

BÀI TỔNG QUAN

MỘT SỐ NHÂN TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH RA HOA *IN VITRO*

Dương Tấn Nhựt, Trần Trọng Tuấn, Trần Thanh Vân K

Viện Sinh học Tây Nguyên

TÓM TẮT

Giai đoạn phát triển hoa hay quá trình ra hoa là một trong những giai đoạn có tính quyết định trong sự phát triển và hoàn thiện quy trình sống và sinh sản của thực vật. Quá trình chuyển đổi từ giai đoạn phát triển sinh dưỡng sang giai đoạn ra hoa, bên cạnh yếu tố về độ tuổi thì thực vật còn bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố khác như quang kỳ, nhiệt độ, dinh dưỡng... Nhưng những nghiên cứu trong điều kiện tự nhiên thì không thể giải thích đầy đủ những vấn đề sinh lý, sinh hóa phức tạp liên quan đến quá trình ra hoa. Môi trường *in vitro* là môi trường lý tưởng để thực hiện những nghiên cứu sâu hơn về quá trình ra hoa, vì có thể chủ động điều chỉnh các yếu tố vật lý (cường độ ánh sáng, quang kỳ, độ ẩm, nhiệt độ...), các yếu tố hóa học (đường, chất khoáng, vitamin...) và nhất là chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Trong bài tổng quan này, chúng tôi đề cập đến các nhân tố ảnh hưởng đến quá trình ra hoa, các con đường ra hoa cơ bản và một số gen liên quan đến sự ra hoa. Từ năm 2002 đến nay, phòng Sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng Viện Sinh học Tây Nguyên cũng đã nghiên cứu thành công sự ra hoa *in vitro* ở một số loài như cây Torenia (*Torenia founieri* L.), cây Thuốc lá (*Nicotiana tobacum*), cây hoa Đồng tiền (*Gerbera*), cây hoa Hồng (Hybrid tea cv "First Prize"), cây hoa Salem (*Limonium*) và Lan *Dendrobium* Mild Yumi. Những kết quả nghiên cứu này nhằm hướng tới việc nghiên cứu sâu hơn các hiện tượng sinh lý của quá trình ra hoa và phục vụ cho sản xuất hoa *in vitro* thương mại ở nhiều loài thực vật khác nhau.

Từ khóa: con đường ra hoa, giai đoạn sinh dưỡng, giai đoạn sinh sản, mô phân sinh, ra hoa *in vitro*

KHÁI QUÁT VỀ QUÁ TRÌNH RA HOA

Ra hoa là bước chuyển hóa quan trọng trong đời sống thực vật. Quá trình này bao gồm sự cảm ứng, sự phát triển hoa và các cơ quan của chúng. Những quá trình này đã được nghiên cứu và thực hiện trên nhiều loại thực vật trong ống nghiệm. Sự tiến bộ trong công nghệ tế bào và kỹ thuật nuôi cấy mô đã cung cấp một hệ thống nuôi cấy thuận tiện cho việc nghiên cứu về sinh lý và sinh học phân tử của ngành thực vật học bao gồm sự ra hoa.

Năm 1943 đã đánh dấu một bước ngoặt quan trọng trong lịch sử ngành thực vật học khi White nuôi cấy thành công rễ cây Cà chua trong ống nghiệm. Thành công này đã mở ra cho ngành thực vật học một con đường rộng lớn và mới mẻ với biết bao điều lý thú để khám phá, tìm tòi và nghiên cứu. Nói cách khác, giờ đây các nhà khoa học đã có thêm một công cụ hỗ trợ đắc lực trong nghiên cứu giúp họ có những bước tiến sâu hơn, gần hơn để nhìn rõ hơn về thế giới thực vật. Từ đó trở đi, các nghiên cứu về kỹ thuật nuôi cấy mô ngày càng nhiều, điều này đã làm cho kỹ thuật này có những bước phát triển vượt bậc, đáp ứng được những nhu cầu ngày càng cao. Sự phát hiện các chất điều hòa sinh trưởng thực vật cũng được xem là một

thành công lớn, nó đã chấp cánh cho ngành nuôi cấy mô có những bước phát triển đáng kể. Đến nay, ngành nuôi cấy mô thực vật đã khẳng định vai trò quan trọng của mình bằng một kho tàng đồ sộ các công trình nghiên cứu về thực vật. Kỹ thuật nuôi cấy mô không những đáp ứng được nhu cầu ngày càng lớn về số lượng, chất lượng giống cây trồng mà còn là một hệ thống lý tưởng, một công cụ hiệu quả cho các nghiên cứu sâu hơn ở mức tế bào và những cơ chế phát sinh hình thái phức tạp.

Trong các nghiên cứu về thực vật thì việc nghiên cứu về sinh lý được xem là rất quan trọng với mục đích trả lời những câu hỏi tại sao, khi nào, và như thế nào mà thực vật lại như thế? Khi các nhà khoa học nghiên cứu, tìm tòi câu trả lời cho những câu hỏi này chính là đi tìm những nguyên lý, cơ chế của tự nhiên. Điều này rất có ý nghĩa, vì khi nắm vững được những nguyên lý, cơ chế này chúng ta sẽ có sự lựa chọn phù hợp khi tác động vào thực vật với những mục đích xác định. Hệ thống nuôi cấy mô một lần nữa tỏ ra là một công cụ hữu ích, hỗ trợ đắc lực cho các nhà khoa học nghiên cứu về sinh lý thực vật trên con đường chinh phục những bí ẩn của tự nhiên. Một trong những bí ẩn đã tồn tại rất lâu và luôn lôi cuốn sự tò mò của các nhà khoa học đó là "cơ chế của sự

ra hoa ở thực vật". Kỹ thuật nuôi cấy mô đối với sự ra hoa *in vitro* là một công cụ quan trọng để thực hiện các mục tiêu này. Ưu điểm của việc nghiên cứu ra hoa *in vitro* là có thể nuôi cấy được các cơ quan riêng biệt của thực vật và sử dụng các mô đó đặt

dưới điều kiện tác động của các yếu tố kích thích ra hoa, tránh được sự tác động của các chất được sản sinh *in vivo* từ lá và rễ (Nitsch, 1972; Ziv, Altman, 2003). Do vậy, chúng ta sẽ có những kết luận chính xác hơn về cơ chế ra hoa của thực vật.

Bảng 1. Các đối tượng được sử dụng để nghiên cứu sự ra hoa *in vitro*.

Loài	Tác giả
<i>Nicotiana rustica</i>	Steinberg, 1953
<i>Helianthus annuus</i>	Henrickson, 1954
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Langridge, 1955
<i>Lemna pepusilla</i>	Hillman, 1959
<i>Pharbitis nil</i>	Takimoto, 1960
<i>Penilla</i>	Chailakhyan, 1959
<i>Cuscuta reflexa</i> Robx	Baldev, 1962
<i>Utricularia exoleta</i>	Pringsheim, Pringsheim, 1962
<i>Wolffia microscopica</i>	Maheshwan, Venkataraman, 1966
<i>Nicotiana glauca</i> x <i>Langsdorffii</i>	Aghion-Prat, 1965
<i>Lunaria annua</i>	Pienk, 1965; 1967
<i>Plumbago indica</i>	Nitsch, Nitsch, 1967
<i>Fuchsia</i>	Sachs <i>et al.</i> , 1967
<i>Bryophyllum</i>	Chailakhyan <i>et al.</i> , 1968
<i>Xanthium strumarium</i>	Salisbury, 1969
<i>Nicotiana tabacum</i>	Wardell, Skoog, 1973; Tran Thanh Van, 1973a; van den Ende <i>et al.</i> , 1984; Kaur-Sawhney <i>et al.</i> , 1990
<i>Nautilocalyx lynchii</i>	Tran Thanh Van, 1973b
<i>Torenia foemien</i>	Chiyah, Tran Thanh Van, 1971
<i>Xanthium pensylvanicum</i>	Jacobs, Suthers, 1971
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nitsch, 1972
<i>Salpiglossis sinuata</i>	Hughes <i>et al.</i> , 1973
<i>Passiflora suberosa</i>	Scorza, Janick, 1980
<i>Chenopodium rubrum</i>	Lozhnikova <i>et al.</i> , 1981
<i>Bougainvillea glabra</i>	Chaturvedi, Sharma, 1977
<i>Thuja plicata</i>	Coleman, Thorpe, 1978
<i>Lemna paucicostata</i>	Khurana, Maheshwan, 1978
<i>Vitis vinifera</i>	Srinivasan, Mullins, 1978
<i>Allium sativum</i>	Tizio, 1979
<i>Nicotiana rustica</i>	Gill <i>et al.</i> , 1979
<i>Panax ginseng</i>	Chang, Hsing, 1980; Tang, 2000
<i>Petunia hybrida</i>	Mullin, Tran Thanh Van, 1989
<i>Brassica napus</i>	Polowick, Sawhney, 1991; Koh, Loh, 2000
<i>Bambusa vulgaris</i> , <i>Dendrocalamus giganteus</i> và <i>Dendrocalamus strictus</i>	Rout, Das, 1994
<i>Dianthus caryophyllus</i>	Daksha <i>et al.</i> , 1994
<i>Citrus unshiu</i>	Garcia-Luís, Kander, 1995

<i>Phalaenopsis</i> Pink Leopard 'Petra'	Duan, Yazawa, 1995
<i>Fortunella hindsii</i>	Jumin, Nito, 1996
<i>Bambusa arundinacea</i>	Nadgauda <i>et al.</i> , 1997
<i>Ceropegia</i> spp.	Patil, 1998
<i>Cichorium intybus</i>	Demeulemeester, De Proft, 1999; Bais <i>et al.</i> , 2001
<i>Chamomilla recutita</i>	Kintzios, Michaelakis, 1999
<i>Cymbidium nivo-marginatum</i> Mak	Kostenyuk <i>et al.</i> , 1999
<i>Murraya paniculata</i>	Jumin, Ahmad, 1999
<i>Gentiana triflora</i> Pall. var. <i>axillatiflora</i>	Zhang, Leong, 2000
<i>Orychophragmus violaceus</i>	Luo, <i>et al.</i> , 2000
<i>Phyllanthus carolinensis</i>	Catapan <i>et al.</i> , 2000
<i>Vigna mungo</i> cv. VBN1	Franklin <i>et al.</i> , 2000
<i>Pisum sativum</i>	Franklin <i>et al.</i> , 2000
<i>Fagopyrum esculentum</i>	Kachonpadungkitti <i>et al.</i> , 2001
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Dielen <i>et al.</i> , 2001
<i>Melia azedarach</i>	Handro, Floh, 2001
<i>Momordica charantia</i>	Wang <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptocarpus nobilis</i>	Floh, Handro, 2001
<i>Ammi majus</i>	Pande <i>et al.</i> , 2002
Rose	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>Bambusa edulis</i>	Lin <i>et al.</i> , 2003b
<i>Capsicum annuum</i>	Bodhipadma, Leung, 2003
Cork oak	Mulin, Pais, 2003
<i>Cymbidium ensifolium</i> var. <i>misericors</i>	Chang, Chang, 2003
<i>Kniphofia leucocephala</i> Baijnath	McCarten, Van Staden, 2003
<i>Zantedeschia</i> spp., colored cultivars	Naor <i>et al.</i> , 2004
<i>Kniphofia leucocephala</i>	Taylor <i>et al.</i> , 2005
Kinnow mandarin (<i>Citrus nobilis</i> Lour × <i>C. deliciosa</i> Tenora)	Singh <i>et al.</i> , 2006
Rose (Hybrid tea cv "First Prize")	Vu <i>et al.</i> , 2006
<i>Spathiphyllum</i>	Dewir <i>et al.</i> , 2007
<i>Brassica campestris</i> (L.) Var Bhavani	Verma, Singh, 2007
<i>Dendrobium</i> Chao Praya Smile	Hee <i>et al.</i> , 2007
<i>Pentanema indicum</i> Ling	Sivanesan, Jeong, 2007
<i>Dendrobium</i> Madame Thong-In	Sim <i>et al.</i> , 2007
<i>Capsicum frutescens</i>	Sharma <i>et al.</i> , 2008
<i>Vigna aconitifolia</i>	Saxena <i>et al.</i> , 2008
<i>Dendrobium</i> Sonia 17	Tee <i>et al.</i> , 2008
<i>Saposhnikovia divaricata</i>	Qiao <i>et al.</i> , 2009

Để nghiên cứu sự ra hoa, các chồi sinh sản hay sinh dưỡng riêng biệt được nuôi cấy trên các môi trường có sự kết hợp giữa các chất hữu cơ, vô cơ và hàm lượng các chất điều hoà sinh trưởng khác nhau. Mục đích của việc nghiên cứu này là cảm ứng và điều khiển quá trình ra hoa của thực vật. Các nghiên

cứu này được thực hiện trên nhiều loài thực vật có các đặc tính sinh học khác nhau như nhu cầu về quang hợp, nhiệt độ... và các mẫu cấy được sử dụng ở nhiều giai đoạn sinh lý khác nhau. Hơn nữa, kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL) cũng đã được sử dụng để nghiên cứu sự ra hoa trong ống nghiệm

(Tran Thanh Van, 1999). Tuy nhiên sự ra hoa *in vitro* không phải là hiện tượng phổ biến, nó có thể xuất hiện một cách tự nhiên hay có sự điều khiển ở một số loài thân thảo và cây có chồi dưới (geophyte) (Dickens, Van Staden, 1988; Rastogi, Sawheny, 1989; Teixeira da Silva, 2003). Sự ra hoa *in vitro* có thể được xem là một công cụ cho việc nghiên cứu sự cảm ứng, phát triển của hoa, điều khiển chương trình sinh sản ở một số loài thực vật có chu trình sống dài và những loài thực vật chồi dưới (Lin *et al.*, 2003b). Một ứng dụng khác của sự ra hoa *in vitro* là sản xuất các hợp chất thứ cấp như ở loài Nghệ tây (*Crocus*). Ở loài này sự ra hoa *in vitro* là một thuận lợi cho việc sản xuất thương mại đầu nhụy với phức hợp thơm và chất màu (Sano, Himeno, 1987; Plessner, Ziv, 1999). Nhìn chung, các nghiên cứu về sự ra hoa *in vitro* thường được tiến hành theo một trong ba hướng sau (Scorza, 1982): a) Nuôi cấy thực vật hoàn chỉnh (cây *in vitro* có đầy đủ rễ, thân, lá); b) Nuôi cấy mô dạng chồi và cụm chồi; c) Nuôi cấy các bộ phận chưa có đỉnh sinh trưởng (mô sẹo, mô lá, rễ, cơ quan hoa,...).

Đặc điểm của quá trình chuyển đổi từ giai đoạn sinh trưởng sang giai đoạn sinh sản

Thực vật có 2 giai đoạn cơ bản trong suốt chu trình sống: giai đoạn phát triển sinh dưỡng và giai đoạn sinh sản (ra hoa và tạo hạt). Những gene điều khiển sự phát triển của thực vật được điều chỉnh bởi sự tương tác tế bào và sự thay đổi vị trí thông tin, những điều này đã góp phần vào cơ chế tự tổ chức và sắp xếp của tế bào trong quá trình phát triển của nó. Quá trình phát triển sinh dưỡng của thực vật phát triển từ mô phân sinh chồi đỉnh (SAM - shoot apical meristem). Do đó, SAM là trọng tâm của nhiều nghiên cứu nhằm mục đích tìm hiểu các quá trình liên quan đến sự ra hoa của thực vật (Medford, 1992; Fleming *et al.*, 1993).

Định nghĩa về mô phân sinh chồi đỉnh (SAM) đã được phát hiện từ khi được nhận biết lần đầu tiên về nguồn gốc của chồi bởi Kaspar Wolff vào năm 1979 (Cutter, 1965). Thực vật duy trì giai đoạn phát triển sinh dưỡng của nó đến khi mô phân sinh đỉnh trải qua một quá trình thay đổi. Trên thực tế, sự thay đổi tinh đồng nhất của mô phân sinh từ mô phân sinh sinh dưỡng đến mô phân sinh hoa, được điều khiển bởi môi trường và tín hiệu nội sinh (Bernier, 1988; McDaniel *et al.*, 1992). Sự ra hoa chỉ xuất hiện khi các chồi hoa hình thành đầy đủ ở điều kiện môi trường thích hợp. Quá trình ra hoa bao gồm sự phát triển của tế bào và mô trong những phần khác nhau của hoa. Vấn đề cơ bản của sự ra hoa ở thực vật bao

gồm 2 nhóm: 1) nhóm xác định: sự chuyển hóa ra hoa chấm dứt giai đoạn phát triển sinh dưỡng và mô phân sinh cụm hoa (inflorescence meristem) chuyển thành mô phân sinh hoa (floral meristem) và hình thành cuống hoa, 2) nhóm chưa xác định: ở một số loài (*Arabidopsis*), mô phân sinh cụm hoa phát triển thành những nhánh hoàn chỉnh, trong nhiều nhánh thì mô phân sinh cụm hoa chuyển thành mô phân sinh hoa để hình thành hoa, trong khi đó một số mô phân sinh cụm hoa vẫn tiếp tục phát triển sinh dưỡng.

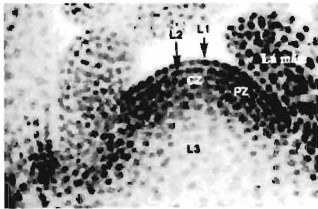
Mô phân sinh hoa trải qua một chuỗi các sự thay đổi phát triển để tạo thành 4 cấu trúc cơ bản của hoa. Mỗi cấu trúc này bắt nguồn tuần tự từ vòng tròn đồng tâm (vòng tròn này phát triển từ mô phân sinh hoa). Quá trình phát triển hoa liên quan đến những đặc điểm nhất định của mô phân sinh hoa, điều này đã tạo nên 4 dạng cơ quan hoa riêng biệt như là lá noãn (chứa tế bào trứng), nhị hoa (chứa hạt phấn), cánh hoa và đài hoa. Quá trình ra hoa đại diện cho sự thay đổi cơ bản từ phát triển sinh dưỡng sang phát triển sinh sản và phát triển trên cuống hoa. Các cơ chế điều khiển thời gian ra hoa bước đầu đã được nghiên cứu rộng rãi ở *Arabidopsis* bằng việc xác định các đột biến bao gồm đột biến ra hoa sớm hay trễ hơn so với giống ban đầu nhưng vẫn khỏe mạnh (Koorneef *et al.*, 1998a). Về khía cạnh gen, có 2 sự thay đổi liên quan đến gen là sự chuyển đổi từ giai đoạn phát triển sinh dưỡng sang giai đoạn phát triển sinh sản đã được chương trình hóa trong thực vật. Sự thay đổi đầu tiên liên quan đến sự chuyển đổi từ giai đoạn sinh dưỡng sang giai đoạn ra hoa. Nếu sự thay đổi này xảy ra không phù hợp thì quá trình ra hoa không xảy ra. Sự thay đổi liên quan đến gen là theo con đường quy định chung của thực vật trong việc hình thành hoa.

Sự phát triển hoa được xem là sự khởi đầu chương trình sinh sản hữu tính ở thực vật tức là sự tái tổ chức mô phân sinh ngọn chồi đỉnh dưỡng bất định thành mô phân sinh hoa hạn định khi cây đạt được trạng thái trưởng thành ra hoa. Trạng thái này có thể đến sớm hoặc trễ hơn tùy loài thực vật và điều kiện môi trường như ánh sáng, nhiệt độ... Mô phân sinh chồi ngọn chứa một đám tế bào có đặc tính của mô phân sinh thân, sự phân chia tế bào dùng để bổ sung một cách liên tục cho mô phân sinh và cung cấp các tế bào để biệt hóa thành mô hoặc cơ quan. Hoạt động của nó lặp đi lặp lại tạo ra các cơ quan bên như lá, chồi nách, đốt. Theo cách phân chia thông thường, mô phân sinh ngọn gồm ba vùng hay ba lớp chính (Bodson, Outlaw, 1985):

(1) Vùng đỉnh được tạo bởi các tế bào lớn, không bào lớn, ít rRNA trong tế bào chất và có chu kỳ tế bào rất dài, hoạt tính phân chia thấp, tế bào chủ yếu ở pha G1. Đó là vùng mô phân sinh chồi, vì nó chỉ hoạt động khi mô phân sinh ngon chuyển sang trạng thái sinh sản.

(2) Vùng bên gồm các tế bào nhỏ hơn, không bào nhỏ, giàu RRNA trong tế bào chất, có hoạt tính phân chia cao và chu kỳ tế bào ngắn, vùng bên thường được gọi là vùng khởi sinh hay vùng phát sinh cơ quan, nơi từng các lá hay các mô của thân bao gồm các mô dẫn.

(3) Vùng lõi (mô phân sinh lõi) nằm dưới vùng đỉnh, được tạo bởi các tế bào chồng lên nhau. Các tế bào kéo dài và không bào to. Hàm lượng tRNA trung bình, hoạt tính phân chia và chu kỳ tế bào nổi chung có những đặc tính trung gian so với vùng đỉnh và vùng bên.



Hình 1. Mô phân sinh chồi đỉnh của *Arabidopsis*. Vùng mô phân sinh chồi đỉnh bắt màu iodine mô tả cấu trúc tế bào (các lớp L1, L2 và L3, cũng như là vùng trung tâm (CZ) và vùng ngoại biên (PZ), với lá mầm nhỏ lên bên hông mô phân sinh).

Mô phân sinh chồi đỉnh khi đã đạt đến một trạng thái nhất định nó sẽ biến đổi từ chồi sinh dưỡng sang chồi sinh dục, hay còn gọi là sự ra hoa.

Sự ra hoa gồm 3 giai đoạn chính: sự chuyển tiếp ra hoa, sự tượng hoa và cuối cùng là sự tăng trưởng và nở hoa.

Phải trải qua nhiều con đường phát triển mà sau đó hoa mới được hình thành trong ống nghiệm. Điều này đã giúp cho các nhà khoa học có những góc nhìn đa dạng từ mức độ tế bào đến toàn bộ cơ thể thực vật. Mỗi loại thí nghiệm đều đem lại những hiểu biết mới giúp một lần nữa khẳng định chính xác các kết quả nghiên cứu về sự ra hoa ngoài tự nhiên hoặc

cung cấp cho chúng ta những cái nhìn mới về hiện tượng này. Những nghiên cứu về sự ra hoa *in vitro* thường khảo sát các tác nhân ảnh hưởng đến sự hình thành hoa như độ tuổi, chất điều hòa sinh trưởng thực vật, ánh sáng, nhiệt độ, carbohydrate, chất cảm ứng và chất ức chế tạo hoa, khuynh độ ra hoa, thọ hạn và sự phát sinh hình thái của hoa. Sau đây, chúng ta có thể khái quát lại những kết quả từ những nghiên cứu ra hoa *in vitro* đã được thực hiện, nhờ đó chúng ta hiểu biết sâu hơn về sự ra hoa của thực vật.

MỘT SỐ NHÂN TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH RA HOA

Những tín hiệu từ môi trường và những nhân tố nội sinh như là độ tuổi, các hormone nội sinh và hàm lượng chất dinh dưỡng tạo nên các con đường chuyển đổi tình trạng từ mô phân sinh chồi đỉnh ban đầu chuyển sang mô phân sinh hoa. Trong một điều kiện môi trường nào đó, ở một số loài, quá trình ra hoa xuất hiện trước những chồi lá (Pouteau *et al.*, 1997). Những kỹ thuật ghép cành cổ điển, được thực hiện bởi Zevevaart (1958) trong 4 thập niên trước, đã cho thấy sự cảm ứng ra hoa liên quan đến sự dẫn truyền các tín hiệu. Tuy nhiên, sự cố gắng xác định các biểu hiện hóa sinh tự nhiên của những nhân tố cảm ứng ra hoa đã không thành công. Ở một số loài, thời gian ra hoa bị ảnh hưởng chủ yếu bởi các nhân tố môi trường, theo mùa và/hoặc điều kiện phát triển có lợi cho quá trình sinh sản và sự chín hạt. Những nhân tố này bao gồm quang kỳ, chất lượng ánh sáng (thành phần quang phổ), cường độ ánh sáng, sự thọ hạn, hàm lượng dinh dưỡng và nước. Những loài ít nhạy cảm với sự thay đổi của môi trường, ra hoa là để đáp ứng các tín hiệu nội sinh như độ tuổi của cây hay kích thước, số lượng lông cây. Sự ra hoa cũng có thể được cảm ứng bởi stress môi trường như là thiếu dinh dưỡng, sự khô hạn và mật độ quá dày. Những phản ứng này làm cho thực vật tạo hạt nhằm sinh tồn và duy trì nòi giống hơn là đáp ứng lại các tín hiệu nội sinh (Levy, Dean, 1998). Có nhiều loại gen đã được xác định có khả năng kiểm soát cơ quan ra hoa và phát triển của chúng (Weigel *et al.*, 1992; Mizukami, Ma, 1997). Sự biểu hiện những loại gen này bị ảnh hưởng bởi quang kỳ và các hormone (Okamoto *et al.*, 1996).

Quá trình ra hoa trong ống nghiệm là một hiện tượng hiếm thấy trong nuôi cấy mô thực vật. Tuy nhiên, quá trình này đã được nghiên cứu thành công ở nhiều loại thực vật khác nhau như *Orychophragmus violaceus* (Luo *et al.*, 2000),

Gentiana (Zhang, Leong, 2000), *Brassica napus* (Koh, Loh, 2000) và *Chamomile recutita* L. (Kintzios, Michaelakis, 1999). Tùy vào từng mục đích khác nhau mà sử dụng các nhân tố kích thích ra hoa khác nhau ở các loài thực vật khác nhau, đặc biệt cytokinin như là BA, zeatin (ZEA) và kinetin (KIN), những chất này có thể được sử dụng riêng lẻ hay kết hợp với phytohormone khác.

Sự ra hoa *in vitro* đã tăng lên đáng kể khi trong môi trường có bổ sung cytokinin (Scorza, Janick, 1980; van den Ende *et al.*, 1984; Nadgauda *et al.*, 1990), đường (Scorza, 1982), những chất tương đồng với RNA (RNA base analogs) (Wardell, Skoog, 1969b), auxin (Tran Thanh Van, 1973a; van den Ende *et al.*, 1984), thọ hàn *in vitro* (Dickens, Van Staden, 1990; Al-Khayri *et al.*, 1992), hàm lượng nitrogen (Wada, Totsuka, 1982) và nồng độ ion (Cousson, Tran Thanh Van, 1992). Sự ra hoa giảm đi khi vị trí ra hoa gần với ngọn, và ngược lại (Scorza, Janick, 1980; McDaniel *et al.*, 1989), có lẽ do sự biến thiên các chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong thân. Sự chênh lệch ra hoa có thể do: 1) sự thay đổi khả năng của tế bào hay lớp mỏng tế bào (Tran Thanh Van, 1973b; Compton, Veilleux, 1992) - dễ đi vào vị trí sinh sản trong quá trình phát sinh cá thể (ontogeny); 2) sự thay đổi khả năng của tế bào để phản ứng với những nhân tố kích thích ra hoa; 3) sự chênh lệch của các nhân tố ức chế và thúc đẩy trong khoảng thời gian cắt mẫu, hay sự chênh lệch của các chất thúc đẩy và ức chế kết hợp (Scorza, Janick, 1980). Sự ra hoa giảm đi ở các loài cây ngắn ngày có thể là do việc giảm đi các tế bào thành thực cho quá trình phát sinh hình thái hoa mới (Rajceevan, Lang, 1987). Những nguồn mẫu trưởng thành thường là điều kiện tiên quyết cho sự ra hoa *in vitro* và nguồn mẫu non không cho phép ra hoa do không có khả năng tạo nên các nhân tố kích thích ra hoa hay sự bất lực của mô phân sinh trong việc đáp ứng lại các nhân tố kích thích ra hoa (Hackett, 1985).

Dưới điều kiện tự nhiên, hoa tiếp xúc với các tác nhân kích thích như là sự tăng lên từ từ của không khí, nhiệt độ, cường độ ánh sáng và cũng như độ ẩm. Nhưng các điều kiện này thường là cố định và được điều khiển dưới điều kiện *in vitro*. Sự ra hoa là quá trình phức tạp bao gồm một chuỗi các thời gian và không gian như là sự kết hợp các nhân tố môi trường (quang kỳ hay thọ hàn), sự phát triển của cây (độ tuổi của thực vật), hormon (chất điều hòa sinh trưởng thực vật, florigen và anti-florigen), các gen thúc đẩy (hoạt động của *FOIG* và knotted1-like homebox (*KNOX*) gen) và các nhân tố khác dẫn tới

quá trình chuyển từ giai đoạn sinh dưỡng sang giai đoạn sinh sản, dù nó xảy ra ở ngoài tự nhiên hay là bằng hệ thống nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Teixeira da Silva, Nhut, 2003).

Yu và Goh (2000) đã xác định những gen trong mô phân sinh chồi đỉnh liên kết chặt chẽ với quá trình chuyển đổi từ pha sinh dưỡng sang pha sinh sản thông qua các biểu hiện khác nhau của mRNA. Họ đã xác định 5 dòng gen (ovg 2, ovg 14, ovg 27, ovg 30 và ovg 7) như là những nhân tố phiên mã trong cảm ứng ra hoa. Qua sự biểu hiện của 5 dòng gen này đã cho thấy chúng liên quan trực tiếp đến các quá trình biến dưỡng trong sự ra hoa. Họ khẳng định rằng trong suốt quá trình chuyển đổi ra hoa, những gen này đã mã hóa các enzyme tham gia vào quá trình biến dưỡng, đây chính là đích đến của các nhân tố điều hòa phiên mã hay là các nhân tố kích thích khác. Ví dụ, dòng ovg23 xuất hiện như một chất đồng dạng với enzyme Cu/ZnSOD (copper/zinc super oxide dismutase), nhân tố này được cho rằng có một vai trò quan trọng trong việc phân phát đồng và những chất khử oxy hoạt động (Himelblau *et al.*, 1998). Biểu hiện mạnh của dòng gen ovg23 này trong mô phân sinh chồi sinh dưỡng có thể chỉ là đang stress oxy trước khi chuyển sang giai đoạn ra hoa. Họ đã xác định rằng những quá trình điều hòa phiên mã, phân chia tế bào, hô hấp và những vấn đề biến dưỡng khác có liên quan mật thiết với nhau trong quá trình kích thích ra hoa ở loài Lan.

Độ tuổi

Như chúng ta đã biết, tất cả thực vật hạt kín đều trải qua một giai đoạn sinh trưởng cần thiết trước khi đạt đến trạng thái ra hoa. Khi ở giai đoạn này ngoài tự nhiên, sự ra hoa của thực vật không xảy ra. Quãng thời gian này có thể là vài ngày, vài năm hoặc thậm chí vài thập kỷ (Chailakhyan, 1968). Nguyên nhân cơ bản của hiện tượng không ra hoa khi thực vật còn non vẫn chưa được hiểu một cách rõ ràng. Các điều kiện cần thiết để thực vật có thể chuyển tiếp từ giai đoạn còn non sang giai đoạn trưởng thành có thể là: kích thước tối thiểu, độ tuổi, diện tích lá (ảnh hưởng đến khả năng quang hợp), tỷ lệ C/N, phytohormone, số lần tối thiểu của chu kỳ nguyên phân đối với các cây thân gỗ lâu năm và khoảng cách giữa đỉnh sinh trưởng và rễ.

Tính non ở thực vật được giả thuyết là một hiện tượng được qui định trên toàn bộ cơ thể thực vật, nói cách khác là toàn bộ các cơ quan này đều chưa có khả năng tạo nên sự ra hoa hoặc các đỉnh sinh trưởng không có khả năng đáp ứng với các tác nhân ra hoa

(Lang, 1965). Pierik (1965, 1967) đã nhận thấy rằng các mẫu cây được làm lạnh phần cuống của cây *Lunaria annua* ra hoa, trong khi đó những chồi đã có đỉnh sinh trưởng được làm lạnh lại không có hiện tượng này. Do vậy, ông cho rằng tính non của thực vật được qui định ở vùng đỉnh sinh trưởng và nó không hoàn toàn nằm trên toàn bộ cơ thể thực vật. Ông hoàn toàn thấy sự thay đổi cấu trúc chồi trong giai đoạn làm lạnh thì cần thiết cho sự ra hoa của *Lunaria annua*. Từ đó, ông đưa ra giả thuyết rằng có sự tác động qua lại giữa tính "non" của thực vật và việc "thụ nhân" của môi trường, trong đó sự non được qui định bởi đỉnh sinh trưởng của một số loài có giai đoạn non không nhạy cảm với nhiệt độ lạnh, nhưng sau đó, khi thực vật bắt đầu trưởng thành thì sự hiện diện của đỉnh sinh trưởng là cần thiết cho việc cảm nhận sự kích thích ở nhiệt độ lạnh (ví dụ như *L. annua*).

Mặt khác, ở một số loài thực vật, tính "non" là một hiện tượng phổ biến trên toàn bộ các cơ quan của thực vật, chúng thường là các loài không có giai đoạn non nhất định nhưng phụ thuộc chặt chẽ vào sự làm lạnh để đạt được trạng thái ra hoa (ví dụ như *C. intybus*). Giả thuyết này càng được khẳng định thêm qua một loạt các thí nghiệm *in vitro*, những mẫu cây không có đỉnh sinh trưởng lấy từ các cây *Nicotiana tabacum* và *P. suberosa* còn non, cả 2 loài này đều không đòi hỏi sự làm lạnh, đều chỉ tái sinh các cây ở trạng thái sinh dưỡng, điều này càng khẳng định thêm rằng tính "non" trong các loại cây này được quy định bởi toàn bộ cơ quan trên cơ thể thực vật (Scorza, Janick, 1980).

Tuy nhiên, trong vài trường hợp, giai đoạn non của thực vật có thể được rút ngắn thông qua nuôi cấy *in vitro*. Năm 1980, Chang và Hsing đã nghiên cứu sự tạo phôi từ các mô sẹo rễ của cây Sâm (*Panax ginseng*). Trong đó có sự hình thành hoa hữu thụ từ phôi chỉ trong vòng một tháng cấy chuyển trong môi trường có GA₃, điều này đã làm giảm bớt đáng kể thời gian "non" của cây Sâm ngoài tự nhiên là ba năm. Trong trường hợp thí nghiệm ra hoa từ lát cắt dọc của vùng thân và đỉnh chồi của cây Sồi (Mulin *et al.*, 2003) trong ống nghiệm lại cho kết quả ngược lại: mẫu cây càng non thì thời gian cần thiết để kích thích ra hoa càng ngắn.

Carbohydrate

Là nguồn năng lượng dự trữ, carbohydrate rất cần thiết cho sự phát triển của cơ quan hoa. Sự cảm ứng ra hoa tiêu thụ một lượng lớn carbohydrate và protein (Dietz, Held, 1974). Tuy nhiên, carbohydrate

khi sử dụng riêng lẻ, nó không hoạt động như là một tín hiệu gây ra sự chuyển đổi của chồi từ phát triển sinh dưỡng sang phát triển sinh sản. Sucrose đã được biết đến như là một hợp chất thúc đẩy sự ra hoa và nó được tích lũy rất sớm trong mô phân sinh đỉnh của cây được cảm ứng (Bodson, Outlaw, 1985). Các nghiên cứu *in vitro* đã chứng minh môi trường nuôi cấy với mục đích tạo hoa thì có hàm lượng sucrose cao hơn so với môi trường nuôi cấy để phát triển sinh dưỡng (Dickens, Van Staden, 1988). Sucrose là loại đường chính có trong lá và chồi đỉnh (Lejeune *et al.*, 1991; 1993). Hàm lượng sucrose tăng lên cung cấp cho mô phân sinh để bước đầu hoạt hóa các quá trình tiêu thụ năng lượng như là quá trình nguyên phân.

Đường được xem là nguồn carbon quan trọng trong môi trường nuôi cấy và có vai trò cảm ứng sự hình thành và phát triển của hoa *in vitro* (Pierik, 1967; Margara, Touraud, 1968; Nitsch, 1972; Dien, Tran Thanh Van, 1974; Handro, 1977). Các nhà khoa học đã khảo sát ảnh hưởng của nhiều loại đường (glucose, lactose, maltose và raffinose) lên sự hình thành hoa *in vitro* và thấy rằng ngoài nồng độ đường thì áp suất thẩm thấu do đường gây ra cũng có những ảnh hưởng không nhỏ (Nitsch, Nitsch, 1967). Việc sử dụng các loại đường hòa tan nhiều có thể làm gia tăng hoạt động của con đường pentose phosphate (Nitsch, 1972). Ngoài ra, ánh sáng và nhiệt độ thấp cũng đóng vai trò đáng kể trong việc biểu hiện vai trò của đường. Năm 1982, Alain và Trần Thanh Văn khảo sát ảnh hưởng của đường lên sự hình thành hoa trên lát mỏng tế bào cây Thuộc lá cho thấy rằng chính ánh sáng và nồng độ đường đã ảnh hưởng đến sự ra hoa trực tiếp này. Thí nghiệm cho thấy giữa hai tác nhân trên thì đường (nồng độ, loại đường và áp suất thẩm thấu do đường tạo ra) là quan trọng hơn cho sự ra hoa *in vitro*, sự thay đổi về đường làm thay đổi đáng kể sự tạo hoa và khi không có đường thì sự tạo hoa không xảy ra. Trong khi đó, nếu đặt thí nghiệm trong tối, sự ra hoa vẫn xảy ra tuy tỷ lệ thấp nhưng vẫn có thể nâng tỷ lệ này lên tới 100% khi sử dụng nồng độ đường thích hợp. Do vậy, vai trò của ánh sáng trong trường hợp này có thể chỉ là thúc đẩy sự tổng hợp đường và tiếp nhận glucose của tế bào.

Các tác nhân vật lý

Quang kỳ

Sự cảm ứng quang kỳ thường là cần thiết cho sự ra hoa *in vitro* của các loài nhạy cảm với khoảng thời gian chiếu sáng trong ngày. Các nghiên cứu cho thấy

sự cảm ứng quang kỳ của thực vật *in vitro* có thể là do toàn bộ cơ thể thực vật (Hillman, 1959), đỉnh sinh trưởng (Raghavan, 1961; Jacobs, Suthers, 1971), đốt thân, đoạn cắt của trục dưới lá mầm (Nitsch, 1972), mầm mô lá và đốt rễ (Paulet, Nitsch, 1964; Margara, Touraud, 1968). Các xử lý quang kỳ nhìn chung thường được ứng dụng cho các mẫu cây còn non, qua các thí nghiệm cho thấy rằng sự cảm nhận kích thích của ánh sáng ở thực vật phụ thuộc vào sự hiện diện của lá, đỉnh sinh trưởng hoặc thậm chí là cây hoàn chỉnh. Ngược lại, sự phản ứng trở lại của thực vật đối với quang kỳ phụ thuộc vào nồng độ tối thiểu của đường có trong môi trường (Margara, Touraud, 1968; Nitsch, 1972). Trong một vài trường hợp, người ta thấy rằng sucrose có thể thay thế hoàn toàn sự kích thích ngày dài ở các cây *in vitro*. Zeatin có thể thay thế kích thích ngày ngắn cho sự ra hoa của cây *Wolffia microscopica* (Margara *et al.*, 1965).

Thực vật nhận được ánh sáng ít nhất trong 5 vùng quang phổ nhờ 3 nhóm quang thụ cảm ánh sáng (photoreceptor). Ánh sáng xanh và tia cực tím A (ultraviolet-A) được hấp thụ bởi cryptochrome, ánh sáng đỏ (đỏ và đỏ xa) được hấp thụ bởi phytochrome, còn đối với tia cực tím B (ultraviolet-B) vẫn chưa xác định được quang thụ cảm ánh sáng nào hấp thụ (Thomas, Vince-Prue, 1997). Có 3 khái niệm để giải thích sự điều khiển quá trình ra hoa: 1) Giả thuyết florigen (Lang, 1952; Evans, 1971): florigen - được giả định là một loại hormone thúc đẩy - được sản xuất ở lá dưới điều kiện quang kỳ thích hợp và chuyển đến đỉnh chồi thông qua mạch libe, các nhà khoa học vẫn chưa xác định được florigen từ nhựa của mạch libe. 2) Giả thuyết chênh lệch dinh dưỡng (Bernier, 1988): giả thuyết này cho rằng những xử lý kích thích ra hoa dẫn đến sự tăng lên của các chất đồng hóa di chuyển đến mô phân sinh đỉnh và nó lần lượt kích thích sự ra hoa. 3) Giả thuyết sự ra hoa do tác động nhiều nhân tố (Bernier, 1988): dưới tác động của những nhân tố môi trường đặc biệt và các yếu tố di truyền khác nhau mà thực vật có thể được thúc đẩy hay ức chế sự ra hoa. Dưới những điều kiện thuận lợi, cây ngày dài thường ra hoa trễ vào mùa xuân và ra hoa sớm và mùa hạ (khi ngày dài hơn) để tạo hạt. Cây ngày ngắn thường ra hoa vào mùa thu (khi quang kỳ ngắn hơn) để hoàn tất sự sinh sản trước khi mùa đông bắt đầu. Phân tích những gen ảnh hưởng đến thời gian ra hoa ở các loài đậu Hà Lan, Ngũ cốc và *Arabidopsis* đã cung cấp thêm cho giả thuyết này là quá trình chuyển đổi từ giai đoạn phát triển sinh dưỡng sang giai đoạn ra hoa bị ảnh hưởng bởi nhiều nhân tố điều khiển (Weller *et al.*, 1997; Koornneef *et al.*, 1998b).

Điều thú vị là mặc dù người ta kích thích được sự ra hoa *in vitro* của cây Thuộc lá không chịu ảnh hưởng quang kỳ nhưng không thể cảm ứng được sự ra hoa của các loài Thuộc lá chịu ảnh hưởng quang kỳ (Aghion-Prat, 1965; Chailakhyan *et al.*, 1974).

Nhu cầu ánh sáng kích thích cho sự ra hoa của thực vật vẫn chưa được làm rõ. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy rằng hàm lượng đường được tạo ra thông qua quá trình quang hợp là yếu tố chính trong hiện tượng này. Thí nghiệm khảo sát thấy rằng khi đặt trong tối và môi trường có nồng độ đường từ thấp đến vừa phải (0-3%) thì sự ra hoa không xảy ra (Margara, Touraud, 1968; Coleman, Thorpe, 1978). Ngoài ra, qua thí nghiệm người ta còn thấy rằng, khi đặt trong tối tại những nồng độ đường như trên trong khoảng 2 tuần sau đó đưa ra môi trường có quang kỳ bình thường có thể làm giảm hoặc thậm chí làm mất hẳn khả năng ra hoa của cây *in vitro* (Scorza, Janick, 1980). Hơn nữa, các mẫu cây được đặt trong môi trường có nồng độ đường cao (3-5%) có thể ra hoa khi đặt trong tối hoàn toàn (Henrickson, 1954) và sự chiếu sáng liên tục có thể kích thích ra hoa ngay trong môi trường không có đường (Margara, Touraud, 1968).

Nhiệt độ

Các mẫu rễ của cây *C. intybus* có thể cho hoa khi mẫu cây lấy từ cây được làm lạnh trước đó (Paulet, Nitsch, 1964) hoặc đoạn rễ không có mô phân sinh đỉnh được làm lạnh trong ống nghiệm (Pierik, 1967). Meso-inositol hoặc kinetin sẽ hỗ trợ cho việc xử lý lạnh *in vitro* của cây *C. intybus* (Margara, Touraud, 1968), trong khi đó glucose hoặc khoáng trong môi trường nuôi cấy là yếu tố ảnh hưởng đáng kể khi xử lý lạnh cây *L. annua* (Pierik, 1967). Sự cảm ứng bởi nhiệt độ lạnh của thực vật còn phụ thuộc đáng kể vào từng mùa trong năm. Trong thí nghiệm ra hoa *in vitro* cây *Citrus unshiu* Marc, nếu lấy mẫu chồi trong khoảng giữa tháng 5 và tháng 9 thì xử lý lạnh sẽ không có kết quả và chồi chỉ có khả năng phản ứng với nhiệt độ lạnh khi mẫu cây được lấy vào thời gian cuối tháng 10 (Garcia-Luis, Kanduser, 1995). Thí nghiệm trên cây *Orychophragmus violaceus* cho thấy sự cảm ứng bởi nhiệt độ lạnh có thể thay thế bằng các chất điều hòa tăng trưởng (Zeatin và GA₃) (Luo *et al.*, 2000).

Tóm lại, sự cảm nhận tự nhiên các kích thích lạnh và sự tương tác với các quá trình khác vẫn chưa được làm sáng tỏ, nhưng qua các nghiên cứu chúng ta có thể rút ra rằng toàn bộ thực vật hoàn chỉnh là không cần thiết trong hiện tượng này (*C. intybus*) và điều kiện nhiệt độ lạnh không phải là yếu tố bắt buộc

đòi hỏi cho sự ra hoa *in vitro*.

Tác nhân hóa học

Một khi thực vật đạt được độ tuổi ra hoa, các yếu tố môi trường như nhiệt độ, ánh sáng và chất dinh dưỡng có thể tác động đáng kể đến sự hình thành và biệt hóa chồi hoa (Lang, 1952; Evans, 1971). Những tác động này được thực vật cảm nhận gián tiếp thông qua các chất có tác dụng kích thích hoặc ức chế sự ra hoa tồn tại trong cơ thể chúng. Năm 1937, Chailakhyan đã đưa ra giả thuyết hormone chuyên biệt cho sự ra hoa, nhưng đến nay vẫn chưa tổng hợp được chất này. Tuy nhiên, qua nhiều nghiên cứu cho thấy sự ra hoa dường như là kết quả của sự tương tác giữa các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như cytokinin, auxin, GA, ethylene, abscisic acid (ABA) và những chất khác đã biết hoặc chưa biết (Bernier *et al.*, 1977). Điều này càng thể hiện rõ hơn qua các nghiên cứu ra hoa *in vitro* và vai trò của các chất điều hòa sinh trưởng.

Auxin

Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy rằng auxin thường là chất ức chế quan trọng trong sự tạo hoa. Các thí nghiệm trên *N. tabacum* (Wardell, Skoog, 1969a, 1973) và *Perilla frutescens* (Raghavan, 1961; Raghavan, Jacobs, 1961) đã chứng tỏ rằng sự ức chế tạo hoa có nguồn gốc từ lá. Các chất trong lá của các cây Thuộc là đang ra hoa ức chế sự kết hợp của (³H)-thymidine vào deoxyribonucleotide acid (DNA) trong thân cây và điều này cũng được quan sát thấy tương tự khi xử lý indol acetic acid (IAA) lên các thân cây đã được ngắt lá. Trong khi đó, ở các cây còn non thì lá và IAA lại có tác dụng làm tăng sự gắn kết của (³H)-thymidine vào DNA (Wardell, Skoog, 1973). Qua hiện tượng này, chúng ta có thể giả thuyết rằng các RNA được cảm ứng bởi IAA tạo ra các protein theo hướng có lợi cho sự phát triển sinh dưỡng, còn trong giai đoạn ra hoa thì có sự tham gia của các RNA base analogues làm thay đổi tính ức chế của IAA bằng cách ức chế sự tổng hợp hoặc chức năng của các RNA được cảm ứng bởi IAA (Wardell, Skoog, 1969b). Sự ức chế của lá trong tự nhiên (Lam, 1965) được cho rằng có sự tham gia của việc tổng hợp auxin (Raghavan, Jacobs, 1961; Wardell, Skoog, 1969b).

Tác động ra hoa của auxin lên cây Thuộc là phụ thuộc vào nồng độ. Nồng độ vừa phải của IAA (3,0-10⁻³ M) làm giảm tỷ lệ chồi hoa/chồi sinh dưỡng, trong khi đó ở nồng độ cao ức chế toàn bộ sự hình thành chồi (Wardell, Skoog, 1969b). Pierik (1967) cho rằng sự ức chế ra hoa của *L. annua* bởi IAA là

do sự ức chế sự hình thành của tất cả các chồi (chồi sinh dưỡng và chồi sinh sản). Tuy nhiên, điều khó khăn trong nghiên cứu *in vitro* là sự phân biệt giữa ức chế chồi hoa và ức chế toàn bộ các chồi. Tuy nhiên, Peeters và đồng tác giả (1991) nghiên cứu sự tạo hoa của cây *Nicotiana tabacum* cv. Samsun bằng cách áp dụng những loại phytohormone khác nhau trong những thời gian khác nhau cho thấy tuy auxin không có vai trò trong sự tượng hoa nhưng nó ảnh hưởng đến sự biệt hóa của chồi hoa sau đó. Trong một vài trường hợp, auxin còn đóng vai trò chính trong việc quyết định sự hình thành hoa của một số thực vật: *Capsicum annum*, *Pisum sativum*, *Vigna mungo* cv. VBN1 (Bodhipadma, Leung, 2003; Franklin *et al.*, 2000).

Gibberellin

Gibberellin (GA) là một chất điều hòa sinh trưởng thực vật đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình phát triển của thực vật bao gồm sự nảy mầm của hạt, kéo dài thời kỳ ra hoa và sự ra hoa (Finkelstein, Zeveaart, 1994) và đã cho thấy rằng nó điều khiển sự ra hoa ở một số loài như những cây thuộc họ Tàng bách (Pharis *et al.*, 1976). Bên cạnh đó, GA cũng ức chế sự ra hoa ở một số loài khác (Evans, 1971). Các tác động trái ngược của GA càng được thể hiện rõ hơn qua các nghiên cứu *in vitro*, chúng ta thấy rằng GA là chất ức chế sự hình thành chồi sinh dưỡng và sinh sản ở một số loài (Wardell, Skoog, 1969a; Nitsch, 1972; Polowick, Sawhney, 1991; Dielen *et al.*, 2001). Trong khi đó, ở một số loài khác chúng lại là chất kích thích hình thành hoa (Naor *et al.*, 2004). Năm 1965, Lang đã đưa ra giả thuyết GA₃ tác động lên sự phát triển hoa hơn là cảm ứng tạo hoa. Giả thuyết này càng được khẳng định hơn qua thí nghiệm của Wardell và Skoog (1969).

Mặt khác, GA hiếm khi ảnh hưởng đến sự cảm ứng ra hoa ở thực vật ngày ngắn. Hơn nữa, sự ra hoa đã bị ức chế bởi GA (Wardell, Skoog, 1969a), nó cũng thường ức chế sự ra hoa ở các loài thực vật hạt kín, mặc dù chúng thúc đẩy sự ra hoa của loài thực vật lá kim (Pharis, King, 1968). Rout và Das (1994) đã sử dụng IBA và GA₃ để kích thích ra hoa ở loài Tre. Những nghiên cứu về đột biến không hoàn toàn ở cây *Arabidopsis* trong quá trình tổng hợp GA hay các tín hiệu đã chứng minh rằng GA nổi sinh liên quan đến sự cảm ứng ra hoa đầu cho những yêu cầu về GA ở các cây ngày ngắn thì khác khe hơn (Wilson *et al.*, 1992; Jacobsen, Oiszewski, 1993). Thậm chí trong những cây ngày dài, các GA giống nhau có thể có ảnh hưởng khác nhau lên các loài thực vật khác nhau. Ví dụ, 2,2-dimethyl GA₃ có hiệu

lực trong hoạt động của florigen khi ứng dụng cho loài *Lolium temulentum* nhưng không ảnh hưởng lên sự ra hoa của loài *S. alba* (Bernier *et al.*, 1993). Stephen và Jayabalan (1998) đã báo cáo rằng khi kết hợp NAA (0,15 mg/l) với GA₃ (0,5 mg/l) đã kích thích tối đa sự hình thành chồi hoa ở loài *Coriandrum sativum* và *Vitex negundo*. Tỷ lệ hình thành chồi hoa cao nhất được nhận thấy khi có sự hiện diện riêng lẻ của cytokinin trong nuôi cấy cây cà chua (Dielen *et al.*, 2001), tác giả này cũng đã cho thấy GA₃ đã làm giảm một cách mạnh mẽ những hoạt động thúc đẩy sự ra hoa của cytokinin và kinetin. Britto và đồng tác giả (2003) đã báo cáo những chồi *in vitro* của loài *Ceropegia bulbosa* Roxb. Var. *bulbosa* nuôi cấy trên môi trường có chứa 1 mg/l GA₃ và 0,5 mg/l BA có tỷ lệ ra hoa là 76%, đạt đến sự tạo hạt *in vitro* và 65% hạt đã nảy mầm thành công. Họ cũng thấy ảnh hưởng đáng kể đến sự ra hoa của cả 2 loại phytohormone này (GA₃ và BA) ở loài *Ceropegia*.

Cytokinin

Qua hàng loạt các nghiên cứu cho thấy cytokinin thường là loại chất điều hòa cần thiết cho sự ra hoa trong ông nghiệm (Kostenyuk *et al.*, 1999; Zhang, Leong, 2000; Luo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Dielen *et al.*, 2001; Chang, Chang, 2003; Lin *et al.*, 2003a). Hàm lượng cytokinin nội sinh cao hơn thường được thấy trong quá trình ra hoa ở nhiều loài thực vật khác nhau (Kinet, 1993), nhưng khi hàm lượng cytokinin cao đã ức chế sự ra hoa. Khi sử dụng riêng lẻ cytokinin với hàm lượng thấp cho chồi đỉnh của các cây ngày ngắn đã không kích thích sự ra hoa dẫn đến những hiện tượng bình thường khác nhau khi quan sát ở mô phân sinh sau khi ra hoa được kích thích bởi quang kỳ cũng như là tỷ lệ tăng lên và đồng bộ hóa sự phân chia tế bào, giảm một nửa kích thước của các đơn vị sao chép DNA và sự phân chia không bào (Bernier, 1977; Havelange *et al.*, 1986; Houssa *et al.*, 1990). BA kích thích sự ra hoa của các loài *Bambusa arundinacea*, *Dendrocalamus bradisi* (Nadgauda *et al.*, 1990) và ở một số loài Bamboo khác (Chambers *et al.*, 1991). Điều này cũng đã được quan sát ở thí nghiệm trên cây *S. alba*, cytokinin đóng một vai trò quan trọng trong sự chuyển đổi ra hoa để đáp ứng lại điều kiện quang kỳ (Bernier, 1993). Rout và Das (1993) đã sử dụng adenine hemi sulphate (0,5 mg/l) để kích thích ra hoa *in vitro* ở các loài *Bambusa vulgaris*, *Dendrocalamus giganteus* và *Dendrocalamus strictus*. Joshi và Nadgauda (1997), Nadgauda và đồng tác giả, (1997) cho rằng nhiều loại cytokinin khác đã được thí nghiệm thì không ảnh

hưởng đến sự ra hoa ở 3 loài này. Singh và đồng tác giả (2000) đã thành công trong việc kích thích ra hoa *in vitro* ở loài *D. strictus* sau 2 tháng nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,5 và 1,0 mg/l TDZ. Khoảng 90% chồi cây *Ocimum basilicum* ra hoa *in vitro* khi được cấy chuyển trên môi trường 1/2MS có bổ sung 5 mg/l BAP và 1 mg/l IAA (Sudhakaran, Sivasankari, 2002). Tomaszewska-Sowa và đồng tác giả (2002) đã nghiên cứu thành công sự ra hoa *in vitro* trên các chồi tái sinh của tất cả các loài *Capsicum annuum*, sự ra hoa của loài cây này liên quan đến ảnh hưởng của BAP, Zip, ZEA và TDZ. Theo nghiên cứu của Dielen và đồng tác giả (2001) cho thấy các loại cytokinin khác nhau đã kích thích ra hoa ở cây Cà chua (3,5 μ M kinetin). BAP hay KIN được chứng minh có ảnh hưởng đến sự hình thành chồi hoa *in vitro* ở loài *Pharbitis nil* (Galoch *et al.*, 1996). Hai loại cytokinin chủ yếu có mặt trong nhựa gỗ (xylem sap) là zeatin riboside và ít hơn là isopentenyl adenine riboside. Hàm lượng của 2 hợp chất này trong dịch chiết rễ đã làm tăng sự ra hoa sớm và nhanh chóng đáp ứng lại những kích thích của điều kiện ngày dài (Bernier *et al.*, 1993).

Qua thí nghiệm điều khiển sự hình thành cơ quan từ đốt thân của cây Thuộc lá, Skoog và Armstrong (1970) đã cho thấy hoạt động của cytokinin đã ảnh hưởng đáng kể đến RNA, ông cho rằng cytokinin điều hòa sự hình thành cơ quan thông qua việc ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp các yếu tố điều hòa sinh trưởng khác như thiamin, auxin và cytokinin còn đóng vai trò như các chất điều hòa sự sinh tổng hợp protein. Năm 1977, Bernier và đồng nghiệp phát hiện ra rằng khi xử lý cytokinin lên đỉnh chồi của cây *Sinapsis alba* sẽ thúc đẩy các chu kỳ nguyên phân, điều này thường xảy ra trước giai đoạn tượng hoa nhưng không dẫn đến sự hình thành hoa sau đó. Họ giả thuyết rằng có sự hiện diện của yếu tố đa thành phần kích thích sự ra hoa mà trong đó cytokinin là một trong các thành phần quan trọng này. Giả thuyết về yếu tố đa thành phần kích thích tạo hoa ngày càng được chấp nhận nhiều hơn trong những nghiên cứu sau đó (Chailakhyan, 1970; Vince-Prue, 1975; Scorza, Janick, 1980). Các polyamine được cho rằng khi kết hợp với cytokinin trong việc điều khiển một số quá trình bao gồm cả chu trình phân chia tế bào. Ca²⁺ được cho là con đường truyền tín hiệu thứ 2 của cytokinin trong ảnh hưởng của nó lên sự phân chia tế bào và các quá trình khác (Saunders, 1992).

Tuy cytokinin có vai trò quan trọng trong việc hình thành hoa *in vitro* nhưng nó vẫn không thể cảm ứng sự ra hoa ở các mô thực vật còn non. Điều này

cho thấy ngoài cytokinin còn có yếu tố khác liên quan đến sự quyết định hướng biệt hóa hoa của thực vật (Wardell, Skoog, 1969a; Scorza, Janick, 1980). Nghiên cứu sự ra hoa *in vitro* trên cây *Zantedeschia* spp. càng khẳng định hơn điều này, khi có sự hiện diện của BA riêng lẻ không có tác dụng lên sự hình thành hoa, tuy nhiên khi kết hợp với GA, BA lại có tác dụng thúc đẩy mạnh sự tạo hoa (Naor *et al.*, 2004).

Bạc nitrate ($AgNO_3$)

Gerats và đồng tác giả (1988) đã trình bày sự biệt hóa thành nhiều chồi hoa khi mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung $AgNO_3$. Ngược lại, Limani và đồng tác giả (1998) đã chứng minh sự ra hoa chậm ở cây Thuốc lá tỷ lệ với việc giảm sự ức chế của polyamine và acid cinamic hydroxy của chúng. Bais và đồng tác giả (2001) báo cáo rằng ở nghiệm thức có $40 \mu M AgNO_3$ cho ra hoa *in vitro* vào ngày thứ 28 ở các cây Witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) đã được chuyển gen *rolA* và những cây không được chuyển gen này. Chithra và đồng tác giả (2004) cũng cho rằng có thể thúc đẩy sự ra hoa sớm ở cây *Rotula quatica* khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung $2,69 \mu M NAA$ và $1,7 \mu M AgNO_3$.

Acid abscisic (ABA)

Trong một số loài, ngoài việc thêm GA, cytokinin còn có những phytohormone khác như ABA, ethylene và polyamine cũng kích thích sự ra hoa trong một số trường hợp nào đó (Martinez-Zpater *et al.*, 1994). Trong giai đoạn phát triển của hạt, ABA được tìm thấy như là một chất có tác dụng ngược với acid gibberellic (Finkelstein, Zeevaert, 1994). Blásquez và đồng tác giả (1998) đã chỉ ra rằng những nghiệm thức được xử lý với ABA đã làm giảm đi những biểu hiện của *LFY::GUS*, bắt chước sự có mặt của GA_3 ở bất kỳ nồng độ nào, kể cả sự hiện diện của GA_3 ngoại sinh, hơn nữa việc tăng nồng độ GA_3 lên 100 mM cũng không thể ngăn cản sự ức chế của ABA, điều này cho thấy GA_3 và ABA sẽ không ảnh hưởng đến sự ra hoa theo cách cạnh tranh như vậy.

Polyamine

Năm 1989, Torrigiani và đồng tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng của polyamine tự do và liên kết đến sự hình thành hoa, cho thấy rằng loại polyamine được liên kết, đặc biệt là putrescine, liên quan đến cả hai giai đoạn phát triển (sinh dưỡng và sinh sản) của các tế bào Thuốc lá. Ngay năm sau, nhóm nghiên cứu của Tiburcio đã khẳng định thêm vai trò của

polyamine trong sự biệt hóa chồi hoa khi chứng minh rằng các polyamine có nguồn gốc từ arginine decarboxylase liên quan đến sự hình thành chồi hoa, trong khi đó các polyamine có nguồn gốc từ ornithine decarboxylase lại có vai trò trong sự phát triển và biệt hóa của các chồi sau đó (Tiburcio *et al.*, 1988). Đến năm 1990, Kaur-Sawhney và đồng tác giả đã bổ sung thêm rằng spermidine không thể thay thế vai trò của cytokinin trong việc tạo chồi hoa, tuy nhiên sự bổ sung spermidine vào môi trường làm tăng số lượng chồi hoa hình thành và giúp chúng phát triển một cách bình thường.

Trong quá trình ra hoa, có sự thay đổi hàm lượng và sự di chuyển của các polyamine trong cây. Ở cây đang ra hoa, có sự di chuyển của polyamine từ các lá và chồi sinh dưỡng đến các chồi hoa đang phát triển. Năm 1997, Martin-Tanguy nhận thấy có sự thay lớn về hàm lượng polyamine ở cây Thuốc lá đang ra hoa. Thông qua phương pháp đánh dấu phóng xạ, Sood và Nagar (2004) đã ghi nhận có sự thay đổi về hàm lượng polyamine nội sinh trong giai đoạn phát triển của hoa cây *Rosa damascene*. Kết quả cho thấy ở giai đoạn đầu của sự phát triển hoa, lượng putrescine, spermine và spermidine ở dạng tự do rất cao, đặc biệt là ở cánh hoa, nhụy hoa và nhị hoa nhưng sau đó giảm đi. Lượng polyamine ở dạng liên kết thấp ở giai đoạn đầu và tăng dần ở các giai đoạn sau trong sự phát triển của hoa. Khi tế bào tiến hành phân chia thì có sự tập trung một lượng polyamine tự do rất cao, ngược lại, ở những tế bào đang lớn thì lượng polyamine tự do rất thấp (Galston *et al.*, 1997). Ngoài ra vào năm 1989, Evans và Malmberg ghi nhận có sự tăng lượng polyamine lên khi thực vật ở giai đoạn phát triển hay đang trong điều kiện stress. Polyamine giảm mạnh sau quá trình thụ tinh của hoa. Ở cây giả, lượng polyamine rất thấp trong các chồi dinh dưỡng.

Bên cạnh đó, sự sinh tổng hợp polyamine bị ức chế bởi một số chất như: DFMA (α -difluoromethylarginine), DFMO (α -difluoromethylornithine), MGBG (Methylglyoxalbis/guanlylhydrazone), CHA (Cyclohexylamine). Trong khi đó, polyamine lại có vai trò trong sự ra hoa ở thực vật. Do đó, nhiều nghiên cứu với các chất này trên sự ra hoa đã được tiến hành để thấy rõ vai trò của polyamine trong sự ra hoa. Năm 1998, Kaur-Sawhney và đồng tác giả đã sử dụng các chất ức chế sự tổng hợp spermine từ spermidine (cyclohexylamine). Kết quả cho thấy có sự ảnh hưởng của cyclohexylamine trong quá trình ra hoa của cây Thuốc lá. Khi lượng cyclohexylamine

khoảng 10-20 mM làm cho tổng số spermidine giảm đi 75%, điều này dẫn đến sự hình thành chồi sinh dưỡng thay vì chồi hoa trên môi trường ra hoa (phức hợp cyclohexylamine-spermidine kích thích sự tạo chồi). Cũng với một thí nghiệm tương tự về chất ức chế sinh tổng hợp polyamine, Sood và Nagar (2005) đã tiến hành phân tích dịch chiết trong xylem ở rễ và trong phloem ở lá của hai loại hoa hồng *Rosa damascena* Mill. và *Rosa bourboniana*, họ nhận thấy rằng putrescine tự do luôn hiện diện với một lượng cao trong suốt giai đoạn ra hoa, mà cơ chế sâu xa hơn là có sự giảm rõ rệt về lượng của các chất DFMO (chất ức chế sự sinh tổng hợp putrescine) trong giai đoạn ra hoa của thực vật. Điều này càng chứng tỏ được vai trò quan trọng của polyamine trong sự tạo hoa. Zielin'ska (2006), cũng dùng chất ức chế sinh tổng hợp polyamine trong suốt giai đoạn cảm ứng ra hoa trên lá mầm cây *Pharbitis nil*. Với các cây được xử lý với chất ức chế sinh tổng hợp polyamine trong điều kiện được cảm ứng ra hoa thì thấy tỷ lệ cây ra hoa giảm đáng kể. Cây xử lý với cyclohexylamine số lượng hoa giảm 79% (ở giờ thứ 8), xử lý với methylglyoxalbis số lượng hoa giảm 70% (ở giờ thứ 12), xử lý với difluoromethylornithine số lượng hoa giảm 50% (ở giờ thứ 8 và 12).

Tỷ lệ C/N và hàm lượng khoáng

Nitrogen là một nhân tố thiết yếu cho sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Hàm lượng nitrogen cao có thể ức chế sự ra hoa và thúc đẩy quá trình phát triển sinh dưỡng, đây cũng không phải là vấn đề quá mới. Vì hơn 80 năm trước, vấn đề này cũng đã được các nhà nghiên cứu chứng minh rằng sự ra hoa phụ thuộc vào sự tăng lên của tỷ lệ C/N, tỷ lệ C/N của giai đoạn ra hoa cũng đã được kiểm tra và so sánh với giai đoạn phát triển sinh dưỡng. Môi trường nuôi cấy chứa các hợp chất khoáng, đường, chất điều hòa sinh trưởng thực vật và các thành phần hữu cơ khác. Điều này cũng đã cho thấy quá trình ra hoa trong ống nghiệm cũng bị ảnh hưởng bởi hàm lượng và tỷ lệ của 2 thành phần chính là đường và hàm lượng khoáng. Nồng độ cao của N trong môi trường MS đã ức chế ra hoa và thúc đẩy giai đoạn phát triển sinh dưỡng, điều này ngược với những hiệu quả do sự ảnh hưởng của đường từ môi trường nuôi cấy (Dielen, 2001). Theo giả thuyết sự chênh lệch dinh dưỡng ảnh hưởng đến sự ra hoa, tỷ lệ C/N đã làm tăng chồi hoa trong thời gian cảm ứng ra hoa (Sachs, 1977). Theo đó, sử dụng một nửa hàm lượng khoáng của môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) hay làm giảm hàm lượng nitrogen trong môi

trường nuôi cấy đã thúc đẩy sự ra hoa *in vitro* ở một số loài cây như là *Bambusa vulgaris*; *Dendrocalamus giganteus*, *D. strictus* (Rout, Das, 1994), *Cymbidium* spp. (Kostenyuk *et al.*, 1999), *Doritis* (Duan, Yazawa, 1994), Ginseng (Chang, Hsing, 1980), một số loài cây thân thảo như *Orchophragmus violaceus* (Luo *et al.*, 2000) và Cà chua (Dielén *et al.*, 2001). Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể của tỷ lệ ra hoa *in vitro* của cây *Bambusa edulis* khi nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ đường và nitrogen có trong môi trường (Lin *et al.*, 2003b). Hàm lượng phosphorus cao cũng kích thích sự ra hoa ở Địa lan (*Cymbidium* spp.) (Kostenyuk *et al.*, 1999).

Ở nhiều loài thực vật, các quá trình phát triển liên quan đến sự điều hòa N là sự phát triển của lá, chồi nhánh và sự ra hoa (Stitt, 1999). Một số nghiên cứu đã báo cáo rằng khi tăng hàm lượng N đã làm chậm sự ra hoa (Bernier *et al.*, 1993). Trong một nghiên cứu về thời gian ra hoa ở *Arabidopsis* cho thấy khi cung cấp hàm lượng N cao đã làm chậm đi sự ra hoa (6 mM so với 0,1 mM NH_4NO_3) (Schulze *et al.*, 1994).

Để nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ P và N lên cả phát hoa *in vitro* và sự ra hoa, cây con *Dendrodium sonia*, phát hoa 3 tháng tuổi và dài 2 cm được nuôi cấy trên môi trường như: 1/2MS, 1/2MS có bổ sung BA, 1/2MS có bổ sung BA và hàm lượng P cao nhưng N thấp. Sau 5 tháng nuôi cấy, 28% cây con *Dendrodium sonia* hình thành phát hoa trên môi trường có chứa hàm lượng P cao và N thấp, trong khi đó chỉ 10% các mẫu cây trên môi trường 1/2MS có bổ sung BA hình thành phát hoa. Hơn nữa, nhiều chồi đã được thu nhận trên môi trường chứa hàm lượng N cao và P thấp. Kostenyuk và đồng tác giả (1999) đã quan sát trên môi trường có chứa BA và hàm lượng P cao, N thấp và có xử lý cắt rễ đã kích thích sự ra hoa cao hơn khoảng 2,5 lần so với trên môi trường chỉ có BA riêng lẻ. Duan và Yazawa (1994) đã nghiên cứu sự ra hoa *in vitro* của 3 giống Lan khác và cũng đạt được những kết quả tương tự như các kết quả đã được báo cáo trên. Họ chứng minh rằng khi có sự hiện diện của hàm lượng N cao trong môi trường nuôi cấy đã làm giảm đi sự hình thành các chồi hoa hay thậm chí không có chồi hoa nào hình thành, trong khi đó với hàm lượng N thấp đã tăng sự hình thành chồi hoa. Những cây con đã hình thành phát hoa *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường 1/2MS có chứa BA và hàm lượng P cao, N thấp đã được nhân lên nhưng không có sự ra hoa nào sau 4 tháng nuôi cấy. Tất cả những phát hoa *in vitro* được

nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS không chứa BA đã bị héo và hóa nâu, như khi quan sát ở *Doriella* bởi Duan và Yazawa (1994), các tác giả này đã cho rằng thành phần khác nhau của chất dinh dưỡng là điều cần thiết cho sự ra hoa và khi tiếp tục bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy đã ức chế sự ra hoa của các loài Lan. Ngược lại với các kết quả này, sự ra hoa *in vitro* không xuất hiện khi trong môi trường chỉ có N và P riêng lẻ, không có bổ sung BA (Kostnyuk *et al.*, 1999). Môi trường MS được đặc trưng bởi nồng độ muối khoáng cao đặc biệt là hàm lượng N, đang được xem là một nhân tố ức chế ra hoa (Dickens, Van Staden, 1988). Tầm quan trọng của tỷ lệ C/N cho sự ra hoa ở cây *Torenia fournieri* L. và *Pharbitis* cũng đã được nhấn mạnh bởi Tanimoto và Harada (1981); Ishioka và đồng tác giả (1991). Nói chung, sự phát triển sinh dưỡng được kích thích bởi hàm lượng N cao, sau đó sự cạnh tranh hiệu quả hơn so với việc đồng hóa ở giai đoạn phát triển sinh sản, điều này liên quan đến giả thuyết về sự chênh lệch dinh dưỡng (Sachs, 1977). Tỷ lệ C/N đã được cho rằng có ảnh hưởng rõ rệt lên sự kích thích ra hoa ở 2 loài cây *S. alba* và *A. thaliana*; vấn đề này cho thấy trong suốt thời gian kích thích ra hoa, carbon được cung cấp cho SAM nhiều hơn nitrogen. Tami và đồng tác giả (1986) đã tìm thấy mối liên quan chủ động giữa hàm lượng N trong lá và tỷ lệ này chồi hoa ở các cây Táo "Starkspur Golden Delicious". Những nghiên cứu trên đã chứng minh, giống như carbohydrate, N cũng ảnh hưởng đến sự cảm ứng ra hoa, nhưng hàm lượng cần thiết có thể thấp hơn so với hàm lượng carbohydrate. Ammonium (NH_4^+) cũng kích thích sự ra hoa, trong khi nitrate (NO_3^-) hay nitrite (NO_2^-) thì không. Protein và các amino acid là những yếu tố không thể thiếu được trong sự ra hoa ở các cây Táo. Việc tổng hợp protein liên quan đến sự kích thích ra hoa tăng đáng kể. Điều này là cần thiết cho một lượng lớn protein trong suốt thời gian ra hoa (Marcelle, 1984).

Những kết quả liên quan đã thu được từ những thí nghiệm trên cây Chanh (Liu *et al.*, 1984), ở loài cây này có sự tăng gấp 5-10 lần nồng độ của 17 loại amino acid đã được tìm thấy trong thời gian cảm ứng ra hoa. Sau đó, những amino acid này chuyển hóa nhanh thành protein khi hoa bắt đầu phát triển. Ở các thí nghiệm kích thích ra hoa bằng ánh sáng trên 2 loài *Sinapis alba* và *Arabidopsis thaliana* đã làm gia tăng sự chuyển hóa các amino acid đến lớp nhụy libe trong cả 2 loài này (Corbiersier *et al.*, 1998). Do đó, điều này được giả định rằng ở một số loài cây amino acid đang hoạt động như là những nhân tố

điều khiển sự biến đổi ra hoa.

Từ các thí nghiệm trên cho thấy N, P, C cần thiết cho sự phát triển và sinh trưởng của cây nhưng tỷ lệ của chúng cùng với các nhân tố kích thích ảnh hưởng đáng kể đến quá trình ra hoa.

Các chất khác

Ngoài các chất cơ bản có trong môi trường nuôi cấy như: các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, các chất vô cơ và hữu cơ cần thiết thì một số chất khác cũng ảnh hưởng không ít, chúng có thể đóng vai trò là tác nhân kích thích hoặc ức chế sự ra hoa trong ống nghiệm. Các chất kích thích sự ra hoa *in vitro* thường là các hợp chất phenol như p-coumaric acid và coumarin (Paulet, Nitsch, 1964), EDTA (Maheshwari, Chauhan, 1963), nước dừa, dịch chiết từ cây *L. annua* đang ra hoa hoặc chưa ra hoa (Pierik, 1967), orotic acid, thymine, adenine (Nitsch, 1967), glucosamine, phenylalanine... (Margara, Touraud, 1968), các amino acid, amino sugar và meso-inositol (Margara, Touraud, 1968), proline (Saxena *et al.*, 2008). Ngược lại, các RNA nucleosides, flavin-adenine-dinucleotide (Chailakhyan *et al.*, 1961) và dịch chiết từ cây *Kalanchoe blossfeldiana* chưa ra hoa (Blake, 1972) có vai trò như chất ức chế sự hình thành hoa.

Thành phần quan trọng của các chất kích thích tạo hoa trong tự nhiên thường là những chất dễ phân hủy và do đó chúng có thể mất đi trong quá trình vận chuyển (Lam, 1965; Salisbury, 1961). Tương tự, trong các nghiên cứu *in vitro* cho thấy các thành phần cần thiết cho sự ra hoa bị mất đi qua các lần cấy chuyển. Các mẫu cấy ra hoa của cây *N. tabacum* sẽ ngưng ra hoa sau bốn lần cấy chuyển, số lượng hoa giảm dần sau mỗi lần cấy chuyển (Wardell, Skoog, 1973). Tương tự, các mẫu cấy của *Passiflora suberosa* không thể tiếp tục cảm ứng tạo hoa sau lần ra hoa lần đầu tiên trong ống nghiệm (Scorza, Janick, 1980). Ngược lại, các chồi hoa của *Saccharum* spp. khi đã ra hoa trong ống nghiệm thì vẫn có thể tiếp tục ra hoa nhiều tháng sau đó (Coleman, Nickell, 1964), mặc dù tác giả còn nhận thấy rằng sự tồn tại dai dẳng của yếu tố kích thích ra hoa này làm chậm sự phát triển và vận chuyển các chất trong mô phân sinh chồi đỉnh. Vẫn còn rất ít các nghiên cứu trên tới sâu hơn. Sự ngưng ra hoa có thể là do mất cân bằng giữa các chất điều hòa sinh trưởng do việc cấy chuyển sang môi trường mới hơn là sự giảm các chất cảm ứng sự ra hoa.

Môi trường nuôi cấy

Margara và Bouniols (1968) đã nghiên cứu điều khiển sự ra hoa của các mẫu cây rễ *C. intybus* bằng cách thay đổi trạng thái vật lý của môi trường. Các nghiên cứu cho thấy rằng trong môi trường có agar sẽ cho tỷ lệ mẫu ra hoa nhiều hơn trong môi trường lỏng sử dụng giấy lọc làm giá thể. Nguyên nhân cơ bản của hiện tượng này vẫn chưa được hiểu rõ. Các phân tích về amino acid cho thấy rằng các mẫu cây trong giai đoạn ra hoa trên môi trường có agar cho lượng proline và arginine cao hơn nhiều, trong khi đó lượng alanin lại thấp hơn. Sự cần thiết của acid amin trong sự ra hoa *in vitro* cũng đã được nghiên cứu (Chaturvedi, Sharma, 1977) nhưng sự tác động của trạng thái vật lý của môi trường nuôi cấy lên tỷ lệ acid amin của thực vật vẫn chưa được xem xét kỹ. Dewir và đồng tác giả (2007) đã nghiên cứu sự ảnh hưởng của đường lên sự ra hoa cây Lan Ý (*Spathiphyllum* spp.) *in vitro* bằng nuôi cấy bioreactor với môi trường MS lỏng có bổ sung 6% đường sucrose và 10 mg/l GA₃. Thí nghiệm này đã cho kết quả là 100% cây ra hoa bằng nuôi cấy bioreactor so với 85% khi nuôi cấy trên môi trường rắn thông thường.

Khuynh độ của sự ra hoa

Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy rằng có một khuynh độ về khả năng ra hoa tồn tại trong mô thực vật. Khả năng ra hoa *in vitro* và số lượng hoa trên mỗi mẫu cấy thường giảm dần khi vị trí lấy mẫu trên thực vật càng xa chồi đỉnh. Hiện tượng này được quan sát thấy ở mẫu đốt thân của cây *N. tabacum* (Wardell, Skoog, 1969b; 1973) và *Torenia fournieri* (Chylah, Tran Thanh Van, 1971), đốt rễ của cây *C. intybus* (Margara et al., 1965), mẫu lá và đốt thân của cây *P. suberosa* (Scorza và Janick, 1980) và chồi đỉnh của cây *Hieracium floribundum* (Yeung và Peterson, 1972) nhưng hiện tượng này lại không được thấy ở đốt thân của cây *L. annua* (Pierik, 1967). Khuynh độ ra hoa trong tự nhiên cũng được thấy ở các cây *N. tabacum* (Aghion-Prat, 1965) và *Aranda* (Goh, 1975). Điều này được lý giải rằng khuynh độ của sự ra hoa là do có sự tồn tại một khuynh độ các chất có vai trò thúc đẩy hoặc ức chế sự tạo hoa tồn tại trong các bộ phận của thực vật lúc lấy mẫu (Chouard, Aghion, 1961) hoặc do sự khác nhau của tỷ lệ các chất có vai trò thúc đẩy hoặc ức chế trong mô (Scorza, Janick, 1980). Khuynh độ của sự ra hoa ở khúc thân *N. tabacum* có thể yếu đi khi xử lý bằng kinetin, auxin, GA hoặc RNA-base analogues hoặc bị mất hoàn toàn khi sử dụng nồng độ đường cao (Aghion-Prat, 1965). Qua các thí

nghiệm cho thấy khả năng của các RNA-base analogues tương tác với auxin làm thay đổi tính ức chế của auxin lên sự ra hoa của đốt thân cây Thuốc lá và cảm ứng sự ra hoa của các vùng thuộc khuynh độ không ra hoa, Wardell và Skoog (1969) đã đưa ra giả thuyết rằng khuynh độ của sự ra hoa là do auxin tác động lên sự sinh tổng hợp RNA. Những nghiên cứu tiếp theo cho thấy rằng khuynh độ ra hoa vẫn còn dù có sự hiện diện của các "đoạn tương đồng - analogues", điều này cho thấy rằng ngoài các RNA-base analogues còn có những yếu tố quan trọng khác (Wardell, Skoog, 1973). Khuynh độ ra hoa có liên quan đến sự gia tăng lượng DNA trên mỗi đơn vị khối lượng mô khi lấy mẫu càng gần đỉnh chồi cây *N. tabacum* (Wardell, Skoog, 1973). Khuynh độ ra hoa chính xác trong tự nhiên và sự hiện diện phổ biến của nó ở thực vật vẫn còn đang được nghiên cứu sâu hơn.

Cấu tạo của hoa và các gen điều khiển sự ra hoa

Cấu tạo hoa

Hoa là cơ quan sinh sản của thực vật hạt kín. Trường hợp điển hình hoa gồm 4 vòng đồng tâm đính trên một vùng lõi lên là đế hoa nằm ở phần tận cùng của cuống hoa.

Đài: Vòng ngoài cùng của đài gồm các lá đài thường có màu lục giống với lá để bảo vệ nụ hoa trước khi hoa nở.

Tràng: gồm các cánh hoa. Cánh hoa thường lớn, có màu sắc rực rỡ và có thể có tuyến mật để hấp dẫn côn trùng hoặc các sinh vật khác. Đài và tràng hợp lại thành bao hoa của hoa.

Bộ nhị: là phần sinh sản đực của hoa, tức là nhị. Mỗi nhị gồm một chi nhị mang một bao phấn chứa các hạt phấn ở bên trong.

Bộ nhụy: gồm những phần sinh sản cái của hoa được gọi là lá noãn. Các lá noãn có thể dính riêng rẽ trên đế hoa hoặc có thể dính lại với nhau tạo nên một cấu trúc phức tạp hơn. Phần gốc phình ra của mỗi lá noãn được gọi là bầu, bầu có thể chứa một hoặc một số noãn và phần trên giống với cuống là vòi nhụy có phần phình ở trên đỉnh là núm nhụy.

Các gen điều khiển sự ra hoa

Theo Adam và Dimech, có 3 loại gen chủ yếu điều khiển sự ra hoa:

Gen xác định mô phần sinh (meristem identity genes): đáp ứng cho các gen xác định hoa đầu tiên.
Gen xác định mô phần sinh hoa khởi động đầu tiên

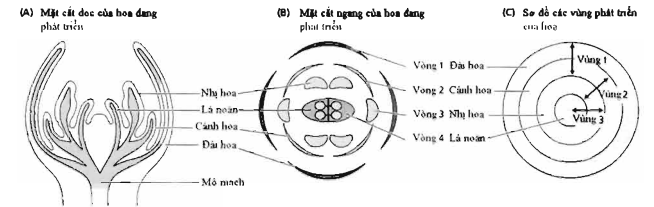
cho sự hình thành hoa. Nếu như gen này không hoạt động thì các mô phân sinh dinh dưỡng hay các mô phân sinh cụm hoa không thể tạo thành mô phân sinh hoa.

Gen nền (caudstral gen): kích thích sự hiện diện của các gen ra hoa khác nhau thông qua cung cấp mức giới hạn cho hoạt động của gen này.

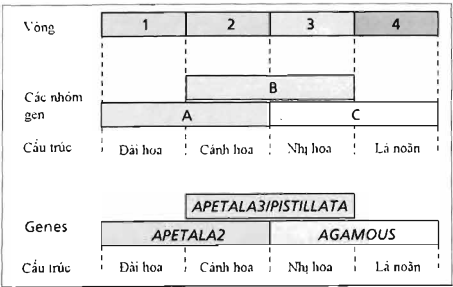
Gen xác định cơ quan hoa (floral organ identity genes): mã hóa các protein kích thích sự hiện diện của các gen khác nhau để tạo ra các cơ quan cấu tạo hoa. Các gen xác định cơ quan hoa, điều khiển sự

hình thành các cơ quan đặc trưng của hoa, các gen thuộc nhóm này được gọi là gen MADS box, các gen này có trình tự nucleotide mã hóa cho các protein có tên MADS domain. Điều này cho phép các protein gắn vào DNA giúp sự mã hóa. Các gen MADS box có mối liên hệ với nhau trong quá trình hình thành cấu trúc hoa.

Năm 1991, Cohn và Meyerowitz phát hiện mô hình ABC khi nghiên cứu trên *Snapdragon* và *Arabidopsis* để giải thích hoạt động của các gen này trong quá trình điều khiển ra hoa.



Hình 2. Cấu tạo hoa Hoa gồm 4 vòng tròn đồng tâm (Bewley et al., 2000)



Hình 3. Mô hình ABC giải thích hoạt động của 3 nhóm gen này ở *Arabidopsis*. Vòng 1: vòng lá đài chỉ do gen A hoạt động. Vòng 2: vòng cánh hoa có sự hoạt động đồng thời của 2 nhóm gen A và B; Vòng 3: vòng nhị hoa có sự hoạt động đồng thời của 2 nhóm gen B và C; Vòng 4: vòng lá noãn chỉ có sự hoạt động của nhóm gen C (Bewley et al., 2000)

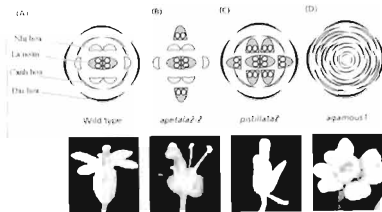
Ở *Arabidopsis* gen A có các gen: *APETALA1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*), và *LeuNIG*; gen B: *APETALA3* (*AP3*) và *PISTILLATA* (*PI*); gen C: *AGAMOUS* (*AG*) (Ma, De Pamphilis, 2000). Các gen này là các gen MADS Box. Đột biến do thiếu 1 trong 3 nhóm gen (đột biến đơn):

Đột biến gen *AP2*: thiếu hoạt động của nhóm A

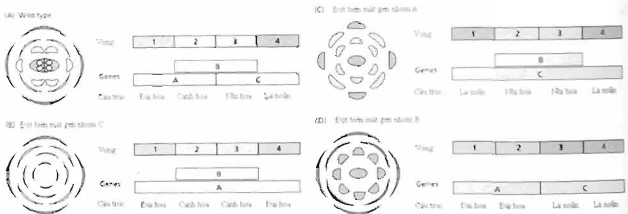
Kết quả vòng 1 và 4 tạo nhụy. Vòng 2 và 3 tạo nhị.

• Đột biến gen *AP3* và *PI*: thiếu hoạt động của nhóm B. Kết quả vòng 1 và 2 tạo lá dài. Vòng 3 và 4 tạo nhụy.

• Đột biến gen *AG*: thiếu hoạt động của nhóm C. Kết quả vòng 1 và 4 tạo lá dài. Vòng 2 và 3 tạo cánh hoa.



Hình 4. Minh họa đột biến 1 trong 3 nhóm gen ở *Arabidopsis* (Bewley *et al.*, 2000)



Hình 5. Tổng quát các dạng đột biến của các gen điều khiển sự ra hoa trên mô hình ABC. (A) dạng đầy đủ; (B) đột biến mất nhóm gen C, (C) đột biến mất nhóm gen A, (D) đột biến mất nhóm gen B (Bewley *et al.*, 2000)

Từ những nghiên cứu về các nhân tố ảnh hưởng đến sự hình thành hoa, và những nghiên cứu về gen gần đây đã xác định được 4 con đường phát triển riêng biệt về mặt di truyền học điều khiển sự ra hoa ở *Arabidopsis* (Blazquez, 2000) (Hình 6).

Con đường quang kỳ liên quan đến các hormone thực vật, phytochrome và cryptochrome. (Chú ý rằng PHYA và PHYB có những hiệu quả trái ngược nhau trên sự ra hoa). Tương tác giữa những photoreceptor

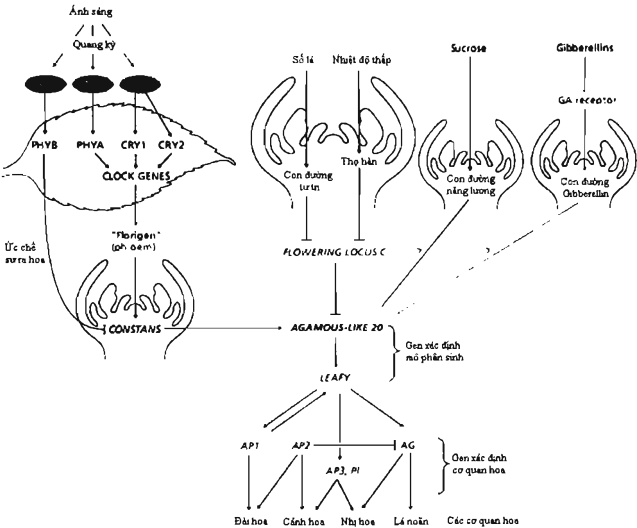
này với đồng hồ sinh học khởi phát con đường biểu hiện của gen *CONSTANS* (*CO*) mã hóa cho yếu tố phiên mã ngón tay kẽm (zinc-finger) kích thích sự ra hoa. *CO* hoạt động thông qua các gen khác để gi tăng sự biểu hiện của mô phân sinh hoa như gen *LEAFY* (*LFY*).

Ở con đường tự trị/thụ hàn, sự ra hoa xảy ra do đáp ứng với tín hiệu nội sinh - sản phẩm của một lượng lá riêng biệt - hoặc với cả nhiệt độ thấp. Ở cơ

đường tự trị của *Arabidopsis*, tất cả các gen liên quan đến con đường này đều biểu hiện ở mô phân sinh. Con đường tự trị tác động bằng cách giảm sự biểu hiện của gen ức chế ra hoa FLOWERING LOCUS C (*FLC*), một tác nhân ức chế của *LFY* (Micheals, Amasino 2000). Sự thọ hàn cũng ức chế *FLC*, nhưng có lẽ bởi một cơ chế khác. Vì gen *FLC* là đích chung nên con đường tự trị và thọ hàn được gộp chung vào một nhóm.

Con đường carbohydrate hay sucrose tương ứng với giai đoạn biến dưỡng ở thực vật. Sucrose kích thích sự ra hoa ở *Arabidopsis* bằng cách gia tăng biểu hiện gen *LFY*, mặc dù con đường di truyền vẫn chưa được biết rõ.

Con đường gibberellin cần thiết cho sự ra hoa sớm và ra hoa dưới điều kiện ngày ngắn.

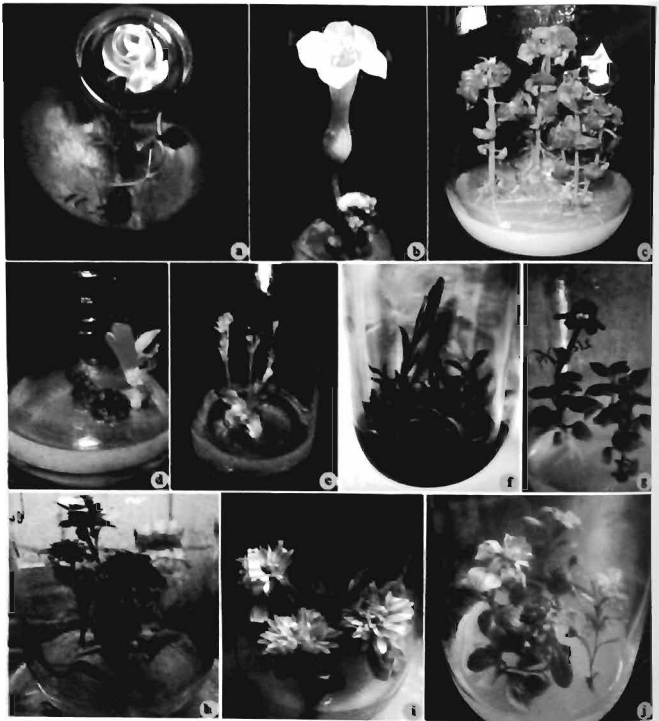


Hình 6. Bốn con đường dẫn đến sự ra hoa ở cây *Arabidopsis* (Blazquez *et al.*, 2000).

Sự phát triển của hoa

Sự tượng hoa thường xuất hiện sau những cảm ứng bởi môi trường. Giai đoạn này thường được thể hiện trong nuôi cấy *in vitro* và *in vivo* thông qua sự duy trì và tích lũy tinh bột, sự phân bố lưới

nội chất phức tạp hơn trong tế bào chất, tăng cường hoạt động của ti thể, tăng hoạt động của các enzyme thủy giải, mật độ ribosome, sự sinh tổng hợp DNA, một loạt các quá trình nguyên phân và tăng sự hấp ở đỉnh sinh trưởng hoa (Bernier *et al.*, 1977).



Hình 7. Hình ảnh ra hoa *in vitro* trên một số đối tượng. a. Hoa Hồng (Hybrid tea cv. "First Prize") (Vu *et al.*, 2006), b. Hoa Thuốc lá (*Nicotiana glauca* L.), c. Hoa Torenia (*Torenia foemina* L.), d. Hoa Đồng tiền (*Gerbera*), e. Hoa Salem (*Limonium*), f. Hoa lan *Dendrobium* Mild Yumi (Luan *et al.*, 2007); g. Hoa Jamaica Forget-me-not (*Browallia americana*) (Thịnh *et al.*, 2007); h. Cây Cúc Nhật đới M1V4 giống gốc có hoa màu tím (Thịnh *et al.*, 2000); i. Cây Cúc Nhật đới biến dị HN073 có hoa màu hồng phấn (Thịnh *et al.*, 2000). j. China aster (*Callistephus chinensis*) (Thịnh *et al.*, 2007).

Các hoa, cụm hoa tạo ra trong ống nghiệm thường có kích thước nhỏ hơn hoặc có hình dạng khác thường so với các hoa phát triển bình thường

trong tự nhiên (Zhang, Leong, 2000; Chang, Chang, 2003; Naor *et al.*, 2004). Sự phát triển bất thường của hoa *in vitro* cho chúng ta những hiểu biết mới về

việc phát sinh hình thái hoa trong tự nhiên. Trong một số trường hợp hoa phát triển không hoàn toàn (Tepler *et al.*, 1966; Lin *et al.*, 2003a) và dị hình (Scorza, 1982). Khuôn mẫu và trình tự phát triển của các hoa theo mô hình ABC (vòng tròn đồng tâm) thường liên quan tới khuôn mẫu *in vivo* nhưng cấp độ phát triển thường phụ thuộc vào nguồn mẫu và hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng thực vật có trong môi trường nuôi cấy. Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật này được xem là yếu tố chính trong sự kiểm soát của quá trình ra hoa. Trong nuôi cấy *in vitro* các chồi hoa *Aquilegia* cho thấy mối tương quan qua lại giữa IAA và kinetin trong sự phát triển của hoa; các nụ hoa còn non hơn thì nhu cầu về tỷ lệ IAA/kinetin cao hơn so với các nụ già (Tepler *et al.*, 1966). Các chồi hoa đôi ("Double" flower buds) của cây *Nigella damascena* cần có sự hiện diện của GA₃ cho sự phát triển của các cơ quan hoa, trong khi đó các chồi hoa đơn ("single" buds) phát triển bình thường trong môi trường không có chất điều hoà tăng trưởng. Sự phát triển của các hạt phấn *in vitro* của cây *Viscaria Candida* bị ức chế bởi kinetin và casein hydrolysate nhưng được kích thích bởi ánh sáng mạnh (Blake, 1969). GA có xu hướng ức chế sự phát triển bầu nhụy của cây *Viscaria* nhưng làm tăng chiều dài của đài hoa, cánh hoa và tăng số lượng hạt phấn. Các mẫu cây *P. suberosa* tạo ra những hoa nhỏ không có nhị khi đặt trong môi trường có nồng độ NAA và cytokinin cao, điều này cho thấy rằng có những yếu tố khác cần thiết cho sự phát triển hoa bình thường (Scorza, Janick, 1980). Sự thay đổi hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của bông nhành ở loài *Bamboosa arundinacea* Willd và *Dendroclamus bradisi* Kurz (Nadgauda *et al.*, 1997). Nhờ vào sự tạo màu trong nuôi cấy mô tế bào, có thể phân biệt được sự khác nhau giữa hoa đực và hoa cái của cụm hoa nhỏ ở loài *Zantedeschia*. Những điều kiện điều khiển có thể dẫn đến sự hình thành không rõ ràng của nhiều cơ quan đặc biệt (Lu *et al.*, 1988; 2000) và tăng cường số cụm hoa (Lin *et al.*, 2003a) để đáp ứng lại sự thay đổi hàm lượng và tỷ lệ chất điều hoà sinh trưởng (Scorza, 1982).

KẾT LUẬN

Kỹ thuật nuôi cấy mô đã mở ra những hướng mới cho việc nghiên cứu sự ra hoa. Thông qua quá trình điều khiển của các yếu tố môi trường trong ống nghiệm đã giúp cho các nhà khoa học có thể theo dõi sự ảnh hưởng của từng yếu tố riêng biệt đến sự hình thành hoa. Các nghiên cứu này thường tập trung vào vai trò của cytokinin, auxin, GA và đường. Nhìn

chung, cytokinin có tác dụng thúc đẩy sự hình thành hoa trong khi đó auxin có ảnh hưởng ức chế. GA có tác động đến sự phát triển của chồi hoa hơn là làm thay đổi hình thái từ chồi sinh dưỡng sang chồi sinh sản. Đường cần thiết trong các thí nghiệm ra hoa *in vitro*, có lẽ chúng đóng vai trò như một nguồn năng lượng và ảnh hưởng của chúng có liên quan đến vai trò của ánh sáng; trong một vài trường hợp chúng có thể thay thế hoàn toàn nhu cầu ánh sáng của thực vật. Những nghiên cứu về nuôi cấy các bộ phận tách rời của thực vật cho thấy sự cảm nhận các yếu tố kích thích ra hoa trong môi trường như ánh sáng và nhiệt độ lạnh không nhất thiết phụ thuộc vào sự có mặt của cây hoàn chỉnh hoặc thậm chí là sự hiện diện của lá. Hơn nữa, những tín hiệu từ môi trường có thể được thay thế bởi đường hoặc chất điều hoà sinh trưởng thực vật. Sự khám phá ra khuynh độ của sự ra hoa qua kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* đã đưa các nhà khoa học có cái nhìn sâu hơn về vai trò của RNA và DNA trong sự ra hoa, điều này khẳng định rằng cytokinin và auxin tác động lên sự ra hoa thông qua sự điều khiển sự dịch mã.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng (Viện Sinh học Tây Nguyên) đã hỗ trợ kinh phí cho chúng tôi thực hiện đề tài này; cảm ơn TS. Nguyễn Tiến Thanh, ThS. Vũ Quốc Luận, ThS. Nguyễn Hồng Vũ, ThS. Trương Thị Diệu Hiền, ThS. Võ Quốc Bảo đã cung cấp tài liệu để chúng tôi thực hiện bài tổng quan này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aghion-Prat D (1965) Floral Meristem-organizing Gradient in Tobacco Stems. *Nature* 207: 1211
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE (1992) *In vitro* seed production from sex-modified male spinach plants regenerated from callus culture. *Sci Hort* 52: 277-282.
- Jain C, Tran Thanh Van K (1983) Light- and sugar-mediated control of direct *de novo* flower differentiation from tobacco thin cell layers. *Plant Physiol* 72: 33-36.
- Bais HP, Venkatesh RT, Chandrashekar A, Ravishanka GA (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Willow chircory in vitro* shoot regeneration and induction of flowering. *Curr Sci* 80: 83-87
- Baldev B (1962) *In vitro* studies of floral induction on stem apices of *Cuscuta reflexa* Roxb. - a short-day plant. *Ann Bot* 26: 173-174.
- Bernier G (1988) The control of floral evocation and morphogenesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:

175-219.

Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune R (1993) Physiological signal that induce flower. *Plant Cell* 5: 1147-1155.

Bernier G, Kinet JA, Jacquemard A, Havelange A, Bodson M (1977) Cytokinin as a possible component of the floral stimulus in *Sinapis alba*. *Plant Physiol* 60: 282-285.

Bernier G, Kinet JM, Sachs RM (1981) *The physiology of flowering* Vol 2. CRC Press Inc, Boca Raton, FLA, USA.

Bernier G, Lejeune R, Jacquemard A, Kinet JM (1990) Cytokinin in flower initiation. In Pharis RP, Rood SB, eds. *Plant Growth Substances*. Springer-Verlag, Berlin: 486-491.

Bewley JD, Hempel FD, McCormick S, Zambryski P (2000) Reproductive Development. In Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.

Blake J (1969) The effect of environmental and nutritional factors on the development of flower apices cultured *in vitro*. *J Exp Bot* 20: 113-123.

Blake J (1972) A specific bioassay for the inhibition of flowering. *Planta* 103: 126-128.

Blázquez MA (2000) Flower development pathways. *J Cell Sci* 13 3547-3548.

Blázquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* 10: 791-900.

Bodhipadma K, Leung DWM (2003) *In vitro* fruiting and seed set of *Capsicum annuum* L. cv. Sweet banana. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 39: 536-539.

Bodson M, Outlaw WH (1985) Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiol* 79: 420-424.

Britto SJ, Natarajan E, Arockiasamy DI (2003) Flowering and shoot multiplication from *Ceropegia bulbosa*. *Taiwania* 48: 106-111.

Catapan E, Oruk MF, Viana AM (2000) *In vitro* culture of *Phyllanthus carolinensis* (Euphorbiaceae). *Plant Cell Tiss Org Cult* 62: 195-202.

Chailakhyan MKH (1937) Concerning the hormonal nature of plant development processes. *C R (Dokl) Acad Sci URSS* 16: 227-230.

Chailakhyan MKH (1970) Hormonal regulation of plant flowering in different photoperiodic groups. In Denis JC, ed. *Plant growth substances. Proc 7th Intern Confer Plant Grow Substances*. Spinger-Verlag, New York: 745-752.

Chailakhyan MKH, Aksenova NP, Konstantinova TN, Bavrina TV (1974) Use of tobacco stem calluses for the investigation of some regularities of plant flowering.

Phytomorphology 24: 86-96.

Chailakhyan MKH, Butenko RG (1959) The effect of adenine and kinetin on the differentiation of flower buds in *Perilla* stem tips. *Dokl Akad Nauk SSSR* 129: 224-227.

Chailakhyan MKH, Khlopenkova LP (1961) Effect of growth substances and nucleic acid derivatives on growth and flowering of photoperiodically induced plants. *Dokl Akad Nauk SSSR* 141: 1497-1500.

Chailakhyan MKH, Yanina LI, Frolova IA (1968). Influence of length of day and gibberellin on flowering in *Bryophyllum* of different ages. *Dokl Akad Nauk SSSR* 183: 230-233.

Chambers SM, Heuch JHR, Pirrie A (1991) Micropropagation and *in vitro* flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltoni* Munro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 27: 45-48.

Chang C, Chang WC (2003) Cytokinin promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *Misircorum* *in vitro*. *Plant Grow Reg* 39: 217-221.

Chang WC, Hsing YI (1980) *In vitro* flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). *Nature* 284: 341-342.

Charurvedi HC, Sharma AK (1977) Induced flowering in excised shoot apices of *Bougainvillea glabra* cv. 'Magnifica' grown *in vitro*. *Ind J Exp Biol* 15: 402-403.

Chithra M, Martin KP, Sunandakumari C, Madhusoodanan PV (2004) Silver nitrate induced rooting and flowering *in vitro* on rare rhizophytic woody medicinal plant, *Ronala aquatica* Lour. *Ind J Biotech* 3: 418-421.

Chlyah H, Tran Thanh Van K (1971) Analyse des capacites neoformatrices de meristemes radiculaires et caulinares (vegetatifs et floraux) chez le *Torenia fournieri* (Lind). *C R Acad Sci (Paris)* 273: 356-359.

Chouard P, Aghion D (1961) Modalité de la formation des bourgeins floraux sur des culture de segments de tige de tabac. *C R Acad Sci Paris* 252: 3864-3866.

Coleman WK, Thorpe TA (1978) *In vitro* culture of western redcedar (*Thuja plicata*). II. Induction of male strobili from vegetative shoot tips. *Can J Bot* 56: 557-564.

Coleman RE, Nickell LG (1964) Stability of the flowering stimulus in isolated stem tips of Sugarcane. *Nature* 201: 941-942.

Compton ME, Veilleux RE (1992) Thin cell layer morphogenesis. *Hort Rev* 14: 239-264.

Corbesier L, Lejeune P, Bernier G (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206: 131-137.

Cousson A, Tran Thanh Van K (1992) Influence of ionic composition of the culture medium on de novo flower

- formation in tobacco thin cell layers. *Can J Bot* 71: 506-511.
- Cutter EG (1965) Recent experiment studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. *Bot Rev* 31: 7-113.
- Daksha S, Davis TD, Sankhla N, Upadhyaya A (1994) *In vitro* production of flowering shoots in 'German Red' carnation: effect of uniconazole and gibberellic acid. *Plant Cell Rep* 13: 514-518.
- De Fossard RA (1974) Flower initiation in tissue and organ cultures. In Street HD, ed. *Tissue culture and plant science*. Academic Press, New York: 193-211.
- Demeulemeester MAC, De Proft MP (1999) *In vivo* and *in vitro* flowering response of chicory (*Chicorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant Cell Rep* 18: 781-785.
- Dewir YH, Chakrabarty D, Ali MB, Singh N, Hahn EJ, Peak KY (2007) Influence of GA₃, sucrose and solid medium/bioreactor culture on *in vitro* flowering of *Spathiphyllum* and association of glutathione metabolism. *Plant Cell Tiss Org Cult* 90: 225-235.
- Dickens CWS, Van Staden J (1988) The induction and evocation of flowering *in vitro*. *South Afric J Bot* 54: 325-344.
- Dickens CWS, Van Staden J (1990) The *in vitro* flowering of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz. II. The effects of growth and gallic acid. *Plant Cell Physiol* 31: 757-762.
- Dielen V, Lecouvet V, Dupont S, Kinet JM (2001) *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) the model for autonomously flowering plant using the late flowering uniflora mutant. *J Exp Bot* 52: 715-723.
- Dien NT, Tran Thanh Van M (1974) Differentiation *in vitro* et de novo d'organes floraux directement a partir des couches de cellules de type epidermique de *Nicotiana tabacum*. Etude au niveau cellulaire. *Can J Bot* 52: 2319-2322.
- Dietz F, Held T (1974) Starch reserves in the apple tree and their correlative connection to reproductive and vegetative performance with the cultivar Boskoop as an example. *Erwerbsobstbau* 16: 117-119.
- Duan JX, Yazawa S (1994) *In vitro* floral development in x *Doriella* Tiny (*Doritis pulcherrima* x *Kingella philippinensis*). *Sci Hort* 59: 253-264.
- Duan JX, Yazawa S (1995) Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 43: 71-74.
- Evans LT (1971) Flower induction and the foreign concept. *Ann Rev Plant Physiol* 22: 365-394.
- Evans PT, Malmberg RL (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 235-269.
- Finkelstein RR, Zeevaart JAD (1994) Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. In Meyerowitz EM, Somerville CR, eds. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 523-553.
- Fleming AJ, Mandel T, Roth I, Kuhlmeier C (1993) The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell* 5: 297-309.
- Floh EIS, Handro W (2001) Effect of photoperiod and chlorogenic acid on morphogenesis in leaf discs of *Streptocarpus nobilis*. *Biol Plant* 44 (4): 615-618.
- Franklin G, Pius PK, Ignacimuthu S (2000) Factors affecting *in vitro* flowering and fruiting of green tea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* 115: 65-74.
- Galoch E, Buracka-Lauckajty E, Kopcewicz J (1996) Effect of cytokinins on flower differentiation in cultured plantlet of *Pharbitis nil* Chois. *Acta Physiol Plant* 18: 223-227.
- Galston A, Kaur-Sawhney F, Altabella T, Tiburcio AF (1997) Polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta* 110: 197-207.
- García-Luis A, Kandauer M (1995) Changes in dormancy and sensitivity to vernalization in axillary buds of *Satsuma mandarin* examined *in vitro* during the annual cycle. *Ann Bot* 76: 451-455.
- Gerats AGM, Keye C, Collins C, Malmberg RL (1988) Polyamine levels in *Petunia* genotypes with untransformed and transformed floral morphologies. *Plant Physiol* 86: 390-393.
- Gill R, Rashid A, Maheshwari SC (1979) Isolation of mesophyll protoplasts of *nicotiana rustica* and their regeneration into plants flowering *in vitro*. *Physiol Plant* 47(1): 7-10.
- Hackett WP (1985) Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants. *Hort Rev* 7: 109-155.
- Handro W (1977) Structural aspects of the neo-formation of floral buds on leaf dishes of *Cinchorium intybus* in tissue culture. *Bot Mag (Tokyo)* 79: 119-123.
- Handro W, Floh EIS (2001) Neo-formation of flower bud and other morphogenetic responses in tissue culture of *Melia azedarach*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 64: 73-76.
- Havelange A, Bodson M, Bemier G (1986) Partial floral evocation by exogenous cytokinin in the long day plant *Sinapis alba*. *Physiol Plant* 67: 695-701.
- Hee KH, Loh CS, Yeoh HH (2007) *In vitro* flowering and rapid *in vitro* embryo production in *Dendrobium* Chao Praya Smile (Orchidaceae). *Plant Cell Rep* 26: 2055-2062.
- Hempel FD, Weigel D, Mandel MA, Ditta G, Zambryski PC, Feldman LJ, Yanofsky MF (1997) Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3845-3853.
- Henrickson CE (1954) The flowering of sunflower

explants in aseptic culture. *Plant Physiol* 29: 536-538.

Hilman WS (1959) Experimental control of flowering in *Lemna*. I. General methods. photoperiodism in *Lemna pepusilla*. *Am J Bot* 46: 466-473.

Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Peñarrubia V, Amasino RM (1998) Identification of a Functional Homolog of the Yeast Copper Homeostasis Gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117(4): 1227-1234.

Houssa C, Jacquemard A, Bemler G (1990) Activation of replicon origins as a possible target for cytokinins in shoot meristems of *Sinapis*. *Planta* 181: 324-326.

Huges H, Lam S, Janick J (1973) *In vitro* culture of *Salpiglossis sinuate* L. *HortScience* 8: 335-336

Ishioke N, Tanimoto S, Hamada H (1991) Roles of nitrogen and carbohydrates in floral-bud formation in *Pharbitis* apex cultures. *J Plant Physiol* 138: 573-576.

Jacobs WP, Suthers HB (1971) The culture of apical buds of *Xanthium* and their use as a bioassay for flowering activity of ecdysterone. *Am J Bot* 58: 836-843.

Jacobsen SE, Olszewski NE (1993) Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 5: 887-896.

Joshi M, Nadgauda RS (1997) Cytokinins and *in vitro* induction of flowering in bamboo (*Bambusa arundinacea* (Retz) Willd). *Curr Sci* 73: 523-526.

Jumin HB, Ahmad M (1999) High frequency *in vitro* flowering of *Murraya paniculata* (L.) Jack. *Plant Cell Rep* 18: 764-768.

Jumin HB, Nito N (1996) *In vitro* flowering of *Fortunella hindsii* (Champ.) *Plant Cell Rep* 15(7): 484-488.

Kachonpadungkith Y, Romchatgoen S, Hasegawa K, Hisajima S (2001) *In vitro* cross breeding. *In vitro* flowering and pollination in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) plants. In: Ham SS, Choi YS, Kim NS, Park CH, eds. *Current advances in buckwheat research. Proc 8th Intern Symposium on Buckwheat*: 351-360

Kaur-Sawhney R, Kandpal G, McGonigle B, Galston AW (1990) Further experiments on spermidine-mediated floral-bud formation in thin-layer explants of tobacco. *Planta* 181: 212-215.

Kaur-Sawhney R, Tiburcio A, Galston AW (1998) Spermidine and flower-bud differentiation in thin layer explants of tobacco. *Planta* 173: 282-284.

Khurana JP, Maheshwari SC (1987) Induction of flowering *Lemna paucicostata* by salicylic acid. *Plant Sci Lett* 12: 127-131.

Kinet JM (1993) Environment, chemical and genetic control of flowering. *Hort Rev* 15: 279-334.

Kintzios S, Michaelakis A (1999) Induction of somal embryogenesis and *in vitro* flowering from inflorescence, chamomile (*Chamomilla recutita* L.). *Plant Cell Rep* 1: 684-690.

Koh WL, Loh CS (2000) Direct somatic embryogenesis plant regeneration and *in vitro* flowering in rapid-cyclin *Brassica napus*. *Plant Cell Rep* 19: 1177-1183.

Koomneef M, Alonso-Blanco C, Blankstijn-de Vries H, Hanhart CJ, Peeters AJ (1998a) Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 148: 885-892.

Koomneef M, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Soppe V (1998b) Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 345-370.

Koslenyuk I, Oh BJ, So IS (1999) Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak. *Plant Cell Rep* 19: 1-5.

Lam SL (1965) Movement of the flower stimulus in *Xanthium*. *Am J Bot* 52: 924-928.

Lang A (1952) Physiology of flowering. *Ann Rev Plant Physiol* 3: 265-330.

Lang A (1965) Physiology of flower initiation. In: Ruthland, ed. *Encyclopedia of plant physiology*. Springer-Verlag, New York: 1380-1536.

Langridge J (1955) Biochemical mutations in the crucifer *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Nature* 176: 260-261.

Langridge J (1957) Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis*. *Nature* 180: 36-37.

Lejeune P, Bernier G, Kinet JM (1991) Sucrose levels in leaf exudates as a function of floral induction in long day plant *Sinapis alba*. *Physiol Plant* 109: 343-350.

Lejeune P, Bernier G, Requier MC, Kinet JM (1993) Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part the shoot of the long day plant *Sinapis alba*. *Planta* 190: 71-74.

Levy YY, Dean C (1998) Control of flowering time. *Curr Opin Plant Biol* 1: 49-54.

Lin CS, Chen CT, Chang WC (2003a) A method for inflorescence proliferation. *Plant Cell Rep* 21: 838-843.

Lin CS, Lin CC, Chang WC (2003b) *In vitro* flowering of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 71-78.

Liu XZ, Lai Y, Xu SJ, Xu XJ (1984) A study on the fluctuation of protein and amino acid contents during the flower bud differentiation period in Valencia orange trees *Acta Hort Sinica* 11: 85-92.

Lozhnikova V, Krekule J, Seidlova F, Bavrina T, Chailakhyan MKH (1981) Promotive effect of abscisic acid in flowering of *Chenopodium rubrum* as the result of

decreasing apical dominance. *Biol Pl* 23: 36-40

Lu W, Enomoto K, Fukunaga Y, Kuo C (1988) Regeneration of tepals, stamens and ovules in explants from perianth of *Hyacinthus orientalis* L. importance of explants age and exogenous hormones. *Planta* 175: 478-484

Lu WL, Bai SN, Zhang XS (2000) The exogenous hormonal control of the development of regenerated flower buds in *Hyacinthus orientalis*. *Acta Bot Sinica* 42: 996-1002.

Luo P, Ye Q, Lan Z (2000) A study on floral biology of seedlings *in vitro* in *Orychophragmus violaceus*: Induction of flowers in seedling of *O. violaceus* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 63: 73-75.

Ma HP (1997) The on and off of floral regulatory genes *Cell* 89: 821-824.

Ma H, dePamphilis C (2000) The ABCs of flower evolution. *Cell* 101: 5-8.

Maheshwari SC, Venkataraman II (1966) Induction of flowering in a duckweed *Wolffia microscopica* by a new kinin zeatin. *Planta (Berl)* 70: 304-306.

Marcelle R (1984) The flowering process and its control on fruit trees. *Acta Hort* 149: 65-69

Margara J, Bouniols A (1967) Comparison *in vitro* de l'influence du milieu liquide ou gelose sur l'initiation florale chez *Cichorium intybus* L. *C R Acad Sci (Paris)* 264: 1166-1168.

Margara J, Rancillac M, Beck D (1965) Experimental research *in vitro* on neo-formation of inflorescence or vegetative buds from explants of endive (*Cichorium intybus* L.). I. Influence of variety and polarity of explants. *Ann Physiol Veg* 7: 157-170.

Margara J, Touraud G (1968) Experimental research *in vitro* on neo-formation of inflorescence or vegetative buds from explants of *Cichorium intybus* L. V. Photoperiodical induction. *Ann Physiol Veg* 10: 41-56.

Martin-Tanguy J (1997) Conjugated polyamines and reproductive development. Biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol Plant* 100: 675-688.

McCarten SA, Van Staden J (2003) Micropropagation of the endangered *Kniphofia leucocephala* Baijnath. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 39: 496-499.

McDaniel CN, Sangry HK, Singer SR (1989) Node counting in axillary buds of *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38, a day-neutral plant. *Am J Bot* 76: 403-408.

McDaniel CN, Singer SR, Smith SME (1992) Developmental states associated with the floral transition. *Dev Biol* 153: 59-69.

Medford JI (1992) Vegetative apical meristems. *Plant Cell* 4: 1029-1039.

SC Maheshwari, Chauhan OS (1963) *In vitro* control of

flowering in *Wolffia microscopica*. *Nature* 198: 99-100.

Michaels SD, Amasino RM (2000) Memories of winter: Vernalization and the competence to flower. *Plant Cell Environ* 23: 1145-1154.

Mizukami Y, Ma H (1997) Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by *AGAMOUS*. *Plant Cell* 9: 393-408.

Mulin M, Pais MSS (2003) *In vitro* floral induction from thin longitudinal sections and micro-cuttings of juvenile cork oak material. *Trees* 17(3): 228-236.

Mullin M, Tran Thanh Van K (1989) Obtention of *in vitro* flower from thin epidermal cell layers of *Petunia hybrida* (Hort.). *Plant Sci* 62: 113-121.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Nadgauda RS, John CK, Parasharami VA, Joshi MS, Mascarenhas AF (1997) A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in bamboo (*Bambusa arundinacea*) *Plant Cell Tiss Org Cult* 48: 181-188.

Nadgauda RS, Parasharami VA, Mascarenhas AF (1990) Precocious flowering and seedling behavior in tissue cultured bamboos. *Nature* 344: 335-336.

Naor V, Kigel J (2002) Temperature affects plant development, flowering and tuber dormancy in calla lily (*Zantedeschia* spp.). *J Hortic Sci Biotech* 77: 170-176.

Naor V, Kigel J, Ziv M (2004) Hormonal control of inflorescence development in plantlets of calla lily (*Zantedeschia* spp.) grown *in vitro*. *Plant Grow Reg* 42: 7-14.

Naor V, Kigel J, Ziv M (2005) The effect of gibberellin and cytokinin on floral development in *Zantedeschia* spp. *in vivo* and *in vitro*. *Acta Hort* 673: 255-263.

Nitsch C (1972) The role of growth regulators in flowering as demonstrated by *in vitro* techniques. In Kaldewey H, Vardar Y, eds. *Hormonal regulation in plant growth and development Proc Adv Study Inst Izmir, 1971*. Verlag Chemie, Weinheim: 413-421.

Nitsch C, Nitsch JP (1967) The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta* 72: 355-370.

Okamuro JK, De Boer BGW, Lotys-Prass C, Szeto W, Jofuku KD (1996) Flowers into shoot: Photo and hormonal control for a meristem identity switch in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13831-13836.

Pande D, Purohit M, Srivastava PS (2002) Variation in xanthotoxin content in *Anni majus* L. cultures during *in vitro* flowering and fruiting. *Plant Sci* 162: 583-587.

Patil VM (1998) Micropropagation studies in *Ceropegia* spp. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34: 240-243.

- Pauler P, Nitsch JP (1964) La neoformation sur fleurs sur cultures *in vitro* de racines de *Cichorium intybus* L. Etude physiologique. *Ann Physiol Veg* 6: 333-345.
- Peeters AJM, Gerards W, Barendse GWM, Wullems GJ (1991) *In vitro* flower bud formation in Tobacco: Interaction of hormones. *Plant Physiol* 91: 402-408.
- Pharis RP (1976) Promotion of Flowering in Conifers by Gibberellins. *For Chro* 51(6): 244-248
- Pharis RP, King RW (1985) Gibberellins and reproductive development in seed plant. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 517-568.
- Pierik RLM (1965) The induction and initiation of flower buds *in vitro* in tissue of *Linaria amara* L. *Naturwissenschaften* 53: 45-51.
- Pierik RLM (1967) Regeneration, vernalization and flowering in *Linaria amara* L. *in vivo* and *in vitro*. *Meded Landbouwwetg. Wageningen* 67: 1-71.
- Plessner O, Ziv M (1999) *In vitro* propagation and secondary metabolites production in *Crocus sativus* L. In Negbi M, ed. *Saffron*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam 137-148
- Polowick PL, Sawhney VK (1991) *In vitro* floral development of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.): The effects of pH and plant growth regulators. *J Exp Bot* 42: 1583-1588.
- Pouteau S, Nicholls D, Tooke F, Coen E, Battey N (1997) The induction and maintenance of flowering in *Impatiens*. *Development* 124: 3343-3351.
- Pringsheim EG, Pringsheim O (1962) Axenic culture of *Utricularia exoleta*. *Amer J Bot* 49: 898-901.
- Qiao Q, Xing FW, Xiao YP, Chen HF (2009) Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering in *Saposhnikovia divaricata*. *J Plant Grow Regul* 28: 81-86.
- Raghavan V (1961) Studies on the floral histogenesis and physiology of *Perilla* III. Effects of indoleacetic acid on the flowering of apical buds and explants in culture. *Amer J Bot* 48: 879-876.
- Raghavan V, Jacobs WP (1961) Studies on the floral histogenesis and physiology of *Perilla* II. Floral induction in cultured apical buds of *P. frutescens*. *Am J Bot* 48: 751-760.
- Rajeevan MS, Lang A (1987) Comparison of *de novo* flower-bud formation in a photoperiodic and a day-neutral tobacco. *Planta* 171: 560-564.
- Rastogi R, Sawhney VK (1989) *In vitro* development of angiosperm floral buds and organs. *Plant Cell Tiss Org Cult* 16: 145-174.
- Reeves PH, Coupland G (2000) Response of plant development to environment: control of flowering by day length and temperature. *Curr Opin Plant Biol* 3: 37-42.
- Rout GR, Das P (1994) Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering in 3 species of bamboo. *Plant Cell Rep* 13: 683-686.
- Sachs RM (1977) Nutrient diversion: An hypothesis to explain the chemical control of flowering. *HortScience* 12: 220-222.
- Sachs RM, Kofranek AM, Shyr SY (1967). Gibberellin induced inhibition of floral initiation in *Fuchsia*. *Amer. Bot* 54: 921-929.
- Salisbury FB (1969) *Xanthium strumarium* L. In Evans LT, ed. *The induction of flowering*. MacMillan, Melbourne: 14-61.
- Sano K, Himeno H (1987) *In vitro* proliferation of saffron (*Crocus sativus* L.) stigma. *Plant Cell Tiss Org Cult* 11: 159-166.
- Saunders MJ (1992) Cytokinin signal transduction through Ca²⁺ in mosses. In Karssen CM, Van Loon LC, Vreugdenhil D, eds. *Progress in Plant Growth Regulation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 65-72.
- Saxena SN, Kaushik N, Sharma R (2008) Effect of abscisic acid and proline on *in vitro* flowering in *Vigna aconitifolia*. *Biol Plant* 52(11): 181-1833.
- Schulze W, Schulze ED, Stader J, Heilmeyer H, Stitt M, Mooney HA (1994) 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: 795-809.
- Scorza R (1982) *In vitro* flowering. *Hort Rev* 4: 106-128
- Scorza R, Janick J (1980) *In vitro* flowering of *Passiflora tuberosa* L. *J Am Soc Hort Sci* 105: 892-898.
- Sharma A, Kumar V, Giridhar P, Ravishankar GA (2008) Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation. *Elect J Biotech* 11(2): 1-6.
- Sim GE, Loh CS, Goh CJ (2007) High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* Madame Thong-In (Orchidaceae). *Plant Cell Rep* 26: 383-393.
- Singh B, Sharma S, Rani G, Virk GS, Zaidi AA, Nagpal A (2006) *In vitro* flowering in embryogenic cultures of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenore). *Afric J Biotech* 5(16): 1470-1474.
- Singh M, Jaiswal U, Jaiswal VS (2000) Thidiazuron induced *in vitro* flowering in *Dendrocalamus strictus* Nees. *Curr Sci* 79(11): 1529-1530.
- Sivanesan I, Jeong BR (2007) Micropropagation and *in vitro* flowering in *Pentanema indicum* Ling. *Plant Biotech* 24: 527-532.
- Skoog F, Armstrong DJ (1970) Cytokinins. *Annu Rev Plant Physiol* 21: 359-384.

- Somers DE (1999) The physiology and molecular bases of the plant circadian clock. *Plant Physiol* 121: 9-20.
- Somers DE, Webb ARR, Pearson M, Kay SA (1998) The short period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs through development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 485-494.
- Sood S, Nagar (2004) Changes in endogenous polyamines during flower development in two diverse species of rose. *Plant Grow Reg* 44: 117-123.
- Sood S, Nagar (2005) Xylem and phloem derived polyamines during flowering in two diverse rose species. *Plant Grow Reg* 24: 36-40.
- Srinivasan C, Mullins MG (1978) Control of flowering, in the Grapevine (*Vitis vinifera* L.). Formation of inflorescences *in vitro* by isolated tendrils. *Plant Physiol* 61: 127-130.
- Steinberg RA (1953) Low temperature inductions of flowering in a *Nicotiana rustica* X *N. tabacum* hybrid. *Plant Physiol* 28(1): 131-134.
- Stephen E. Jayabalan N (1998) *In vitro* flowering and seed setting formation in *Coriandrum sativum* L. *Curr Sci* 74: 195-197.
- Stitt M (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* 2: 178-186.
- Sudhakaran S, Sivasankari VJ (2002) *In vitro* flowering response of *Ocimum basilicum* L. *Plant Biotechnol* 4: 181-183.
- Takimoto A (1960) Effect of sucrose on flower initiation of *Pharbitis nil* in aseptic culture. *Plant Cell Physiol* 1(4): 241-246.
- Tami M, Lombard PB, Righetti TL (1986) Effect of urea nitrogen on fruitfulness and fruit quality of Starspur Golden Delicious apple tree. *J Plant Nutr* 9: 75-85
- Tang W (2000) High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis and *in vitro* flowering of regenerated plantlets in *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 19: 727-732.
- Tanimoto S, Harada H (1981) Chemical factors controlling floral bud formation of *Torenia* stem segment cultured *in vitro*. Effects of mineral nutrient and sugars. *Plant Cell Physiol* 22: 533-541.
- Taylor NJ, Light ME, Van Staden J (2005) *In vitro* flowering of *Kniphofia leucocephala*: influence of cytokinins. *Plant Cell Tiss Org Cult* 83: 327-333.
- Tee CS, Maziah M, Tan CS (2008) Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium Sonia* 17. *Biol Plant* 52 (4): 723-726.
- Teixeira da Silva JA, Nhut DT (2003) Thin cell layers and floral morphogenesis, floral genetics and *in vitro* flowering. In Nhut DT, Tran Thanh Van K, Le BV, Thorpe T, eds *Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 285-342.
- Tepfer SS, Karpoff AJ, Greyson RI (1966) Effects of growth substances on excised floral buds of *Aquilegia*. *Am J Bot* 53: 148-157.
- Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW (1988) Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures. *Plant Cell Physiol* 29(7): 1241-1249.
- Tizio R (1979) Floration *in vitro* de l'ail (*Allium sativum* L.). *C R Acad Sci Paris. Serie D*, 289: 401-404.
- Tomaszewska-Sowa M, Drozdowska L, Szola M (2002) Effect of cytokinins on *in vitro* Morphogenesis and ploidy pepper *Capsicum annuum* L. *Eleo J Polish Agr Uni, Agronomy* 5(1): 16-24.
- Torrigiani P, Altamura MM, Capitani F, Serafini-Fracassini D, Bagni N (1989) De novo root formation in thin cell layers of tobacco: changes in free and bound polyamines. *Physiol Plant* 77: 294-301.
- Thomas B. Vince-Prue D (1997) *Photoperiodism in Plants*, 2nd. Academic Press, San Diego.
- Tran Thanh Van K (1973a) Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 115: 87-92.
- Tran Thanh Van K (1973b). *In vitro* control of de novo flower, bud, root, callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature* 246: 44-45.
- Tran Thanh Van K (1974) Growth and flowering of *Cymbidium* buds normally inhibited by apical dominance. *J Am Soc Hort Sci* 99: 450-454.
- Tran Thanh Van K (1999) Floral and vegetative differentiation *in vitro* and *in vivo*. In Soh WY, Bhojwani SS, eds. *Morphogenesis in Plant Tissues Culture*. Kluwer Academic Publishers: 215-233.
- Van den Ende G, Croes AF, Kemp A, Barendse GWM (1984) Floral morphogenesis in thin-cell layer tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. *Physiol Plant* 62: 38-88.
- Verma R, Singh RR (2007) Regeneration and *in vitro* flowering in *Brassica Campestris* (L.) var. Bhavani. *Our Nature* 5: 21-24.
- Vu NH, Anh PH, Nhut DT (2006) The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. "First Prize". *Plant Cell Tiss Organ Cult* 87: 315-320.
- Wada K, Toisuka T (1982) Long-day flowering *Perilla* plants cultured in nitrogen-poor media. *Plant Cell Physiol* 23: 977-985.
- Wang GY, Xu ZH, Chia TF, Chua NH (1993) *In vitro* flowering of orchid (*Dendrobium candidum*) In You CB,

- ed *Biotechnology in Agriculture*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 373-378.
- Wang GY, Yuan MF, Hong Y (2002) *In vitro* flower induction in roses. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 38(5): 513-518.
- Wang S, Tang L, Chen F (2001) *In vitro* flowering of bitter melon. *Plant Cell Rep* 20(5): 393-397.
- Wardell WL, Skoog F (1969a) Flower formation in excised tobacco stem segments I. Methodology and effects of plant hormones. *Plant Physiol* 44: 1402-1406.
- Wardell WL, Skoog F (1969b) Flower formation in excised tobacco stem segments II. Reversible removal of IAA inhibition by RNA base analogues. *Plant Physiol* 44: 1407-1412.
- Wardell WL, Skoog F (1973) Flower formation in excised tobacco stem segments. III. Deoxyribonucleic acid content in stem tissue of vegetative and flowering tobacco plants. *Plant Physiol* 52: 215-220.
- Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1992) *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69: 843-859.
- Weller JL, Reid JB, Taylor SA, Murfet IC (1997) The genetic control of flowering in pea. *Trends Plant Sci* 2: 412-418.
- Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR (1992) Gibberellins is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol* 100: 403-408.
- Yanofsky MF (1995) Floral meristems to floral organs: Genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 167-188.
- Yeung EC, Petersen RL (1972) Studies on the rose plant *Heriacium floribundum*. I. Observations related to flowering and axillary bud development. *Can J Bot* 50: 73-78.
- Yu H, Goh CJ (2000) Differential gene expression during floral transition in an orchid hybrid *Dendrobium Madame Thong-In*. *Plant Cell Rep* 19: 926-931.
- Zeevaert JAD (1958) Flower formation as studied by grafting. *Meded Landbouwhogeschool Wageningen* 58: 1-88.
- Zhang Z, Leong DWM (2000) A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in *Gentian*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 63: 223-226.
- Zielinska M (2006) Participation of polyamines in the flowering of the short-day plant *Pharbitis nil*. *Plant Growth Reg* 50: 149-158.
- Ziv M, Altman A (2003) Tissue culture general principles. In Thomas B, Murphy D, Murray B, eds. *Encyclopedia of Applied Plant Science* Elsevier Academic Press, UK: 1341-1353.

THE INFLUENCES OF SOME FACTOR ON *IN VITRO* FLOWERING

Duong Tân Nhựt*, Tran Trong Tuan, Tran Thanh Van K

Tay Nguyen Institute of biology

SUMMARY

Flowering growth stage or the process of flowering is one of decisive stage in development process and improvement of cycle-life and reproduction of plants. The process of conversion from vegetative growth state to floral state, beside age factor, the plant is also influenced by some of other factors in the process of flowering such as photoperiod, temperature, nutrition... However, some researches in the nature condition cannot explain all complex physiology, biochemistry phenomena involved in the process of flowering. *In vitro* culture technology is an ideal tool to study further on plant, especially flowering process, because we can positive control physical factors (light intensity, photoperiod, temperature, humidity...), chemical factors (sugar, vitamin, minerals...), and the role of plant growth regulators in culture medium. In this review, we reported the influence of some factors on *in vitro* flowering, flowering pathways, and genes related to flowering. From 2002 up to now, Department of Plant Molecular Biology and Plant Breeding (Tay Nguyen Institute of Biology) has also successfully studied the *in vitro* flowering in some plants such as *Torenia* (*Torenia founieri* L.), Tobacco (*Nicotiana glauca*), Rose (Hybrid tea cv. "First Prize"), Salem (*Limonium*), and *Dendrobium* Mild Yumi. Some of our results aim to study further physiology phenomena of flowering, and also attend to produce commercial *in vitro* flowers in these plants.

Keywords: floral state, flowering *in vitro*, flowering pathway, meristem, vegetative state

* Author for correspondence: Tel: 84-63-3831056; Fax: 84-63-3831028; E-mail: duongtannhut@gmail.com