vitro* ở cây *T. fournieri*. a. ra hoa đồng loạt trong điều kiện *in vitro*; b. hoa *in vitro* trong môi trường không bổ sung AC; c. hoa *in vitro* trong môi trường bổ sung 1 g/l AC; d. cận cảnh hình thái hoa nở trong điều kiện *in vitro*; e. hoa cây *T. fournieri* trồng trong điều kiện *ex vitro*.

#### 4. KẾT LUẬN

Chồi 60 ngày tuổi là nguồn mẫu phù hợp cho sự ra hoa *in vitro*. Môi trường thích hợp cho sự ra hoa là  $\frac{1}{4}$  MS có bổ sung 60 g/l đường sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng với cường độ chiếu sáng  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  và thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày cho tỉ lệ chồi hình thành nụ hoa là 87,18 % và đạt 2,80 nụ/chồi. Sự ra hoa *in vitro* ở loài *T. fournieri* không cần sự có mặt của phytohormone. Hoa nuôi cấy trong hai điều kiện *in vitro* và *ex vitro* cây không có sự khác biệt về hình dạng và màu sắc hoa.

Kết quả này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu cơ bản, cũng như nghiên cứu về lai tạo giống trong điều kiện *in vitro* và ứng dụng quy trình ra hoa *in vitro* vào công tác chọn tạo giống đột biến phóng xạ loài hoa *T. fournieri* trong điều kiện *in vitro* mà không cần chọn lọc đột biến ngoài đồng ruộng.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Scorza R. - *In vitro* flowering, Hort Rev. **4** (1982) 106-128.
2. Koornneef M., Alonso-Blanco C., Blankestijn-De Vries H. M., Hanhart C. J., and Peeters A. J. - Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*, Genetics **148** (1998) 1177-1183.
3. Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A., and Lejeune P. - Physiological signals that induce flowering, Plant Cell **5** (10) (1993) 1147-1155.
4. Raghavan V. and Jacobs W. P. - Studies on the floral histogenesis and physiology of *Perilla* II. Floral induction in cultured apical buds of *P. frutescens*, Amer. J. Bot. **48** (1961) 751-760.
5. Tang A. F., Cappadocia M., and Byrne D. - *In vitro* flowering in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Plant Cell Tiss. Org. Cult. **2** (1983) 199-206.
6. Bodhipadma K. and Leung D. W. M. - *In vitro* fruiting and seed set of *Capsicum annuum* cv. sweet banana, *In vitro* Cell. Dev. Bio. Plant **39** (2003) 536-539.
7. Franklin G., Pius P. K., and Ignacimuthu S. - Factors affecting *in vitro* flowering and fruiting of green tea (*Pisum Sativum* L.), Euphytica **115** (2000a) 65-74.
8. Franklin G., Pius P. K., and Ignacimuthu S. - Differential morphogenetic responses of cotyledonary explants of *Vigna mungo*, Biol. Plantarum **43** (2000b) 157-160.
9. Nitsch C. and Nitsch J. P. - The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of reproductive buds, Planta **72** (1967) 371-384.
10. Bridgen M. P., Hadi M. Z., Spencer-Barreto M. - A laboratory exercise to demonstrate direct and indirect shoot organogenesis from leaves of *Torenia fournieri*, Hort Tech. **4** (1994) 320-322.
11. Katsutomo S., Ryutaro A., Hiroyasu Y., Masahito S., Tomoya N., Takaaki N., and Norihiro O. - Functional divergence within class B MADS-box genes *TfGLO* and *TfDEF* in *Torenia fournieri* Lind, Mol. Genet. Genomics **284** (5) (2010) 399-414.
12. Murashige T. and Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiol. Plant **15** (1962) 473-497.
13. Duncan D. B. - Multiple range and multiple F test, Biometrics **11** (1955) 1-42.
14. Hackett W. P. - *In vitro* flowering: a review, Hortscience **7** (1985) 109-155.
15. Lang A. - Physiology of flower initiation. In Ruthland, ed. Encyclopedia of plant physiology. Springer-Verlag, New York, 1965, pp. 1380-1536.
16. Breton C., Cornu D., Chriqui D., Sauvanet A., Capelli P., Germain E., and Jay-Allemand C. - Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of "Early mature" Walnut trees (*Juglans regia*) that flower *in vitro*, Tree Physiol. **24** (2004) 425-435.
17. Vu N. H., Anh P. H., and Nhut D. T. - The role of sucrose and different cytokinins in the

- in vitro* floral morphogenesis of Rose (hybrid tea) cv. "First Prize", Plant Cell Tiss. Org. Cult. **87** (2006) 315-320.
18. Schulze W., Schulze E. D., Stader J., Heilmeier H., Stitt M., and Mooney H. A. - Growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana* in relation to storage of starch and nitrate in the wild type and in starch-deficient and nitrate-uptake-deficient mutants, Plant Cell Environ. **17** (1994) 795-809.
  19. Boungh-Jun O. and Igor K. - Method for producing flowering orchids *in vitro*, Korea Kumho Petrochemical Co., Ltd., Seoul, Korea **45** (2001) 6, 168, 952.
  20. Koh W. L. and Loh C. S. - Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering in rapid-cycling *Brassica napus*, Plant Cell Rep. **19** (2000) 1177-1183.
  21. Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên - Công nghệ tế bào. NXB Đại học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh, 2003.
  22. Wardell W. L. and Skoog F. - Flower formation in excised tobacco stem segments. Reversible removal of IAA inhibition by RNA base analogues, Plant Physiol. **44** (1969) 1407-1412.
  23. Wardell W. L. and Skoog F. - Flower formation in excised tobacco stem segments, Deoxyribonucleic acid content in stem tissue of vegetative and flowering tobacco plants, Plant Physiol. **52** (1973) 215-220.
  24. Finkelstein R. R. and Zeevaart J. A. D. - Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. In Meyerowitz E. M., Somerville C. R., eds. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor, New York, 1994, pp. 523-553.
  25. Ben-Nissan G., Lee J. Y., Borohov A., and Weiss D. - GIP *Petunia hybrida* GA-induced cysteine rich protein: A possible role in shoot elongation and transition to flowering, The Plant J. **37** (2) (2004) 229-238.
  26. Pharis R. P. and King R. W. - Gibberellins and reproductive development in seed plant, Ann. Rev. Plant Physiol. **36** (1985) 517-568.
  27. Chaari - Rkhis A., Maalej M., Ouled Messaoud S., and Drira N. - *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA<sub>3</sub> treatment, Afr. J. Biotechnol. **22** (5) (2006) 2097-2302.
  28. Pan M. J. and Van-Staden J. - The use of charcoal in *in vitro* culture: review, Plant Growth Regulation **26** (1998) 155-163.
  29. Asha N. B. and Jayaraj M. - *In vitro* flowering of *Heliotropium indicum* L. - An important medicinal herb, Asian J. Exp. Biol. Sci. **2** (1) (2011) 90-95.
  30. Dietz F. and Held T. - Starch reserves in the apple tree and their correlative connection to reproductive and vegetative performance with the cultivar Boshoop as an example, Erwerbsobstbau **16** (1974) 117-119.
  31. William L. E., Lemoine R., and Sauer N. - Sugar transporters in higher plants diversity of roles and complex regulation, Trends Plant Sci. **5** (2000) 283-290.
  32. Dickens C. W. S. and Van Staden J. - The induction and evocation of flowering *in vitro*, South Afric. J. Bot. **54** (1988) 325-344.
  33. Singh B., Sharma S., Rani G., Virk G. S., Zaidi A. A., and Nagpal A. - *In vitro* flowering in embryogenic cultures of *Kinnow Mandarin*, Afr. J. Biotech. **5** (16) (2006) 1470-1474.
  34. Lenz F. - Effects of day length and temperature on the vegetative and reproductive growth of Washington Navel orange, Proc. First Inter. Citrus Symp. **1** (1969) 333-338.

## ABSTRACT

### AFFECTS OF SOME FACTORS ON *IN VITRO* FLOWERING OF TORENIA (*TORENIA FOURNIERI* L.)

Duong Tan Nhut\*, Le Van Thuc, Tran Trong Tuan, Truong Thi Dieu Hien,  
Hoang Xuan Chien, Nguyen Phuc Huy, Nguyen Ba Nam, Vu Quoc Luan

Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

\*Email: duongtannhut@gmail.com

Transformation from vegetative to reproductive stage (flowering stage) depends on a lot of elements: physical and chemical elements, age of explant source, and plant growth regulators. In this study, we examined some elements that affect to differentiating ability of *in vitro* *Torenia fournieri* L. flower shoot. Results showed that the older the shoots were, the higher the percentage of flowering shoot formation would be. 60-day-old shoots gave the highest percentage of flowering shoot formation (65 %) after 30 day culture. Moreover, the amount of macronutrients and micronutrients, sucrose concentration, growth regulators, activated charcoal and lighting conditions affect significantly the flowering ability. Shoots cultured on plant growth regulator free  $\frac{1}{4}$  MS media supplemented with 60 g.l<sup>-1</sup> sucrose and 1 g.l<sup>-1</sup> activated charcoal under a 10 h light (45  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )/14 h dark photoperiod resulted in the best flowering shoot formation of *T. fournieri* shoots cultured *in vitro* (87.18 %, 2.80 flower buds/explant). *In vitro* flowers and the *ex vitro* ones have no significant difference in their morphology and color.

**Keywords:** *in vitro* flowering, phytohormone, reproductive stage, *Torenia fournieri* L., vegetative stage.