BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

LÊ THẾ BIÊN

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH PHÁT SINH HÌNH THÁI VÀ SINH TRƯỞNG *IN VITRO* CỦA MỘT SỐ CÂY TRỒNG CÓ GIÁ TRỊ KINH TẾ DƯỚI ĐIỀU KIỆN MÔ PHỎNG KHÔNG TRỌNG LỰC

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

LÊ THẾ BIÊN

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH PHÁT SINH HÌNH THÁI VÀ SINH TRƯỞNG *IN VITRO* CỦA MỘT SỐ CÂY TRỒNG CÓ GIÁ TRỊ KINH TẾ DƯỚI ĐIỀU KIỆN MÔ PHỎNG KHÔNG TRỌNG LỰC

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện Khoa học và Công nghệ	Người hướng dẫn 1	Người hướng dẫn 2
KT. GIÁM ĐỐC PHÓ GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ Nguyễn Thị Trung	GS.TS. Dương Tấn Nhựt	TS. Bùi Văn Thế Vinh

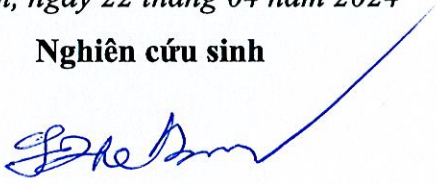
Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án "**Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* của một số cây trồng có giá trị kinh tế dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực**" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của GS.TS. Dương Tấn Nhựt và TS. Bùi Văn Thế Vinh. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 22 tháng 04 năm 2024

Nghiên cứu sinh



Lê Thế Biên

LỜI CẢM ƠN

Sự học là một hành trình tiếp nối liên tục và bền bỉ trong suốt một đời người. Trong chặng đường dài tìm kiếm tri thức để bản thân ngày càng tốt hơn, tôi đã rất may mắn khi gặp được những người dẫn dắt, đồng hành và sẻ chia vô cùng cao quý.

Đầu tiên, tôi xin được bày tỏ sự tri ân sâu sắc, lòng tôn kính dạt dào và nghĩa thầy trò lớn lao đến GS.TS. Dương Tấn Nhựt - Người Thầy mà số phận sắp đặt như định mệnh để nâng đỡ tôi đến được cái đích cao nhất của sự học trong nhà trường. Người Thầy đã giúp đỡ tôi vượt qua giới hạn của bản thân, bước qua nhiều ngã rẽ để đạt được một số thành tựu quan trọng. Người Thầy đã cho tôi tấm gương và niềm cảm hứng về sự phấn đấu không mệt mỏi, tình yêu thương con người, yêu thương đất nước, khát khao được sống, được hy sinh và được cống hiến vô cùng mãnh liệt.

Tôi xin được cảm ơn Người Thầy, Người Anh, TS. Bùi Văn Thế Vinh đã nhiệt tình hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án và tạo điều kiện công tác thuận lợi cho tôi trong thời gian dài làm nghiên cứu sinh.

Tôi xin cảm ơn tới Người Thầy, Người Em thân quý, TS. Hoàng Thanh Tùng đã đồng hành cùng với tôi trong một chặng đường rất dài của sự học. Người đã hỗ trợ tôi hết sức, hết lòng và đầy trách nhiệm để tôi học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án một cách tốt nhất.

Tôi xin cảm ơn tới ThS. Hoàng Đắc Khải, NCS. Nguyễn Thị Như Mai, PGS.TS. Vũ Quốc Luận, TS. Đỗ Mạnh Cường và các cán bộ, nhân viên, các nghiên cứu sinh, học viên cao học, sinh viên đã và đang công tác, học tập tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng – Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã giúp đỡ tôi vô cùng nhiệt thành và trong sáng trong suốt thời gian qua.

Tôi xin cảm ơn Lãnh đạo, cán bộ, giảng viên và nhân viên Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn tới Quỹ Đổi mới sáng tạo của Tập đoàn Vingroup (VINIF) đã tài trợ dự án Khoa học và Công nghệ với mã số VINIF.2023.DA075 mà tôi là thành viên. Đây là sự hỗ trợ rất có ý nghĩa cho bản thân tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Đặc biệt, tôi xin được gửi lời cảm ơn sâu nặng tới TS. Nguyễn Đình Chiến, Người Anh mà cuộc đời đã gieo duyên lành cho tôi được gặp để nhận được từ Anh sự giúp đỡ vô cùng to lớn về tinh thần và vật chất. Tình cảm thanh khiết đó của Anh là nguồn cổ vũ mạnh mẽ và hy vọng lớn lao cho tôi trong suốt cuộc đời.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, thầy cô, bạn bè, đồng nghiệp và học trò – những người không thể thiếu trong cuộc đời tôi. Họ là nguồn cảm hứng, niềm tin và niềm hy vọng bất tận để tôi bước tiếp trên hành trình sự học, sự nghiệp của đời mình.

Xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 22 tháng 04 năm 2024

Nghiên cứu sinh

Lê Thế Biên

MỤC LỤC

Trang

Lời cam đoan i
Lời cảm ơn ii
Mục lục iv
Danh mục chữ viết tắt viii
Danh mục bảng x
Danh mục hình và sơ đồ xii
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU 5
1.1.Thực vật và trọng lực 5
1.2. Điều kiện không trọng lực thực và điều kiện mô phỏng không trọng lực 6
1.2.1. Điều kiện không trọng lực thực 6
1.2.2. Điều kiện mô phỏng không trọng lực 7
1.2.2.1. Clinostat 2-D và 3-D 8
1.2.2.2. Máy định vị ngẫu nhiên 9
1.3. Quá trình phát sinh hình thái thực vật dưới điều kiện MG 10
1.4. Quá trình sinh trưởng của thực vật dưới điều kiện MG 11
1.5. Sự thay đổi sinh lý và sinh hóa của thực vật dưới điều kiện MG 14
1.6. Sơ lược về đối tượng thực vật 20
1.6.1. Cây hoa Thu hải đường (*Begonia* × *tuberous*) 20
1.6.2. Cây Dâu tây (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) 21
1.6.3. Cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.) 22
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 24
2.1. Đối tượng 24
2.1.1. Đối tượng thực vật 24
2.1.2. Môi trường nuôi cấy 24
2.1.3. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất 24
2.2. Nội dung nghiên cứu 26

2.2.1. Nội dung 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên các con đường phát sinh hình thái của mẫu cấy cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro* 26
2.2.2. Nội dung 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng, tỷ lệ hormone nội sinh và chuyển hóa năng lượng trong quá trình phát sinh hình thái của mẫu cấy cây hoa Thu hải đường; hàm lượng, tỷ lệ hormone nội sinh và hoạt tính enzyme kháng oxy hóa của mẫu cấy cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng; khả năng tích lũy hợp chất thứ cấp của mẫu cấy cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro* 26
2.2.3. Nội dung 3: Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở điều kiện trọng lực thực của mẫu cấy cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG 26
2.3. Phương pháp nghiên cứu 27
2.3.1. Bố trí thí nghiệm 27
2.3.1.1. Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh SEs của mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường nuôi cấy in vitro 27
2.3.1.2. Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu cấy lá cây Dâu tây nuôi cấy in vitro 27
2.3.1.3. Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu lóng thân cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro 28
2.3.1.4. Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng và tỷ lệ hormone nội sinh trong quá trình phát sinh hình thái SEs cây hoa Thu hải đường, chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro 28
2.3.1.5. Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong quá trình phát sinh mô sẹo cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro 30

2.3.1.6. Thí nghiệm 6: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự tích lũy hợp chất thứ cấp trong quá trình phát sinh mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro 32

2.3.1.7. Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự chuyển hóa năng lượng (tinh bột và đường) trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường nuôi cấy in vitro 33

2.3.1.8. Thí nghiệm 8: Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Thu hải đường, cây Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG 34

Thí nghiệm 8.1. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Thu hải đường có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG 34

Thí nghiệm 8.2. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG 34

2.3.1.9. Thí nghiệm 9: Nghiên cứu ghi nhận sự tăng sinh ở môi trường trọng lực thực của mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG 35

2.3.1.10. Thí nghiệm 10: Nghiên cứu ghi nhận sự thích nghi ở vườn ươm của cây con Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG . 35

2.3.2. Phương pháp quan sát hình thái 36

2.2.3. Điều kiện nuôi cấy 37

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu 37

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu 38

2.4.1. Địa điểm nghiên cứu 38

2.4.2. Thời gian nghiên cứu 38

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 39

3.1. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh SEs của mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro* 39

3.2. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu cấy lá cây Dâu tây nuôi cấy *in vitro*..... 48

3.3. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu cấy lóng thân cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*..... 53
3.4. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường, chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro* 56
3.5. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong quá trình phát sinh mô sẹo cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro* 62
3.6. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự tích lũy hợp chất thứ cấp trong quá trình phát sinh mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*... 66
3.7. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự chuyển hóa năng lượng (tinh bột và đường) trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro* . 67
3.8. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Thu hải đường, cây Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG..... 72
3.8.1. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Thu hải đường có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG..... 72
3.8.2. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG..... 76
3.9. Nghiên cứu ghi nhận sự tăng sinh của mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG..... 79
3.10. Nghiên cứu ghi nhận sự thích nghi ở vườn ươm của cây Dâu tây con có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG..... 82
3.11. Đề xuất quy trình vi nhân giống cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và sản xuất hợp chất thứ cấp trên cây Diệp hạ châu đắng..... 86
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ..... 89
4.1. Kết luận 89
4.2. Kiến nghị 90
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 91
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO 92

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	Axit 2,4-dichlorophenoxyacetic
2iP	N6-isopentenyladenine	N6-isopentenyladenine
½ MS	½ Murashige and Skoog	Môi trường Murashige và Skoog giảm một nửa khoáng đa lượng
ABA	Abscisic acid	Axit abscisic
ADN	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
AgNPs	Silver nanoparticles	Nano bạc
APX	Ascorbate peroxidase	Ascorbate peroxidase
AUX	Auxin	Auxin
BA	6-Benzylaminopurine	6-Benzylaminopurine
CAT	Catalase	Catalase
CKs	Cytokinines	Các cytokinine
Clinostat 2-D	two-Dimensional Clinostat	Clinostat hai chiều
Clinostat 3-D	three-Dimensional Clinostat	Clinostat ba chiều
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DW	Dry weight	Khối lượng khô
ESA	European Space Agency	Cơ quan vũ trụ Châu Âu
FW	Fresh weight	Khối lượng tươi
G	Ground	Mặt đất
GA_3	Gibberellin Acid	Axit Gibberellin
GOPOD	Glucose oxidase-peroxidase	Glucose oxidase-peroxidase
HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
IAA	Indole-3-acetic acid	Axit Indole-3-acetic
IBA	Indole-3-butyric acid	Axit Indole-3-butyric
ISS	International Space Station	Trạm vũ trụ quốc tế
JAXA	Japan Aerospace Exploration Agency	Cơ quan nghiên cứu và phát triển hàng không vũ trụ Nhật Bản
KIN	Kinetin	Kinetin

MG	Microgravity	Không trọng lực
mg GAE	milligram Gallic Acid Equivalents	miligam đương lượng của axit gallic
MEL	N-acetyl-5-methoxytryptamine/melatonin	N-acetyl-5-methoxytryptamine/melatonin
MS	Murashige and Skoog	Môi trường Murashige và Skoog
NAA	α-naphthaleneacetic acid	Axit α-naphthaleneacetic
NASA	National Aeronautics and Space Administration	Cơ quan hàng không và vũ trụ Hoa Kỳ
p-tTCL	petioles - transverse thin cell layer	Mẫu cuống lá được cắt bằng kỹ thuật lớp mỏng tế bào theo chiều ngang
ROS	Reactive Oxygen Species	Các gốc oxy hóa hoạt động
RPM	Random positioning machine	Máy định vị ngẫu nhiên
rpm	Revolutions per minute	Số vòng quay/phút
RSA	Radical scavenging activity	Hoạt tính bắt gốc tự do
SA	Salicylic acid	Axit salicylic
SMG	Simulated microgravity	Mô phỏng không trọng lực
SE	Standard error	Sai số chuẩn
SEs	Somatic embryos	Phôi soma
SOD	Superoxide dismutase	Superoxide dismutase
TDZ	Thidiazuron	Thidiazuron
TMG	True microgravity	Không trọng lực thực
ZEA	Trans-zeatin	Trans-zeatin

DANH MỤC BẢNG

Trang

Bảng 1.1. So sánh các thông số kỹ thuật của một số thiết bị SMG 9
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu lá Dâu tây sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy 52
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu lóng thân cây Diệp hạ châu đắng *in vitro* sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy..... 55
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng hormone nội sinh ở mô sẹo rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng sau 4 tuần nuôi cấy 61
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa của mô sẹo/chồi cây Dâu tây sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy 64
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa ở mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy 65
Bảng 3.6. Sự tích lũy hợp chất thứ cấp ở mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng sau 4 tuần nuôi cấy dưới điều kiện SMG..... 66
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng tinh bột và đường của SEs cây hoa Thu hải đường sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy 71
Bảng 3.8. Sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây hoa Thu hải đường có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 1 tháng nuôi cấy ở điều kiện trọng lực thực..... 74
Bảng 3.9. Sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa Thu hải đường con hoàn chỉnh có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 3 tháng nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực..... 75
Bảng 3.10. Sự sinh trưởng trong quá trình nhân nhanh chồi của cây Dâu tây có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 4 tuần nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực..... 77
Bảng 3.11. Sự sinh trưởng và phát triển trong quá trình tạo rễ *in vitro* của chồi cây Dâu tây có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 2 tuần nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực..... 78

Bảng 3.12. Sự tăng sinh mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 4 tuần nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực 81
Bảng 3.13. Sự thích nghi của cây Dâu tây có nguồn gốc dưới điều kiện SMG ở giai đoạn vườn ươm 84
Bảng 3.14. Sự hình thành ngó của cây Dâu tây có nguồn gốc dưới điều kiện SMG ở giai đoạn vườn ươm..... 85

DANH MỤC HÌNH VÀ SƠ ĐỒ

Trang

Hình 1.1. Sự lắng đọng của các lạp bột dưới điều kiện trọng lực, TMG và SMG 7
Hình 2.1. Thiết bị Clinostat 2-D 25
Hình 3.1. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự cảm ứng SEs của mẫu cấy cây hoa Thu hải đường *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy 39
Hình 3.2. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên các giai đoạn phát triển của SEs của mẫu cấy cây hoa Thu hải đường *in vitro* sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy 40
Hình 3.3. Ảnh hưởng của điều kiện SMG đến sự phát triển của SEs ở mẫu p-tTCL cây hoa Thu hải đường *in vitro* sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy 43
Hình 3.4. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hình thái khí khổng trong lá SEs trưởng thành của mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường *in vitro* 47
Hình 3.5. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu lá Dâu tây *in vitro* sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy 51
Hình 3.6. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu lóng thân cây Diệp hạ châu đắng *in vitro* sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy 54
Hình 3.7. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh trong SEs mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường *in vitro* 57
Hình 3.8. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh trong chồi mẫu cấy lá cây Dâu tây *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy 58
Hình 3.9. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng tinh bột và đường tổng số trong giai đoạn cảm ứng SEs cây hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro* 68
Hình 3.10. Sự tăng sinh mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 4 tuần nuôi cấy *in vitro* ở môi trường trọng lực thực 80
Hình 3.11. Sự sinh trưởng và phát triển của chồi, cây con và hình thành ngó của cây Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện SMG ở vườn ươm 83
Sơ đồ 3.1. Quy trình nhân giống cây hoa Thu hải đường thông qua quá trình phát sinh hình thái dưới điều kiện SMG 86

Sơ đồ 3.2. Quy trình nhân giống cây Dâu tây thông qua quá trình phát sinh hình thái dưới điều kiện SMG 87

Sơ đồ 3.3. Quy trình sản xuất hợp chất thứ cấp trên cây Diệp hạ châu đắng thông qua quá trình phát sinh hình thái dưới điều kiện SMG 88

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Trọng lực là một đại lượng hằng số đóng vai trò quyết định đối với sự tồn vong, sinh trưởng, phát triển và tiến hoá của thực vật. Do đó, câu hỏi đặt ra là khi thoát khỏi sự chi phối của trọng lực, thực vật sẽ bị những tác động như thế nào? Liệu chúng có phát huy được tính mềm dẻo đến kỳ diệu vốn có để chống chọi với những điều kiện sống bị thay đổi to lớn như đã từng gặp trong lịch sử tiến hóa của mình hay không? Đó là câu hỏi đã thách thức các nhà khoa học trong một thời gian rất dài.

Trong năm thập kỷ qua, cùng với sự phát triển bùng nổ của khoa học vũ trụ, những hiểu biết mới đầy thú vị về đời sống của thực vật trong môi trường trọng lực bị thay đổi đã dần được hé lộ. Khi con người khám phá sâu vào không gian, công tác hậu cần và bài toán kinh tế của việc vận chuyển thực phẩm đóng gói cho thành viên phi hành đoàn ngày càng trở nên bất cập. Bên cạnh đó, các chất dinh dưỡng trong thực phẩm đóng gói có xu hướng giảm chất lượng đáng kể khi được bảo quản trong không gian [1]. Do đó, các thí nghiệm sinh học thực vật trong không gian là cần thiết nhằm cung cấp thực phẩm tươi sống cho phi hành gia và tạo nền tảng xây dựng hệ thống tái tạo sinh học hỗ trợ sự sống bền vững để con người khám phá không gian trong thời gian dài.

Các thí nghiệm sinh học trong điều kiện trọng lực thay đổi đã được thực hiện thông qua các chuyến bay của tàu vũ trụ quanh quỹ đạo và các nền tảng điều kiện mô phỏng không trọng lực (Simulated microgravity - SMG) bằng các thiết bị như Clinostat (2-D và 3-D), máy định vị ngẫu nhiên (Random positioning machine - RPM) trên mặt đất. Ví dụ, ảnh hưởng của không trọng lực (Microgravity – MG) lên những thay đổi ở cấp độ tế bào và phân tử dẫn đến thay đổi kiểu hình của thực vật như những thay đổi trong vách tế bào [2], [3] và chu kỳ tế bào [4], [5] đã được làm sáng tỏ chi tiết. Quá trình phân chia mạnh mẽ và tăng sinh của tế bào thực vật đã được quan sát rõ ràng dưới điều kiện MG [4], [5], các phản ứng sinh lý, đặc biệt là sự phân bố/dịch chuyển của các tế bào sỏi thăng bằng (statolith), quá trình quang hợp và sự biến dạng của các hạt tinh bột đã được báo cáo [6], [7]. Sự thay đổi sinh hóa cụ thể là thay đổi hàm lượng chlorophyll, thay đổi vị trí các hormone thực vật và cân bằng nội môi canxi trong tế bào để đáp ứng không trọng lực đã được ghi

nhận rõ ràng [8], [9]. Các kiến thức thu được thông qua các thí nghiệm này đã được ứng dụng thành công với việc trồng cây Xà lách của Cơ quan hàng không và vũ trụ Hoa Kỳ (NASA) trên Trạm Vũ trụ quốc tế (ISS) để góp phần bổ ích vào chế độ ăn uống của phi hành đoàn.

Bên cạnh đó, kết quả từ Chương trình Hạt giống không gian cho tương lai Châu Á giai đoạn 2010 – 2011 cho thấy việc xử lý hạt giống ở môi trường MG rồi đem về gieo trồng ở mặt đất đã cho thấy hạt giống được kích thích nảy mầm nhiều hơn và tăng khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp trong cây. Điều này mở ra tiềm năng to lớn cho lĩnh vực công nghệ sinh học trong việc chọn tạo giống mới cũng như sản xuất sinh khối và thu nhận các dược chất quý phục vụ cho công nghiệp dược phẩm [10].

Tuy nhiên, đa số các nghiên cứu kể trên được thực hiện trong không gian đòi hỏi trình độ kỹ thuật chuyên môn cao từ các nhà khoa học, các chế độ kiểm soát nghiêm ngặt cũng như cơ sở vật chất hiện đại nên bị giới hạn trong phạm vi một số cường quốc về không gian. Các quốc gia đang phát triển như Việt Nam chưa có đủ tiềm lực về kinh tế và trình độ khoa học kỹ thuật để thực hiện các nghiên cứu trong điều kiện này. Vì vậy, việc lựa chọn một giải pháp khả thi hơn đã được thúc đẩy bằng cách sử dụng thiết bị mô phỏng đặt trên mặt đất để thay thế cho điều kiện không trọng lực thực trong không gian được xem là phù hợp cho việc nghiên cứu chủ động và dài hạn trong bối cảnh khoa học vũ trụ còn rất non trẻ của nước nhà. Đặc biệt, việc nghiên cứu để tìm hiểu quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng của thực vật bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực là phương pháp thích hợp cho việc ghi nhận vai trò của không trọng lực ở các giai đoạn sớm trong chu trình sống của thực vật. Từ đó, ứng dụng vào công tác vi nhân giống và sản xuất sinh khối thực vật, cũng như cung cấp thêm các tri thức mới cho sứ mệnh chinh phục không gian của loài người bằng việc tạo ra các hệ thống sinh học hỗ trợ sự sống bên ngoài Trái Đất.

Đề tài "**Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* của một số cây trồng có giá trị kinh tế dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực**" là hướng nghiên cứu mới trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Nghiên cứu được thực hiện trên ba loại cây trồng đại diện cho nhóm cây hoa cảnh (Thu hải đường), cây ăn trái (Dâu tây) và cây dược liệu (Diệp hạ châu đắng) đã được khẳng

định có giá trị kinh tế cao cũng như kỳ vọng chúng là các giống cây trồng có khả năng đáp ứng được nhu cầu cơ bản về dinh dưỡng, sức khỏe và tinh thần cho con người khi sống bên ngoài Trái Đất.

Mục tiêu của đề tài

Mục tiêu tổng quát

Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện SMG lên quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* của mẫu cấy cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng.

Mục tiêu cụ thể

Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện SMG lên các con đường phát sinh hình thái của mẫu cấy cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng.

Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng, tỷ lệ hormone nội sinh và chuyển hóa năng lượng trong quá trình phát sinh hình thái của mẫu cấy cây hoa Thu hải đường; hàm lượng, tỷ lệ hormone nội sinh và hoạt tính enzyme kháng oxy hóa của mẫu cấy cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng; khả năng tích lũy hợp chất thứ cấp của mẫu cấy cây Diệp hạ châu đắng.

Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở điều kiện trọng lực thực của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và sự gia tăng sinh khối của mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đối tượng nghiên cứu

Ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực được tạo ra bởi thiết bị Clinostat 2-D với vòng quay 2 vòng/phút (rpm - revolutions per minute) đến quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng.

Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu về các con đường phát sinh hình thái cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng dưới điều kiện SMG.

Nghiên cứu về sự thay đổi hàm lượng và tỷ lệ hormone nội sinh, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa, tích lũy hợp chất thứ cấp và chuyển hóa năng lượng trong quá trình phát sinh hình thái cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng dưới điều kiện SMG.

Nghiên cứu về sự sinh trưởng ở điều kiện trọng lực thực của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Ý nghĩa khoa học

Luận án này được thực hiện với sự kết hợp liên ngành khoa học sự sống và khoa học vũ trụ bằng việc ứng dụng hệ thống Clinostat 2-D để tạo ra môi trường SMG nhằm đánh giá được vai trò của MG đối với sự phát sinh và sinh trưởng *in vitro* của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng. Kết quả của luận án cho thấy dưới điều kiện stress trọng lực, thực vật đã có những thay đổi về mặt sinh lý, sinh hóa phù hợp theo từng đối tượng để thích nghi. Kết quả này là dẫn liệu tham khảo có giá trị trong nghiên cứu và giảng dạy lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật.

Ý nghĩa thực tiễn

Luận án đã cho thấy quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng không những diễn ra bình thường mà thậm chí một số chỉ tiêu tỏ ra ưu việt hơn dưới điều kiện MG. Kết quả này gợi mở hướng nghiên cứu công nghệ sinh học thực vật trong môi trường không trọng lực phù hợp với điều kiện của các quốc gia đang phát triển như Việt Nam nhằm nâng cao chất lượng vi nhân giống cây trồng cũng như làm nền tảng cho việc thiết lập các hệ sinh thái nông nghiệp vũ trụ trong tương lai.

Những đóng góp mới của luận án

Kết quả thu được cho thấy điều kiện SMG dẫn tới các con đường phát sinh hình thái khác nhau của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng. Các đối tượng thực vật trong nghiên cứu đã có những thay đổi về sinh lý, sinh hóa để đáp ứng thích nghi với điều kiện trọng lực bị thay đổi. Ngoài ra, các mẫu cấy phát sinh hình thái *in vitro* dưới điều kiện SMG khi được đưa về nuôi cấy ở điều kiện trọng lực thực có sự sinh trưởng diễn ra bình thường, thậm chí một số chỉ tiêu tỏ ra ưu việt hơn so với đối chứng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Thực vật và trọng lực

Trong hàng triệu năm tiến hóa và phát triển sự sống trên Trái Đất, mọi sinh vật sống liên tục chịu ảnh hưởng của trọng lực. Do đó, trọng lực hoạt động như một nguồn tín hiệu chi phối tất cả các hoạt động sống và trao đổi chất, thậm chí cả sự sinh sản và tuổi thọ của các sinh vật, bao gồm cả thực vật. Thực vật đã sử dụng trọng lực như một nguồn tín hiệu ổn định và đáng tin cậy nhất cho sự sống sót của chúng [11]. Tính hướng trọng lực hay là phản ứng định hướng sự phát triển của thực vật so với trọng lực đóng vai trò lớn trong việc xác định hướng cũng như hình dạng cấu trúc của cây. Lực hấp dẫn được chia thành ba giai đoạn: 1) Cảm nhận vector trọng lực của các tế bào chuyên biệt; 2) Sự truyền tín hiệu sinh hóa từ các tế bào chuyên biệt nhận biết trọng lực đến vùng kéo dài; 3) Sự phát triển khác biệt ở vùng kéo dài để định hướng phát triển liên quan đến vectơ trọng lực [12]. Ở rễ, sự định hướng này thường theo hướng của vectơ trọng lực (hướng trọng lực dương), trong khi ở các bộ phận khác của thực vật trên mặt đất, sự phát triển nói chung ngược với vector trọng lực (hướng trọng lực âm).

Các quan sát về hướng động của thực vật xảy ra vào thời kỳ Cổ đại khi học trò của Aristotle quan sát phản ứng hướng quang và đã đưa ra nhận định sai lầm khi cho rằng hiện tượng uốn cong là do một bên của thực vật bị khô [13]. Vào năm 1806, Knight thực hiện một thí nghiệm bằng việc sử dụng bánh xe quay để quan sát sự nảy mầm của hạt giống trong điều kiện vectơ trọng lực bị thay đổi, đây có thể xem là một nghiên cứu đầu tiên về tác động của điều kiện không trọng lực lên thực vật [14]. Knight phát hiện ra rằng những cây con mọc trên bánh xe quay vuông góc với vectơ trọng lực sẽ định vị rễ của chúng hướng về tâm của bánh xe và kết luận rằng trọng lực chịu trách nhiệm một phần cho sự định hướng của cây. Sự hiểu biết hiện tại của chúng ta về phản ứng của trọng lực với thực vật bắt đầu được hoàn thiện vào cuối những năm 1800 khi Charles và Francis Darwin xuất bản cuốn sách "Sức mạnh của sự chuyển động ở thực vật" [15]. Trong cuốn sách này, Darwin đã mô tả chi tiết các chuyển động qua trung gian tăng trưởng của thực vật và cung cấp nền tảng để hiểu các cơ chế chịu trách nhiệm về phản ứng của thực vật với các kích thích bên ngoài. Công trình này cũng đã đưa ra giả thuyết về một yếu tố tín hiệu có

khả năng di chuyển từ vị trí bị kích thích đến vị trí đáp ứng. Giả thiết này cuối cùng đã dẫn tới việc xác định được các hormone thực vật như auxin [12].

Hướng theo vectơ trọng lực cho phép rễ phát triển bám chắc xuống đất và tạo điều kiện cho việc hấp thu nước và các ion khoáng cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của thực vật [16]. Hoson và Wakabayashi (2015) đã báo cáo rằng trọng lực là nguồn tín hiệu để kích thích sinh tổng hợp và trùng hợp các thành phần của vách tế bào để giúp thực vật đủ khả năng tự hỗ trợ trọng lượng của chúng [11]. Nghiên cứu lĩnh vực này không chỉ dừng lại trong vấn đề đóng góp cho ngành khoa học cơ bản và nâng cao hiểu biết của con người về tương tác giữa thực vật và trọng lực, mà còn được cho là rất cần thiết cho các chương trình thám hiểm không gian; trong đó, việc thiết kế và xây dựng các hệ thống hỗ trợ sự sống thành công sẽ là điều bắt buộc trong các chuyến bay dài hạn [5].

1.2. Điều kiện không trọng lực thực và mô phỏng không trọng lực

1.2.1. Điều kiện không trọng lực thực

Điều kiện không trọng lực thực (True microgravity - TMG) là một thuật ngữ dùng để mô tả trọng lực ở giá trị vô cùng nhỏ (10^{-2} - 10^{-6} g) so sánh với trọng lực tiêu chuẩn trên bề mặt Trái Đất (1 g). Điều kiện này có thể đạt được trong các chuyến bay vào không gian bằng tàu vũ trụ [17] hoặc trong các vệ tinh và tên lửa được phóng từ Trái Đất vào vũ trụ [18].

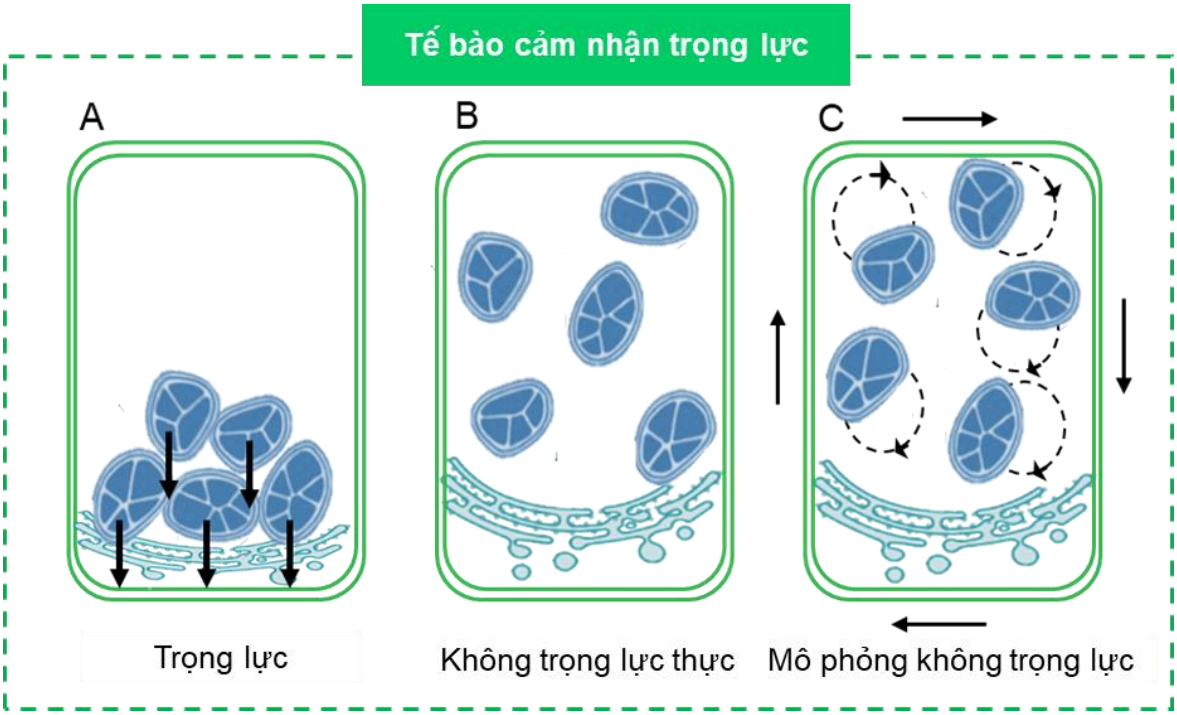
Mọi vật đều có lực hấp dẫn, đó là loại lực được biết là có khả năng hút mọi vật thể về phía nó, đây là lý do quỹ đạo của Trái Đất quay quanh Mặt Trời hoặc Mặt Trăng quay quanh Trái Đất được giữ ổn định. Tuy nhiên, lực hấp dẫn tỷ lệ nghịch với khoảng cách, do đó lực này càng yếu đi khi khoảng cách giữa các vật càng lớn. Trong điều kiện không gian, chỉ còn một lượng rất nhỏ trọng lực được tìm thấy nên đa số ý kiến đều thống nhất rằng có thể xem điều kiện không gian không có trọng lực.

Nghiên cứu sinh học trong điều kiện TMG rõ ràng đòi hỏi trình độ kỹ thuật chuyên môn cao từ các nhà khoa học cũng như các thiết bị cơ sở vật chất hiện đại gắn liền với nền kinh tế phát triển của một quốc gia. Các nước đang phát triển như Việt Nam chưa đủ tiềm lực cả về mặt khoa học và kinh tế để thực hiện các nghiên cứu trong điều kiện này. Brungs và cộng sự (2016) đã báo cáo rằng việc tiếp cận hạn chế với các chuyến bay vào vũ trụ và tốn kém kinh phí đã thúc đẩy sự tìm kiếm

giải pháp để đạt được điều kiện không trọng lực (Microgravity - MG) trên mặt đất ở mức độ có thể chấp nhận. Do đó, các cơ sở thiết bị để mô phỏng điều kiện MG trên mặt đất đã và đang được xem là một phương pháp phù hợp cho các nghiên cứu sinh học chủ động và dài hạn [19].

1.2.2. Điều kiện mô phỏng không trọng lực

Thuật ngữ "mô phỏng không trọng lực" (Simulated microgravity - SMG) được áp dụng đối với các thí nghiệm sử dụng hệ thống mô phỏng, bao gồm các thông số tạo ra sự mô phỏng (kích thước và hình dạng buồng chứa mẫu, chế độ hoạt động, tốc độ quay hay đường kính ống) [20]. Điều này xuất phát từ việc tiếp cận hạn chế các chuyến bay vào vũ trụ với với yêu cầu trình độ khoa học kỹ thuật cao và chi phí đắt đỏ. Do đó, việc tìm ra giải pháp thay thế bằng cách sử dụng các thiết bị mô phỏng không trọng lực được xem là rất khả thi cho các nghiên cứu sinh học [19].



Hình 1.1. Sự lắng đọng của các lạp bột trong điều kiện trọng lực, TMG và SMG
A: Sự lắng đọng của lạp bột bởi trọng lực; **B:** Sự phân tán tự do của lạp bột trong điều kiện không trọng lực thực; **C:** Chuyển động quanh bản thân của lạp bột trong điều kiện mô phỏng không trọng lực.

Cơ quan vũ trụ châu Âu (ESA), Cơ quan nghiên cứu và phát triển hàng không vũ trụ Nhật Bản (JAXA), Cơ quan vũ trụ và hàng không Hoa Kỳ (NASA) đã chế tạo ra nhiều loại thiết bị SMG như Clinostat 2-D (two-Dimensional Clinostat), Clinostat 3-D (three-Dimensional Clinostat), máy định vị ngẫu nhiên (Random

positioning machine - RPM), thiết bị tạo lực nâng từ trường (Magnetic levitation),... có các thông số kỹ thuật cụ thể (Bảng 1.1) với mục đích cung cấp và hỗ trợ thiết bị cho các nước có nền khoa học chưa phát triển phục vụ công tác nghiên cứu khoa học MG. Nguyên lý chung của các thiết bị này phân bố ngẫu nhiên sự định hướng trọng lực của Trái Đất lên mẫu vật, từ đó các mẫu được xử lý không cảm nhận được tác động của trọng lực và sẽ có các biểu hiện tương tự điều kiện TMG trong không gian (Hình 1.1); do đó, tốc độ xoay của thiết bị mô phỏng buộc phải nhanh hơn quá trình sinh học được nghiên cứu của mẫu vật, nhưng không nhanh đến mức làm cho các lực khác được đưa vào, ví dụ như lực ly tâm [21].

1.2.2.1. Clinostat 2-D và 3-D

Hệ thống Clinostat là một trong những thiết bị SMG được phát minh vào thế kỷ 19. Đây là các thiết bị quay và chủ yếu được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên thực vật. Tất cả các dạng Clinostat đều có hệ thống chứa mẫu vật nằm quay vuông góc với trường trọng lực để cản trở việc chúng nhận biết được vector gia tốc trọng trường của Trái Đất.

Clinostat 2-D là một thiết bị chứa các mẫu được đặt ở trung tâm của vòng quay và được xoay liên tục quanh một trục vuông góc với hướng của vectơ trọng lực. Từ rất sớm Clinostat 2-D được sử dụng phổ biến cho mục đích nghiên cứu sinh học trong điều kiện SMG nhằm chứng minh stress SMG đến sự thay đổi hàm lượng protein hòa tan trong lá cây Đậu răng ngựa (*Vicia faba* L.) [22]; nghiên cứu dữ liệu proteomic để phân tích các phản ứng của tế bào mô sẹo *Arabidopsis thaliana* L. dưới ảnh hưởng SMG [23]; đánh giá xu hướng tiết kiệm năng lượng và cải thiện các hoạt động trao đổi chất theo chiều hướng chống chịu và thích nghi với stress MG của tế bào cây Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) [24].

Clinostat 3-D là một thiết bị SMG ba chiều gồm có hai trục xoay độc lập vuông góc với nhau với tốc độ như nhau và một hướng không đổi. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng thiết bị này cho mục đích nghiên cứu sinh lý thực vật dưới điều kiện SMG trên một số đối tượng cây trồng như cây Cải xoong (*Nasturtium officinale*) [25]; cây đậu Hà Lan (*Pisum sativum* L.) và cây Bắp (*Zea mays* L.) [26]; cây *Arabidopsis thaliana* L. [17]. Từ những kết quả trên cho thấy Clinostat đã và đang vẫn là thiết bị đơn giản và phù hợp cho mục đích nghiên cứu sinh học thực vật dưới điều kiện SMG trọng lực. Tuy nhiên, cần lưu ý chất lượng mô phỏng phụ

thuộc vào tốc độ quay, đường kính và thời gian xử lý mẫu [27] cũng như đối tượng được thí nghiệm và loại thiết bị [28].

1.2.2.2. Máy định vị ngẫu nhiên

Máy định vị ngẫu nhiên được mô tả đơn giản là thiết bị SMG mà trong đó các mẫu sinh học được quay hoàn toàn ngẫu nhiên quanh hai trục, do đó hướng trọng lực được thay đổi định hướng liên tục trên bề mặt mẫu được xử lý, điều quan trọng nhất về nguyên lý mô phỏng cũng như tên của thiết bị là sự chuyển động của mẫu sẽ hoàn toàn ngẫu nhiên và hoàn toàn không lặp lại theo bất kỳ quỹ đạo hay chu kỳ. Để đạt được sự ngẫu nhiên này thiết bị được kết nối với bộ điều khiển đã lập trình các thuật toán cần thiết; mặc dù có sự ngẫu nhiên về hướng, tốc độ nhưng vẫn có thể xem RPM là một phiên bản khác của Clinostat 3-D.

Tương tự như Clinostat, RPM đã và vẫn đang là thiết bị hữu ích cho các thí nghiệm nghiên cứu thực vật dưới điều kiện SMG. Kraft và cộng sự (2000) đã so sánh sự thay đổi và phân bố các plastid trong tế bào columella (tế bào nhận biết trọng lực có vị trí gần chóp rễ) cây *Arabidopsis thaliana* L. trong trường hợp SMG từ máy RPM cho kết quả tương tự với điều kiện TMG [29]. Barjaktarović và cộng sự (2007) đã báo cáo rằng có sự khác biệt về hiệu quả SMG giữa Clinostat và RPM lên sự thay đổi số lượng protein trong các tế bào mô sẹo cây *Arabidopsis thaliana* L. [30]. Gần đây, Faraoni và cộng sự (2019) đã nghiên cứu chu trình glyoxylate trong suốt quá trình nảy mầm của hạt giống cây Thông (*Pinus pinea*) dưới điều kiện trọng lực thay đổi sử dụng thiết bị RPM [31].

Bảng 1.1. So sánh các thông số kỹ thuật của một số thiết bị SMG [32]

Thông số kỹ thuật	**Clinostat 2-D**	**RPM để bàn**	**RPM kích thước đầy đủ**
Kích thước (cm)	25 × 25 × 25	30 × 30 × 30	45 × 45 × 45
Số trục quay	1	2	2
Tốc độ quay (rpm)	1 - 20 ± 0,5 20 - 90 ± 5	Tùy thuộc vào phương thức hoạt động	
Góc trục quay	0 - 90º		
Kích thước mẫu thí nghiệm (cm)	Đường kính 10 × 10	12 × 12 × 14	45 × 45 × 30

Khối lượng mẫu thí nghiệm (kg)	0,5	1,5	10
Kết nối	Không tích hợp	Dòng điện 12 - 15V, giao diện truyền tín hiệu kỹ thuật số RS232 (422) kết nối với video và máy ảnh.	

Nhìn chung, có thể thấy các nghiên cứu về vai trò của trọng lực đối với thực vật có thể được thực hiện dưới sự hiện diện của trọng lực (1 g) hoặc dưới điều kiện trọng lực thay đổi. Các nghiên cứu về phản ứng của thực vật dưới điều kiện trọng lực thay đổi đặc biệt là dưới điều kiện MG được xem như một phương pháp hữu hiệu, một hướng giải quyết mới cho mục đích tìm hiểu các cơ chế, chứng minh các giả thiết về vai trò của trọng lực với thực vật góp phần thúc đẩy ngành khoa học cơ bản cũng như ngành khoa học vũ trụ phát triển. Vì vậy, trong nghiên cứu này các mẫu cấy được nuôi vô trùng trong các đĩa petri và cố định trên trục của Clinostat 2-D cho mục đích SMG.

1.3. Quá trình phát sinh hình thái của thực vật dưới điều kiện MG

Phát sinh hình thái thực vật là một quá trình sinh học mà sự phát triển và biệt hóa của tế bào dẫn đến sự hình thành cấu trúc hoặc hình thái của mô, cơ quan đơn lẻ hoặc cơ thể hoàn chỉnh [33]. Quá trình sinh học này của thực vật trong hơn 400 triệu năm tiến hóa của chúng đã sử dụng trọng lực như một tín hiệu đáng tin cậy nhất. Tuy nhiên, điều quan trọng là việc làm rõ cách trọng lực quy định quá trình phát sinh hình thái của thực vật dường như đã bị lãng quên. Do đó, việc nghiên cứu thực vật trong điều kiện trọng lực bị thay đổi có thể trả lời câu hỏi trọng lực đã tác động như thế nào tới quá trình phát sinh hình thái của chúng [34].

Phát sinh hình thái của thực vật dưới điều kiện MG đã được bắt đầu nghiên cứu vào cuối thế kỷ 20 bằng báo cáo của Hoson và cộng sự (1999); theo đó, hạt của cây Lúa (*Oryza sativa*) và hạt cây *Arabidopsis thaliana* L. đã được gieo trồng trên chuyến bay vào vũ trụ của tàu con thoi. Kết quả cho thấy, hình thái của lá mầm và rễ cây Lúa (*Oryza sativa*) trên không gian có sự thay đổi so với đối chứng trên mặt đất; cụ thể lá mầm bị uốn cong và rễ phát triển theo nhiều hướng khác nhau ở điều kiện MG; trong khi ở điều kiện đối chứng, lá mọc lên trên và rễ hướng xuống dọc theo vectơ trọng lực. Đối với cây *Arabidopsis thaliana* L., các lá mầm vươn dài lên trên ở điều kiện mặt đất, trong khi kéo dài ra theo nhiều hướng khác nhau ở điều

kiện MG. Mặt khác, rễ cây *Arabidopsis thaliana* L. mọc dọc theo bề mặt của đĩa thạch mà không thấy mọc trong môi trường thạch [34].

Gần đây, hạt của cây Đậu đỏ (*Vigna angularis*) khi gieo trên không gian đã cho thấy lá mầm hướng xiên lên trên so với lá mầm hướng thẳng đứng ở điều kiện mặt đất. Chiều dài của trụ trên lá mầm trong không gian rất khác nhau, nhưng tỷ lệ cây con có trụ trên lá mầm cao hơn đối chứng. Kết quả này chỉ ra rằng sự phát sinh hình thái và sinh trưởng được biến đổi trong điều kiện MG trong không gian. Ngoài ra các trụ trên lá mầm được trồng trong không gian có khả năng chống uốn cong tốt hơn so với đối chứng. Điều này được giải thích rằng trong điều kiện MG, nơi thực vật không phải chống lại lực hấp dẫn, hình dạng cơ thể và độ cứng của vách tế bào có thể bị thay đổi [35].

Có thể nhận thấy rằng, mặc dù việc nghiên cứu về quá trình phát sinh hình thái của thực vật dưới điều kiện MG đã được đề cập hơn 20 năm về trước, tuy nhiên việc bố trí thí nghiệm diễn ra trên không gian gặp nhiều trở ngại về kinh phí và trình độ khoa học kỹ thuật nên các công bố về vấn đề này còn rất hạn chế. Mặt khác, nguồn mẫu thực vật được sử dụng cho các nghiên cứu này đều là hạt giống, tức là phôi hợp tử đã trưởng thành nên khó có thể đánh giá giai đoạn sớm của quá trình phát sinh hình thái trong điều kiện MG. Vì vậy, bằng việc sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào dưới điều kiện SMG để nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái sẽ khắc phục được các vấn đề còn tồn tại nêu trên.

1.4. Quá trình sinh trưởng của thực vật dưới điều kiện MG

Sự tăng sinh tế bào thực vật được tiến hóa cùng với sự thay đổi của điều kiện trọng lực trên Trái Đất, bắt đầu bằng việc chuyển từ môi trường sống dưới nước lên trên cạn. Thông thường, sự phát triển của tế bào được xác định bởi ribosome hình thành thông qua các nhân con và tốc độ sản sinh của tế bào theo số lượng tế bào trên milimet. Các nghiên cứu được thực hiện với cây con *Arabidopsis thaliana* L. được trồng trong điều kiện TMG đã cho thấy sự tăng sinh tế bào vỏ rễ được tăng cường. Đặc biệt, tế bào biểu bì của mô phân sinh rễ dài hơn với các nhân con lớn hơn, trong khi đó, các tế bào vỏ có rất nhiều nhân con nhỏ hơn và ít hoạt động hơn trong điều kiện MG. Vì vậy, nó đã cho thấy rằng mức độ giảm tổng hợp ribosome trong các điều kiện MG là kết quả của chu kỳ tế bào được tăng tốc [5]. Tương tự, các nghiên cứu trong cả TMG trên ISS và SMG trên RPM cho thấy tăng sinh tế bào

được tăng cường nhưng sự phát triển tế bào bị suy giảm [36]. Ở trong một thí nghiệm khác, tế bào mô phân sinh rễ của cây *Arabidopsis thaliana* L. phát triển trong điều kiện SMG bằng cách sử dụng Clinostat và RPM cho thấy những thay đổi đáng kể về tốc độ tăng sinh tế bào và sự tiến triển của chu kỳ tế bào cùng với việc giảm sự phát triển của tế bào [37]. Gần đây hơn, trong một nghiên cứu đã báo cáo rằng các mô phân sinh rễ 4 ngày tuổi của *Arabidopsis thaliana* L. trong điều kiện SMG (sử dụng RPM) ở trọng lực Mặt Trăng (0,17g) và trọng lực Sao Hỏa (0,38g) cho thấy sự tăng sinh của tế bào và giảm sự phát triển của tế bào trong điều kiện trọng lực của Mặt Trăng; tuy nhiên, không có những thay đổi như vậy được ghi nhận trong điều kiện trọng lực của Sao Hỏa [38].

Sự tăng sinh tế bào thực vật được cho rằng do sự kiểm soát tích cực của điều kiện MG. Đã có nhiều báo cáo góp phần làm rõ vấn đề này như gia tăng tốc độ tăng sinh của đỉnh sinh trưởng rễ *Arabidopsis thaliana* L. dưới điều kiện MG [5]; gia tăng đáng kể về sinh khối của các dòng tế bào cây Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) khi được nuôi dưới điều kiện SMG [24]; tăng tốc chu kỳ tế bào đỉnh sinh trưởng rễ cây *Arabidopsis thaliana* dưới điều kiện MG [39]. Cho đến nay, các nghiên cứu xoay quanh vấn đề làm rõ cơ chế tăng sinh tế bào trong điều kiện không trọng lực [24] đã chứng minh rằng trên mặt đất, các tế bào thực vật phải tiêu tốn năng lượng để duy trì cân bằng nội môi theo hướng chống lại trọng lực. Trong điều kiện MG, năng lượng đó có thể được tiết kiệm cho quá trình khác như sinh tổng hợp các chất chuyển hóa có lợi cho sự tăng trưởng. Ngoài ra, điều kiện MG gây ra stress lực hấp dẫn cho phép các tế bào đi vào quá trình nguyên phân trước khi đạt được kích thước tới hạn [37]. Một cơ chế khác được giải thích dựa trên cấu trúc vách tế bào, bởi vách tế bào thực vật đóng vai trò chủ chốt trong việc điều khiển các hoạt động phát triển và phát sinh hình thái trong cơ thể thực vật [11]. Ở một nghiên cứu khác cho thấy, dưới điều kiện MG đã có sự nới lỏng vách tế bào thúc đẩy sự tăng sinh [40]. Tín hiệu trọng lực được cảm nhận bởi các thụ thể đặc biệt nằm trên màng tế bào; sau đó chúng sẽ tiếp tục bị biến đổi và truyền đến nhân tế bào thông qua sự liên kết về mặt cấu trúc hoặc sinh lý của bề mặt vi ống và màng tế bào. Cuối cùng chúng sẽ tạo ra biểu hiện của các gen khác nhau và ảnh hưởng đến sự hình thành và cấu trúc của các thành phần tế bào khác nhau. Kết quả là các thành phần của vách tế bào thực vật được chuyển hóa như cellulose, chất nền polysaccharide và phenolic được

tổng hợp. Cùng lúc này, tín hiệu trọng lực bị biến đổi có thể được truyền qua màng tế bào và trực tiếp thay đổi hoạt động của các bơm proton hoặc kênh ion để tạo ra môi trường vách tế bào. Ngoài ra, tín hiệu trọng lực bị biến đổi gây ra sự tái định hướng của vi ống có thể dẫn đến sự sắp xếp cellulose, sửa đổi môi trường, thay đổi quá trình chuyển hóa các thành phần để sinh tổng hợp vách tế bào. Ngược lại, dưới điều kiện trọng lực thay đổi, điển hình là điều kiện MG sẽ dẫn đến hậu quả vách tế bào bị nới lỏng, từ đó tạo nên theo chiều hướng có lợi cho sự tăng sinh tế bào [11].

Ở cấp độ cơ thể, MG cũng là một môi trường mới lạ đối với quá trình tiến hóa, gây ra những thay đổi đáng kể về kiểu hình của thực vật đã được một số nhóm nghiên cứu công bố. Cây Đậu tương (*Glycine max*) được trồng trên Trạm Vũ trụ quốc tế (ISS) và điều kiện SMG cho thấy chiều dài rễ chính và rễ bên tăng hơn so với đối chứng trên mặt đất [41]. Trong một thí nghiệm khác trên ISS, cây Xà lách rocket (*Eruca sativa* Mill.) cho thấy cây con dài ra nhưng mỏng hơn so với đối chứng 1g trên mặt đất (G) [42]. Hạt của cây Xà lách rocket (*Eruca sativa* Mill.) được gieo trên ISS cho thấy sự phát triển ngẫu nhiên của rễ cây con trong điều kiện tối, trong khi đó ở điều kiện sáng rễ cây con phát triển theo trật tự nhất định [43]. Một kiểu hình thú vị đã được nhìn thấy khi bố trí thí nghiệm gieo hạt Súp lơ (*Brassica oleracea* L.) và Cải xanh (*Brassica juncea* L.) và trồng ở điều kiện MG trên vệ tinh quay quanh Trái Đất trong 18 ngày. Theo đó, trong số 12 cây Súp lơ đã trồng có 2 cây cho kết quả tăng đáng kể trọng lượng đầu hoa, kích thước cây và sức đề kháng với bệnh thối đen. Tuy nhiên, ở cây Cải xanh không cho thấy bất kỳ sự thay đổi kiểu hình nào như vậy [44]. Ở một thí nghiệm khác trong điều kiện MG, cây Rau diếp (*Lactuca sativa* L.) phát triển cao hơn với lá xanh đậm so với điều kiện G [45].

Cây Lúa (*Oryza sativa*) được trồng trên môi trường thạch và đặt ở điều kiện SMG của thiết bị Clinostat trong 6 ngày với nhiệt độ không đổi 20ºC, ánh sáng 110 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ và độ ẩm hơn 90% cho thấy sự gia tăng đáng kể về chiều dài chồi, nhưng không tăng chiều dài rễ [46]. Cây Cải dầu (*Brassica napus*) nuôi cấy trên Clinostat (1 rpm) có biểu hiện kiểu hình rễ sơ cấp dài, mảnh cho thấy ảnh hưởng của sự quay trục theo phương ngang của Clinostat [47]. Tương tự, Nakajima và đồng tác giả (2019) cho rằng điều kiện SMG (Clinostat - 2 rpm) kích thích sự kéo dài chồi và rễ của cây Đậu xanh (*Vigna radiata* L.) sau khi gieo 4 ngày [48].

Trong dự án khoa học nghiên cứu tác động của điều kiện MG đến khả năng bảo quản hạt giống Xà lách rocket (*Eruca sativa* Mill.) được lưu trữ trên ISS trong 6 tháng đã báo báo rằng không có tác động nào đến khả năng tồn tại hạt giống và sự phát triển của cây con; mặc dù sức sống nảy mầm của hạt giảm và sự lão hóa tăng lên so với hạt giống được lưu trữ trên Trái Đất [49]. Ở trong một nghiên cứu khác gần đây, hạt cây Lúa (*Oryza sativa*) dưới điều kiện ánh sáng vũ trụ quay quanh quỹ đạo trong 12,5 ngày cho thấy giảm tỷ lệ nảy mầm và chiều cao cây [50]. Ngược lại, hạt giống cây Đậu bướm (*Vigna aconitifolia*) gieo trong Clinostat (2 rpm, trong 36 giờ) cho thấy tỷ lệ nảy mầm, sức sống của hạt và chiều cao cây được tăng cường đáng kể [51]. Hạt giống cây Bóng nước (*Impatiens balsamina*) được gửi lên ISS trong 6 tháng rồi mang trở về Trái Đất để nghiên cứu về khả năng nảy mầm của chúng cho thấy sau khi chịu tác động của môi trường MG đã gia tăng tỷ lệ nảy mầm gấp 2 lần so với môi trường G [10].

Trong một nghiên cứu khác, thiết bị Clinostat 2-D tỏ ra hiệu quả trong việc nâng cao hiệu quả nhân nhanh chồi từ đốt thân cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn.) với các chỉ tiêu chiều cao cây, chiều dài đốt, số rễ, chiều dài rễ cao hơn và số ngày ra hoa sớm hơn điều kiện G [52]. Tương tự, trên đối tượng cây Sâm bố chính hoa đỏ (*Hibiscus sagittifolius* Kurz.) nuôi cấy *in vitro*, khả năng nảy mầm, sinh trưởng, phát triển dưới điều kiện SMG là hiệu quả hơn so với điều kiện G [53].

Tóm lại, bằng cách bố trí các thí nghiệm ở điều kiện TMG và SMG, kết quả của các nghiên cứu cho thấy rằng điều kiện MG đã có những tác động rõ rệt đến quá trình nảy mầm, sinh trưởng và phát triển của thực vật. Tuy nhiên, đa số các thí nghiệm được bố trí ở điều kiện TMG nên tốn kém về chi phí và có thể chịu tác động bởi các yếu tố gây nhiễu như bức xạ không gian. Vì vậy, việc nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự sinh trưởng của thực vật mở ra nhiều triển vọng trong việc tiết kiệm thời gian, chi phí và hạn chế các tác động không mong muốn làm sai lệch kết quả thí nghiệm.

1.5. Sự thay đổi sinh lý và sinh hóa của thực vật dưới điều kiện MG

Về sự thay đổi sinh lý của thực vật, hàm lượng chlorophyll là một trong những thông số bị ảnh hưởng mạnh mẽ bởi tác động của điều kiện MG. Hầu hết các nghiên cứu cho thấy sự ảnh hưởng tích cực của điều kiện này lên sự gia tăng hàm lượng

chlorophyll trong lá cây Lúa (*Oryza sativa*) và Lúa mì lùn (*Triticum aestivum*) [54]. Đã có giải thích hợp lý cho việc thay đổi và tăng hàm lượng chlorophyll này là do thể tích của màng thylakoid và chất nền stroma trong mỗi lục lạp và ty thể tăng lên đáng kể dưới điều kiện SMG [54]. Tương tự, cây Lúa (*Oryza sativa*) trong điều kiện Clinostat ở tốc độ 2 rpm (3, 5 và 7 ngày) làm tăng nhanh chóng hàm lượng chlorophyll, nhưng khi thời gian nuôi cấy tăng lên làm hàm lượng chlorophyll giảm dần [9]. Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả báo cáo rằng, hàm lượng chlorophyll trong lá của cây Bóng nước (*Impatiens balsamina*) có nguồn gốc từ điều kiện TMG cao hơn so với điều kiện G [10]. Sự tăng giảm của hàm lượng chlorophyll ở các đối tượng nghiên cứu kể trên được lý giải bằng các quá trình sinh học liên quan đến lục lạp dưới điều kiện SMG hoặc MG. Tùy theo đối tượng, môi trường và thời gian xử lý trong mỗi thí nghiệm, tính thấm proton của thylakoid có thể tăng hoặc giảm, cấu trúc siêu lục lạp có thể bị biến đổi như mật độ electron và hạt tinh bột trong chất nền. Ngoài ra còn có sự thay đổi đáng kể về độ uốn cong hoặc sự sắp xếp lỏng lẻo của màng thylakoid đã ảnh hưởng đến hình thái của lục lạp, kéo theo sự tăng giảm hàm lượng chlorophyll dưới điều kiện SMG hoặc MG [9].

Sự thay đổi trong vectơ trọng lực được sinh lý nội bào và các tín hiệu sinh hóa của thực vật nhận diện và đáp ứng [55]. Một trong những yếu tố chính ảnh hưởng đến các quá trình sinh hóa và sinh lý ở thực vật là hệ thống phytochrome – công tắc ánh sáng sinh học bao gồm các tế bào cảm quang theo dõi sự thay đổi cường độ, thời gian và màu sắc ánh sáng. Các thụ thể phytochrome liên kết chất mang màu tetrapyrrole và hiện diện trong hai dạng chuyển đổi quang học là dạng hấp thụ ánh sáng đỏ (không hoạt động) và dạng hấp thụ ánh sáng đỏ xa (hoạt động). Khi nghiên cứu các cây con *Arabidopsis thaliana* L. trồng trên ISS cho thấy một phản ứng hướng sáng tích cực với ánh sáng đỏ mà không rõ ràng trong điều kiện G nên người ta cho rằng ít nhất một số loài thực vật có hoa vẫn xảy ra hiện tượng hướng sáng với ánh sáng đỏ dưới điều kiện MG [56]. Một đáp ứng tương tự với ánh sáng đỏ cũng được quan sát thấy ở cây Cải xoong (*Nasturtium officinale*) nuôi cấy dưới thiết bị Clinostat (50 rpm); cụ thể, với sự chiếu sáng đồng thời của ánh sáng đỏ (660 nm) và ánh sáng đỏ xa (735 nm) thì cuống lá phát triển đáng kể, trong khi phiến lá có kiểu hình bình thường. Tuy nhiên, các phiến lá uốn cong và kiểu hình cuống lá bị thay đổi khi được chiếu sáng riêng biệt với ánh sáng đỏ và với ánh sáng đỏ xa [57].

Sự ảnh hưởng của MG đến phức hợp protein của bộ máy quang hợp (Photosystem I và Photosystem II) và chlorophyll đã được nghiên cứu kỹ lưỡng. Ví dụ, cây Cải thảo (*Brassica rapa*) 15 ngày tuổi được trồng trong tàu con thoi Columbia (STS-87) cho thấy số lượng grana trên mỗi lục lạp và màng thylakoid giảm đáng kể và phức hợp Photosystem I và Photosystem II cũng giảm [58]. Trong khi, cây Cải thảo (*Brassica rapa*) được trồng trên tàu con thoi ở một nghiên cứu khác cho thấy hàm lượng chlorophyll gia tăng đáng kể so với G (Tỷ lệ chlorophyll a/b là 3,5 và 2,42; tương ứng) [59]. Điều kiện MG ảnh hưởng đáng kể so với G trong các hoạt động của phức hợp Photosystem I, Photosystem II và toàn bộ chuỗi truyền điện tử của lục lạp ở cây Lúa mì lùn (*Triticum aestivum*) [60]. Tương tự, Tripathy và cộng sự (1996) đã cho thấy, hoạt động của phức hợp Photosystem I và Photosystem II của lục lạp ở Lúa mì lùn (*Triticum aestivum*) giảm 28% [61]. Hoạt động quang hóa của phức hợp Photosystem I cũng giảm khoảng 30% ở cây Cải thảo (*Brassica rapa*) [58]. Nghiên cứu của Jiao và cộng sự (1998) cũng cho kết quả tương tự, phức hợp Photosystem II giảm 16 – 30% ở cây Cải thảo (*Brassica rapa*) trong điều kiện MG [62]. Sự thay đổi hoạt động quang hóa của phức hợp Photosystem I và Photosystem II được giải thích bởi cơ chế đáp ứng stress của thực vật trong điều kiện MG hoặc thực vật bị tiếp xúc với các môi trường nhất thời tạo ra sự dư thừa năng lượng ánh sáng [63].

Nghiên cứu các tác động trọng lực thay đổi lên sự tỏa nhiệt, trao đổi khí và tốc độ quang hợp của các lá Khoai lang (*Ipomoea batatas*), Lúa mạch (*Secale cereale*) và Lá sao trên các chuyến bay parabol cho thấy nhiệt độ lá trung bình tăng 0,9 - 1,0ºC và giảm tỷ lệ quang hợp khi trọng lực giảm từ 1,0 đến 0,01 g. Ngược lại, nhiệt độ lá giảm 0,5ºC và tỷ lệ quang hợp được tăng cường không đáng kể khi tăng mức trọng lực từ 1,0 đến 2,0 g [64]. Bằng cách thực hiện hàng loạt các chuyến bay theo quỹ đạo parabol, Kitaya và đồng tác giả (2004) đã làm rõ ảnh hưởng của sự giảm trọng lực lên quá trình trao đổi khí của lá cây và môi trường xung quanh [65]. Trong một thí nghiệm khác, sau thời gian 20 giây ở điều kiện MG trong chuyến bay theo quỹ đạo parabol, nhiệt độ của lá Khoai lang (*Ipomoea batatas*) và Lúa mạch (*Secale cereale*) tăng lên nhanh chóng với giá trị tối đa tương ứng là 1,9ºC và 1,3ºC. Bằng cách tăng tốc độ khí từ 0,2 m/s lên 1,0 m/s thì nhiệt độ của lá trong cả hai loại cây trên đã hạ xuống [66].

Đối với hiệu suất quang hợp thuần của thực vật, thí nghiệm ở lá Lúa mạch (*Secale cereale*) cho thấy đã giảm 13 – 20% ở điều kiện MG [65]. Trên cây Lúa mì lùn (*Triticum aestivum*) được trồng trong 21 ngày ở cường độ chiếu sáng vừa phải (~300 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) và nồng độ CO_2 cao (1.500 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) trong hệ thống sản xuất sinh khối trên ISS cho thấy tình trạng MG cũng tác động đến hiệu suất quang hợp thuần và sự thoát hơi nước, trong khi không ảnh hưởng đến sự chống chịu và tốc độ trao đổi khí của khí khổng [67].

Vai trò của lạp bột trong thuyết lực hấp dẫn đã được ghi chép rõ ràng trong các tài liệu. Các tế bào sỏi thăng bằng chứa lạp bột giúp tích tụ tinh bột lắng xuống đáy của các tế bào cảm ứng trọng lực, được gọi là tế bào thăng bằng. Quá trình lắng này rất quan trọng trong cơ chế nhận biết trọng lực của thực vật. Cây Vân sam trắng (*Picea glauca*) một năm tuổi được nghiên cứu trong điều kiện MG trên Trạm Vũ trụ Quốc tế (ISS) đã cho thấy sự phân bố ngẫu nhiên của các lạp bột trong tế bào chuyên hóa của chồi và rễ. Tuy nhiên, ở điều kiện đối chứng trên mặt đất, các lạp bột được lắng đọng bền vững ở gốc thân [68]. Việc thí nghiệm với rễ cây *Lepidium sativum* L. ở chuyến bay vệ tinh Bion-11 và Clinostat đã kết luận rằng vị trí các tế bào thăng bằng của một rễ thẳng đứng được điều chỉnh cao bởi trọng lực, và nó bị suy giảm đáng kể trong điều kiện MG [69]. Trong một thí nghiệm khác trên vệ tinh Bion-10, khoảng cách trung bình của các sỏi thăng bằng đến vách tế bào của tế bào thăng bằng ở rễ sơ cấp của *Lepidium sativum* L. tăng lên đáng kể. Tuy nhiên, kích thước lạp bột và sỏi thăng bằng giảm và không thay đổi về số lượng và hình dạng [6]. Với thí nghiệm trên vệ tinh Bion-10, cho thấy một sự khác biệt đáng kể về vị trí của các tế bào thăng bằng và các lạp thể ở rễ cây Cải xoong (*Nasturtium officinale*). Bên trong rễ hình thành ở điều kiện MG, nhiều lạp thể tích tụ ở trung tâm của tế bào (trái ngược với điều kiện TMG), trong khi các lạp bột thường tập trung ở phần cuối rất xa của vùng tế bào rễ [70]. Clinostat 2-D và trong điều kiện TMG cho thấy đã làm thay đổi tương tự sự phân bố của lạp bột ở Đậu lăng (*Lens culinaris* L.) [71]. Cây Cải xoong (*Nasturtium officinale*) dưới điều kiện Clinostat (50 rpm) cho thấy sự khác biệt về thời gian trong chuyển động dọc của lạp bột trong các tế bào rễ và tế bào trụ dưới lá mầm [72].

Quản lý nước và chất dinh dưỡng được xem là một trong những khía cạnh khó khăn nhất của việc trồng cây trong không gian. Do đó, những hiểu biết về ảnh

hưởng của các yếu tố không gian trong việc hấp phụ, vận chuyển, phân phối nước và chất dinh dưỡng trong cây là rất hạn chế. Dựa vào sự giảm mức độ của trọng lực trong không gian, sự vận chuyển nước và trao đổi khí và các phân tử nhỏ như các ion trở nên có giới hạn [73]. Như vậy, việc giảm sự đối lưu nhiệt là nguyên nhân làm giảm sự thoát hơi nước ở cây (đây là một lực mạnh chủ yếu để vận chuyển nước trong xylem) và bằng cách này sự hấp thu nước và chất dinh dưỡng theo con đường thoát hơi nước được kích hoạt [73]. Hệ quả quan trọng khác là sự giới hạn hiệu suất sinh học của oxy, đặc biệt là ở vùng rễ do chất dinh dưỡng hấp thu ở rễ phụ thuộc vào sự trao đổi hiếu khí và ion hấp thu có thể giảm nồng độ oxy xung quanh rễ. Phân tích các rễ ở ngoài không gian cho thấy, sự thủy phân đường và tổng hợp enzyme lên men nhanh, đặc biệt là alcohol dehydrogenase là chất chỉ thị cho sự thiếu hụt oxy và trao đổi chất trong vùng rễ [73].

Ở khía cạnh dinh dưỡng, một vài nghiên cứu đã cho thấy ảnh hưởng có thể xảy ra của môi trường không gian lên thực vật. Các thử nghiệm của Nga trên trạm Salyut và Mir cho thấy, sự sinh trưởng giảm sút của cây đậu Hà Lan (*Pisum sativum* L.) và Lúa mì lùn (*Triticum aestivum*) trồng trong không gian so với đối chứng trong phòng thí nghiệm và sự ức chế sinh trưởng này có liên quan đến vấn đề về dinh dưỡng [74]. Phân tích hóa học của mẫu thực vật tìm được cho thấy, các cây được trồng trong không gian có lượng nitơ thấp hơn nhiều và kali cao hơn ở cả thân và rễ khi so sánh với đối chứng dưới mặt đất. Kích thích điện (electrostimulation) của rễ ảnh hưởng đáng kể đến sự phân phối lại dinh dưỡng trong cây, đặc biệt là trong các cây trên không gian và giúp cây vượt qua một số ảnh hưởng bất lợi gây ra bởi tình trạng không trọng lực trong sự hấp thu dinh dưỡng [75]. Trong một nghiên cứu ước tính lượng canxi tự do cho thấy, ở tình trạng MG (các thử nghiệm trên trạm không gian Salyut 6), các mức độ canxi trong tế bào rễ cây đậu Hà Lan (*Pisum sativum* L.) tăng lên so với đối chứng trên mặt đất [76].

Về sự thay đổi sinh hóa, trong những năm đầu khi nghiên cứu thực vật trong không gian, một số thí nghiệm cho thấy hàm lượng tinh bột thấp hơn nhưng kích thước hạt tinh bột lại lớn hơn ở cây Đậu nành (*Glycine max*) [77] và lục lạp không có tinh bột hoặc với các hạt có kích thước nhỏ hơn và phá hủy một phần màng thylakoid trong tế bào sợi của cây Rêu than (*Funaria hygrometrica*) [78]. Nghiên cứu về tác động của điều kiện MG lên sự thay đổi quá trình trao đổi chất ở thực vật

cho thấy có sự khác biệt đáng kể về sự tích lũy các hợp chất hoặc thay đổi các yếu tố sinh hóa theo chiều hướng chống lại stress phi sinh học như sự tích lũy carotenoid và anthocyanin trong hạt nảy mầm [79]; sự gia tăng các enzyme thúc đẩy chu trình glycoxylate trong hạt nảy mầm [31]; hoạt động enzyme amylase được tăng cường và sự phân giải nhanh chóng của tinh bột [80]; tăng hàm lượng phyllanthin [52]; tăng tích lũy hợp chất saponin và coumarin [53].

Cây Xà lách rocket (*Eruca sativa* Mill.) nuôi cấy trên ISS cho thấy các thông số sinh hóa như glucose, sucrose, tinh bột và hàm lượng carotenoid tổng số bị ảnh hưởng tiêu cực [42]. Tuy nhiên, không có sự khác biệt nào được ghi nhận ở hàm lượng tinh bột, đường hòa tan, hoặc lignan trong lá và trong sinh khối khô của mỗi cây Lúa mì lùn (*Triticum aestivum*) được trồng trong 21 ngày ở cường độ chiếu sáng vừa phải (~300 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) và nồng độ CO_2 cao (1.500 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) trong hệ thống sản xuất sinh khối trên trạm ISS [81]. Các mẫu Khoai tây (*Solanum tuberosum*) được trồng trong tình trạng MG dưới điều kiện môi trường có kiểm soát và thoáng khí cho thấy hình dạng, kết cấu bề mặt và kích thước các loại hạt tinh bột tương tự với điều kiện G [82]. Al-Awaida và cộng sự (2020) báo cáo rằng cây con Lúa mì lùn (*Triticum aestivum*) nảy mầm dưới điều kiện MG thể hiện tiềm năng chống oxy hóa và hàm lượng chất chuyển hóa chống oxy hóa tăng lên đáng kể [83]. Tác động của SMG lên hạt Thông *(Pinus pinea)* chỉ ra sự gia tăng đáng kể hoạt động của các enzyme quan trọng tham gia vào quá trình đường phân (pyruvate kinase), chu trình Krebs (isocitrate dehydrogenase), quá trình oxy hóa beta (3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase) và con đường pentose (glucose-6-phosphate dehydrogenase) sau khi nảy mầm [31].

Musgrave cộng sự (1998) đã chứng minh trong nghiên cứu của mình rằng sự thiếu thoáng khí ở điều kiện MG làm giảm hàm lượng carbohydrate xuống 40% (đặc biệt là glucose và tinh bột) ở cây *Arabidopsis thaliana* L. khi so sánh với điều kiện G. Ngược lại, khi một luồng không khí liên tục được cung cấp cho cây thì kết quả thu được không có sự khác biệt về hàm lượng carbohydrate trong cả hai điều kiện [84]. Ngoài ra, Đậu nành (*Glycine max*) trong thí nghiệm trên chuyến bay vào không gian ở điều kiện thoáng khí thì không có sự khác biệt so với điều kiện G về kích thước, phân bố, mật độ và hàm lượng amylase trong hạt tinh bột [7].

Như vậy, các thí nghiệm sinh học thực vật dưới điều kiện TMG và các điều kiện SMG đã giúp chúng ta đạt được hai mục tiêu chính: (i) làm sáng tỏ hiểu biết cơ bản về thực vật hoặc tế bào thực vật trong sự cảm nhận đối với trọng lực, kích thích và phản ứng hoặc thích ứng với điều kiện MG và (ii) theo đó là các ứng dụng để đảm bảo an ninh dinh dưỡng cho phi hành đoàn làm việc trong không gian.

Các loài thực vật khác nhau cho những đáp ứng khác nhau đối với điều kiện MG. Các nghiên cứu đã tiến hành tập trung vào sự thay đổi của các phản ứng sinh lý, sinh hóa nội bào, quá trình sinh trưởng và phát triển. Tuy nhiên, số lượng nghiên cứu về ảnh hưởng của MG, đặc biệt là SMG còn khá hạn chế do khan hiếm về thiết bị. Các đối tượng thực vật nghiên cứu chưa đa dạng về chủng loài, các nghiên cứu chưa đề cập sâu tới quá trình phát sinh hình thái, phát sinh phôi, cơ chế của sự sinh trưởng, phát triển hoặc nghiên cứu ở cấp độ phân tử, biểu hiện gen. Ngoài ra, đối tượng thực vật nuôi cấy *in vitro* mới chỉ được nghiên cứu ở cây mô hình *Arabidopsis thaliana* L. và số ít loài khác như Lúa (*Oryza sativa*), Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.).

Vì vậy, cần tiến hành nghiên cứu sâu hơn về những vấn đề còn tồn tại nêu trên, đặc biệt tập trung vào đối tượng thực vật nuôi cấy *in vitro* trên các thiết bị SMG nhằm tiết kiệm chi phí và bổ khuyết cho một lĩnh vực mới rất thú vị cho một cuộc cách mạng về chọn tạo giống mới, cũng như đảm bảo an ninh lương thực và cải tạo môi trường sinh thái cho sứ mệnh chinh phục không gian của loài người.

1.6. Sơ lược về đối tượng thực vật

1.6.1. Cây hoa Thu hải đường (Begonia × tuberous)

Thu hải đường hay Bát nguyệt xuân là loại cây thân củ với khoảng 1795 loài, chi *Begonia* là chi lớn thứ năm trong ngành thực vật hạt kín [85]. Theo thống kê đến hết năm 2015, Việt Nam có khoảng 58 loài Thu hải đường [86].

Các giống Thu hải đường được lai tạo để cho hoa đẹp, màu sắc hoa và lá rực rỡ, đa dạng như màu đỏ, đỏ tươi, hồng, vàng và trắng nên trở thành loài hoa được con người yêu thích. Thu hải đường ưa khí hậu mát mẻ và dễ nhân giống nên càng ngày trở nên phong phú về chủng loài, chúng có thể được trồng từ hạt, nuôi cấy mô tế bào hoặc giâm từ lá, thân trong điều kiện ẩm ướt [87]. Hiện nay trên thế giới có 5 giống lai được trồng phổ biến bao gồm: *Begonia* × *rex*, *Begonia* × *cane*, *Begonia* × *semperflorens*, *Begonia* × *trailing*, *Begonia* × *tuberous*.

Thu hải đường lai *Begonia* × *tuberous* là loại hoa được ưa chuộng phổ biến ở Hoa Kỳ với thị trường rất sôi động có giá trị khoảng 60 triệu USD. Ở Việt Nam, Thu hải đường lai *Begonia* × *tuberous* được trồng chủ yếu ở Đà Lạt (Lâm Đồng) và một số vùng trồng hoa chuyên canh khác nhằm cung cấp hoa trồng chậu thương mại. Hằng năm, Công ty Dalat Hasfarm luôn dành khoảng 5 – 10 hecta trong tổng diện tích canh tác để trồng hoa Thu hải đường với hàng chục màu sắc khác nhau. Khoảng 75% sản lượng hoa Thu hải đường của Dalat Hasfarm được xuất đi tiêu thụ ở nước ngoài, trong đó có Nhật Bản, Đài Loan, Singapore,... đem lại lợi nhuận kinh tế rất cao cho người trồng hoa.

Trong nghiên cứu sinh học, việc nghiên cứu phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* trên cây hoa Thu hải đường được nghiên cứu phổ biến với nhiều mô hình khác nhau, trong đó kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào được xem như mô hình đơn giản đem lại hiệu quả cao [88]. Các nghiên cứu này với mục đích tạo ra số lượng lớn cây giống sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền để cung cấp cho ngành sản xuất hoa chậu quy mô công nghiệp [89], thiết lập quy trình tái sinh chồi bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào [88], tối ưu hóa quy trình nhân giống *in vitro* [90], tái sinh tạo cây hoàn chỉnh từ mẫu cánh hoa [91]. Tuy nhiên, quá phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* dưới điều kiện SMG vẫn chưa được nghiên cứu.

Vì vậy, để đánh giá sự phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* của cây hoa Thu hải đường dưới điều kiện SMG, luận án này đã sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào cuống lá cắt ngang (p-tTCL) để tạo nguồn mẫu ban đầu nhằm tối ưu hóa phương pháp nghiên cứu.

1.6.2. Cây Dâu tây (Fragaria × ananassa Duch.)

Lịch sử xuất hiện của Dâu tây được cho rằng vào những năm 23 - 79 sau Công nguyên trong những bài viết của nhà tự nhiên học Pliny. Dâu tây bản địa (*Fragaria virginiana*) được trồng đầu tiên ở Bắc Mỹ và nhập khẩu rất sớm vào Châu Âu trong những năm 1600. Một số tài liệu khác cho rằng các nhà thám hiểm đã tìm thấy Dâu tây hoang dại ở Chile (*Fragaria chiloensis*) vào những năm 1700, tuy nhiên loài này không thích nghi được với nhiều dạng khí hậu. Tại Bắc Âu và Pháp, Dâu tây rừng được trồng sớm nhất vào những năm 1300. Đến năm 1714, Dâu tây hiện đại là dạng lai giữa loài *Fragaria chiloensis* với *Fragaria virginiana* xuất hiện và dần thay thế cho các loài trước đây [92].

Dâu tây là cây ăn trái quan trọng do có vị thơm ngon đặc trưng, chứa chất dinh dưỡng cần thiết cho con người như các loại vitamin C, B1 và khoáng chất như kali, canxi, sắt. Ngoài ra, trái Dâu tây còn chứa các hợp chất phenolic như anthocyanin, glucose cinnamoyl, ellagitannin, axit ellagic có vai trò chống oxy hóa [93].

Cây Dâu tây được trồng thương mại phổ biến ở hơn 80 quốc gia trên thế giới với tổng diện tích gần 375 ngàn hecta, trong đó tập trung ở các nước như Trung Quốc, Hoa Kỳ, Tây Ban Nha, Thổ Nhĩ Kỳ, Ai Cập và Mexico với sản lượng hàng đầu. Ở Việt Nam, Dâu tây được trồng chủ yếu ở Đà Lạt (Lâm Đồng) với diện tích chuyên canh khoảng 190 hecta đem lại giá trị kinh tế rất lớn.

Trong nghiên cứu sinh học, vi nhân giống cây Dâu tây được xem là phương pháp tối ưu để thu nhận cây con sạch bệnh, đồng nhất về di truyền và đạt số lượng lớn. Các nghiên cứu tập trung về vai trò của các chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo mẫu *in vitro*, hình thành mô sẹo, sinh trưởng và phát triển của chồi hoặc tạo cây con hoàn chỉnh [94], [95]. Vì vậy, đánh giá vai trò của điều kiện SMG lên quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* của cây Dâu tây nhằm tìm hiểu sự thích nghi và đáp ứng sinh học trong điều kiện bị stress trọng lực của cây trồng là hướng nghiên cứu mới và cần thiết.

1.6.3. Cây Diệp hạ châu đắng (Phyllanthus amarus Schum. *et* Thonn.*)*

Cây Diệp hạ châu đắng hay còn gọi là cây chó đẻ răng cưa, diệp hòe thái, lão nha châu. Đây là một loại cây thân thảo mọc hằng năm, cao khoảng 30 cm, thân gần như nhẵn, mọc thẳng đứng, mang cành, thường có màu đỏ. Lá mọc so le, lưỡng lệ trông như lá kép, phiến lá thuôn, đầu nhọn hay hơi tù, mép nguyên nhưng có răng cưa rất nhỏ, mặt dưới màu lơ xanh, không cuống hay có cuống rất ngắn. Cây Diệp hạ châu đắng mọc hoang ở khắp nơi trong nước ta cũng như ở khắp các nước vùng nhiệt đới [96].

Trong dân gian, Diệp hạ châu đắng được dùng để làm thuốc ở dạng tươi hoặc phơi khô để chữa bệnh đinh râu, mụn nhọt, bệnh gan, sốt, đau mắt, rắn cắn [96]. Cây có chứa nhiều hợp chất thứ cấp quan trọng có dược tính như axit, các triterpen một vài alkaloid, các dẫn xuất phenol và lignan. Trong đó, quan trọng nhất là các lignan chỉ có ở chi *Phyllanthus* như phyllanthin, hypophyllanthin. Tác dụng quan trọng nhất của phyllanthin, hypophyllanthin là tham gia vào thành phần của các loại thuốc chữa bệnh gan. Phyllanthin, hypophyllanthin chiết xuất từ Diệp hạ châu có thể bảo vệ được tế bào

gan chống lại các chất gây tổn thương tế bào gan nghiêm trọng như paracetamol, carbon tetrachloride (CCl_4), ethanol, aflatoxin B1 và galactosamin trên các mô hình thử nghiệm trên động vật [97]. Ngoài ra, các nghiên cứu cho thấy hai lignan này trên Diệp hạ châu đắng có khả năng giảm đau, tăng đào thải axit uric ức chế virus gây bệnh viêm gan B thử nghiệm trên *in vitro* và *in vivo*, virus HIV gây hội chứng suy giảm miễn dịch ở người [98]. Bên cạnh hai lignan là phyllanthin và hypophyllanthin, cây Diệp hạ châu đắng còn chứa hai flavonoid quan trọng là rutin và quercetin. Quercetin có các hoạt tính sinh học như là chất chống oxy hóa, chống ung thư, kháng viêm, trị đái tháo đường và bảo vệ các tế bào thần kinh. Trong khi đó, rutin được biết đến với tác dụng dược lý đa dạng như chống ung thư, kháng viêm và hạ huyết áp [99].

Trong nghiên cứu sinh học, phương pháp nuôi cấy mô tế bào được ứng dụng trên cây Diệp hạ châu đắng nhằm cung cấp một lượng lớn cây giống đồng đều, sạch bệnh. Các nghiên cứu có thể kể đến như sử dụng các nguồn mẫu từ lá, chồi bên, đốt thân để cảm ứng mô sẹo, tái sinh, nhân nhanh chồi và tạo cây hoàn chỉnh [100], [101].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

2.1.1. Đối tượng thực vật

Mẫu cuống lá 4 tháng tuổi của cây hoa Thu hải đường (*Begonia tuberous)* của Dalat Hasfarm (Lâm Đồng, Việt Nam) được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu.

Mẫu lá của cây Dâu tây Camarosa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) *in vitro* 4 tuần tuổi đã được xác định tính đa dạng di truyền và đã được ổn định qua nhiều lần cấy chuyền trên môi trường MS [102] tại Trung tâm Nghiên cứu Đa dạng sinh học và Biến đổi khí hậu (Trường Đại học Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam) được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu.

Mẫu lóng thân của cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn.) *in vitro* 4 tuần tuổi sinh trưởng và phát triển tốt đã được ổn định qua nhiều lần cấy chuyền trên môi trường MS [102] tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (Lâm Đồng, Việt Nam) được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu.

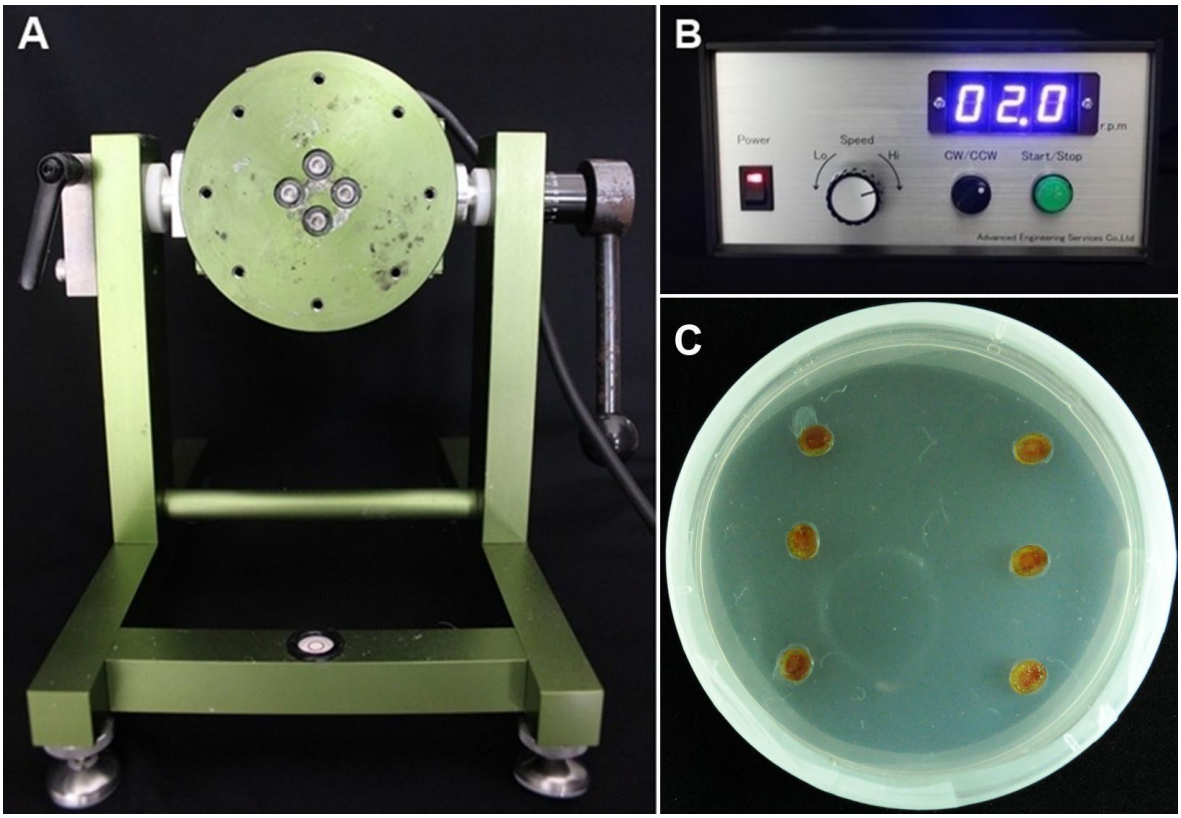
2.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng của các thí nghiệm là môi trường khoáng MS [102] bổ sung hoặc không bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật tùy vào mục đích thí nghiệm, pH được điều chỉnh về 5,8 và hấp tiệt trùng trong nồi hấp ở 121°C, áp suất 1 atm trong vòng 30 phút.

2.1.3. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

Thiết bị Clinostat 2-D (Advanced Engineering Services Co., Ltd., Nhật Bản) gồm hai bộ phận chính là thân máy và hộp điều khiển. Thân máy có kích thước 25 × 25 × 25 cm gắn một trục xoay có giá dạng mâm tròn để gắn mẫu (giá gắn được tối đa 500 mg khối lượng mẫu/lần xử lý) (Hình 2.1A). Hộp điều khiển có kích thước 23 × 20 × 11 cm gồm có nút nguồn (power), nút điều khiển số vòng quay (0,5 – 90 rpm) (speed), nút điều chỉnh hướng quay cùng chiều hoặc ngược chiều kim đồng hồ (CW/CCW), nút khởi động (start/stop) và màn hình hiển thị tốc độ quay (rpm) (Hình 2.1B).

Tốc độ quay 2 rpm được lựa chọn cho mục đích SMG là tốc độ quay chậm (cổ điển) đã được các nhà sinh lý học thực vật lựa chọn để nghiên cứu [103].



Hình 2.1. Thiết bị Clinostat 2-D

A: Thân Clinostat 2-D gắn trục quay có giá dạng mâm tròn để gắn mẫu; **B:** Hộp điều khiển thiết bị; **C:** Đĩa petri chứa mẫu để cố định trên trục quay.

Máy cất nước, cân điện tử 2 và 3 chữ số thập phân, nồi hấp, máy đo pH, tủ cấy, đĩa cấy, dao cấy, kéo, panh cấy, bình nuôi cấy có thể tích 100 mL, 250 mL, 500 mL, bịch nylon, dây thun, găng tay, cốc đong 20 mL và 50 mL,... Đĩa petri (đường kính 60 mm và chiều cao 15 mm - Sigma-Aldrich, Darmstadt, Đức; đường kính 90 mm và chiều cao 15 mm, Midamec, Việt Nam), màng parafilm M (Bemis, Mỹ). Các dụng cụ được tiệt trùng bằng nồi hấp ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong 30 phút.

Đèn UV bước sóng 254 nm, kính hiển vi soi nổi Nikon SMZ 800 (Nikon, Nhật Bản), kính hiển vi quang học OLYMPUS CH30 (Nhật Bản), máy đo chlorophyll (SPAD-502, Minolta Co., Ltd., Osaka, Nhật Bản). Hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép đầu dò UV (UHPLC-UV Ultimate 3000, Thermo Scientific, Hoa Kỳ), máy quang phổ kế (UV-VIS Shimazdu V630, Nhật Bản).

Các hóa chất bao gồm muối khoáng để chuẩn bị môi trường; chất điều hòa sinh trưởng, chất chuẩn, enzyme và thuốc thử cho các thí nghiệm sinh hóa; thuốc nhuộm mô học được mua từ Sigma-Aldrich® (Hoa Kỳ).

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.2.1. Nội dung 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên các con đường phát sinh hình thái của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro

Nghiên cứu ảnh hưởng lên quá trình phát sinh SEs của mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG.

Nghiên cứu ảnh hưởng lên quá trình phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu cấy lá cây Dâu tây nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG.

Nghiên cứu ảnh hưởng lên quá trình phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu cấy lóng thân cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG.

2.2.2. Nội dung 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng, tỷ lệ hormone nội sinh và chuyển hóa năng lượng trong quá trình phát sinh hình thái của cây hoa Thu hải đường; hàm lượng, tỷ lệ hormone nội sinh và hoạt tính enzyme kháng oxy hóa của cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng; khả năng tích lũy hợp chất thứ cấp của cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự thay đổi hàm lượng và tỷ lệ hormone nội sinh trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường, chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*.

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự thay đổi hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong quá trình phát sinh chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*.

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự tích lũy hợp chất thứ cấp trong quá trình phát sinh mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*.

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự chuyển hóa năng lượng (tinh bột và đường) trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro*.

2.2.3. Nội dung 3: Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở điều kiện trọng lực thực của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG

Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng của chồi và cây con Thu hải đường; chồi và cây con Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG.

Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng của mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG.

Nghiên cứu ghi nhận sự thích nghi vườn ươm của cây con Dâu tây nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Bố trí thí nghiệm

2.3.1.1. Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh SEs của mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường nuôi cấy in vitro

Các cuống lá có kích thước đồng đều (đường kính 0,3 cm và dài 5 cm) được thu nhận và rửa dưới vòi nước chảy trong 30 phút; sau đó ngâm trong dung dịch nước rửa chén Sunlight® loãng trong vòng 10 phút và rửa sạch lại bằng nước máy 4 - 5 lần. Nguồn mẫu đã khử trùng sơ bộ ở trên được cho vào bình tam giác, đậy nắp kín, đưa vào tủ cấy, lắc với cồn 70º trong 10 giây và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần. Sau đó, các mẫu được khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% có bổ sung 2 - 3 giọt Tween 80 trong thời gian 6 phút và mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần. Cuối cùng, các mẫu cuống lá được cắt bằng kỹ thuật lớp mỏng tế bào theo chiều ngang (petioles-transverse thin cell layer: p-tTCL) dày khoảng 0,8 - 1 mm.

Các mẫu p-tTCL được nuôi cấy trong các đĩa petri nhựa (đường kính 90 mm và chiều cao 15 mm) có chứa 25 mL môi trường ½ MS bổ sung 0,2 mg/L TDZ, 0,2 mg/L NAA, 30 g/L sucrose và 10 g/L agar [88]. Đĩa nuôi cấy được dán kín bởi màng parafilm M trong điều kiện vô trùng rồi gắn lên thiết bị Clinostat 2-D. Đối chứng là các đĩa nuôi cấy được đặt ở điều kiện trọng lực thực 1 g của G.

Chỉ tiêu theo dõi*:* Thời gian cảm ứng (ngày), tỷ lệ tái sinh (%), số phôi/mẫu; số phôi hình cầu, số phôi hình tim; số phôi hình thủy lôi, số phôi trưởng thành; khối lượng tươi (mg); khối lượng khô (mg); hàm lượng chlorophyll tổng (nmol/cm^2) sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy.

2.3.1.2. Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu cấy lá cây Dâu tây nuôi cấy in vitro

Mẫu lá *in vitro* được cắt thành hình vuông (kích thước 0,5 × 0,5 cm) và nuôi cấy trong các đĩa petri nhựa (đường kính 60 mm và chiều cao 15 mm) chứa 5 mL môi trường MS bổ sung 1 mg/L TDZ, kết hợp với 0,1 mg/L IBA, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [104]. Đĩa nuôi cấy được dán kín bởi màng parafilm M trong điều kiện

vô trùng rồi gắn lên thiết bị Clinostat 2-D. Đối chứng là các đĩa nuôi cấy được đặt ở điều kiện trọng lực thực 1 g của G.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ không cảm ứng mô sẹo, tỷ lệ tái sinh chồi (%), khối lượng tươi (mg) và khối lượng khô (mg) của mẫu cấy được thu nhận sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy.

2.3.1.3. Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu lóng thân cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro

Mẫu lóng thân (chiều dài 10 mm và đường kính 1 mm) được cắt đôi theo chiều dọc và mặt cắt được đặt úp trên đĩa petri (đường kính 60 mm và chiều cao 15 mm) chứa 5 ml môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [105]. Đĩa nuôi cấy được dán kín bởi màng parafilm M trong điều kiện vô trùng rồi gắn lên thiết bị Clinostat 2-D. Đối chứng là các đĩa nuôi cấy được đặt ở điều kiện trọng lực thực 1 g của G.

Chỉ tiêu theo dõi*:* Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ hình thành rễ bất định (%), khối lượng tươi (mg) và khối lượng khô (mg) của mẫu cấy được thu nhận sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

2.3.1.4. Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng và tỷ lệ hormone nội sinh trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường, chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro

Quá trình tách hormone dựa vào phương pháp của Tang và cộng sự (2011) [106] với một số điều chỉnh cho phù hợp. Theo đó, trải qua các bước sau:

- Bước 1: Chuẩn bị mẫu

Đối với cây hoa Thu hải đường: Tại mỗi thời gian nuôi cấy sau 1, 2, 3 và 4 tháng tuổi ở điều kiện SMG và G trong thí nghiệm 1, các SEs tươi được thu nhận với khối lượng 2 g.

Đối với cây Dâu tây: Tại thời gian nuôi cấy sau 6 tuần tuổi ở điều kiện SMG và G trong thí nghiệm 2, các chồi tươi được thu nhận với khối lượng 2 g.

Đối với cây Diệp hạ châu đắng: Tại thời gian nuôi cấy sau 4 tuần tuổi ở điều kiện SMG và G trong thí nghiệm 3, các mô sẹo tươi được thu nhận với khối lượng 2 g và các rễ bất định tươi được thu nhận với khối lượng 1 g.

- Bước 2: Xử lý mẫu

Các mẫu đã thu nhận được để riêng và nghiền nhỏ trong hỗn hợp dung môi gồm $CHCl_3$:MeOH:HCOOH:H_2O (25:60:5:10, v/v/v) theo tỷ lệ 1 mL dung môi cho 0,1 g mẫu. Sau đó hỗn hợp được chiết ở -30°C trong 4 giờ (Mẫu được chia làm hai phần, một phần giữ nguyên mẫu và một phần bổ sung nội chuẩn có nồng độ xác định). Hỗn hợp mẫu này được ly tâm lạnh ở 4°C, sau đó thu nhận phần nổi phía trên cho vào ống sạch. Phần còn lại được chiết tiếp với 4 mL MeOH ở 4°C trong 1 giờ, lặp lại 2 lần. Toàn bộ dung dịch thu được chiết qua cột chiết pha rắn SPE-C_{18}. Cột chiết SPE được rửa giải với dung môi MeOH. Dung dịch thu được đem cô quay ở áp suất chân không, nhiệt độ 50°C để loại dung môi và hoàn nguyên với 1 - 2 mL nước có pH = 2 (điều chỉnh bằng axit formic).

- Bước 3: Phân tách và thu nhận hormone nội sinh

Hệ thống Thermo-Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) với cột Hypersil C18 BDS với kích thước hạt 250 mm × 4,6 mm, 5 µm và kết hợp với máy dò UV theo dõi ở bước sóng 254 nm được sử dụng. Hệ dung môi được sử dụng bao gồm 70% (A) metanol 30% (B) nước Milli-Q được axit hóa bằng cách sử dụng 10 mM amoni acetate với tốc độ 0,7 mL/phút, thể tích mẫu 5 µL, nhiệt độ 30°C cho axit Indole-3-acetic (IAA), Gibberellin A3 (GA_3), N6-isopentenyladenine (2iP), trans-Zeatin (ZEA), Kinetin (KIN) và axit Abscisic (ABA) và với cột Hypersil GOLD PFP được trang bị với kích thước hạt 150 mm × 2,1 mm, 3 µm và kết hợp với một máy dò UV theo dõi ở bước sóng 280 nm đã được sử dụng. Hệ dung môi được sử dụng bao gồm 20% (A) acetonitril 80% (B) Milli-Q được axit hóa bằng axit formic 0,1% với tốc độ dòng 0,3 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 2µL, nhiệt độ 35°C cho axit Salicylic (SA), N-acetyl-5-methoxytryptamine/Melatonin (MEL). Nồng độ của các hormone được tính toán dựa trên đường chuẩn của các chất chuẩn cụ thể. Các đường chuẩn được xây dựng dựa trên tỷ lệ giữa diện tích peak sắc ký của mỗi phân tích dung dịch chuẩn với diện tích của chất chuẩn nội tương ứng. Các chất chuẩn tương ứng được mua từ Sigma-Aldrich®, Hoa Kỳ.

Chỉ tiêu theo dõi: Hàm lượng AUX, CKs (KIN, 2iP và ZEA), GA_3, ABA (µg/g chất tươi); tỷ lệ AUX/CKs, AUX/GA_3, CKs/GA_3, CKs/ABA sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy đối với SEs cây hoa Thu hải đường; sau 6 tuần nuôi cấy đối với chồi

cây Dâu tây; sau 4 tuần nuôi cấy đối với mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng.

2.3.1.5. Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong quá trình phát sinh mô sẹo cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro

- Xác định hoạt tính các enzyme kháng oxy hóa:

+ Chuẩn bị mẫu:

Đối với cây Dâu tây: Tại mỗi thời gian nuôi cấy sau 2, 3, 4 và 6 tuần tuổi ở điều kiện SMG và G trong thí nghiệm 2, các mô sẹo tươi được thu nhận với khối lượng 0,3 g.

Đối với cây Diệp hạ châu đắng: Tại mỗi thời gian nuôi cấy sau 2, 3 và 4 tuần tuổi ở điều kiện SMG và G trong thí nghiệm 2, các mô sẹo tươi được thu nhận với khối lượng 0,3 g và các rễ bất định tươi được thu nhận với khối lượng 0,3 g.

+ Xử lý mẫu:

Các mẫu đã thu nhận được để riêng và nghiền trong nitơ lỏng thành bột mịn; sau đó, đồng nhất mẫu trong 2 mL dung dịch đệm phosphat 0,1 M có pH 7,4 chứa 0,1 mM axit ethylene diamine tetraacetic. Hỗn hợp chứa mẫu được ly tâm ở tốc độ 15.000 rpm trong 20 phút ở 4°C. Phần nổi phía trên sau đó được thu nhận và bảo quản trong điều kiện lạnh (4°C) để xác định hoạt tính của các enzyme kháng oxy hóa bao gồm SOD, CAT và APX.

Hoạt tính SOD được xác định thông qua phản ứng pyrogallol với quá trình oxy hóa với sự hiện diện của oxy trong không khí, tạo ra sản phẩm và hấp thu bước sóng 320 nm. SOD trong mẫu xúc tác phản ứng phân hủy các gốc peroxide (-O-O-), ngăn chặn quá trình tự oxy hóa của pyrogallol. Tỷ lệ ức chế phản ánh hoạt động của superoxide effutase trong mẫu. Một đơn vị hoạt độ của enzyme (U/g) là sự ức chế 50% quá trình tự oxy hóa pyrogallol, được xác định bởi sự thay đổi độ hấp thụ ở 320 nm theo công thức: Đơn vị enzyme (U/g) = (% bị ức chế/50) × tỷ lệ pha loãng [107].

Hoạt tính CAT trong mẫu thử được xác định bằng cách cho mẫu phản ứng với 100 µL H_2O_2 65 mM trong 2 phút, H_2O_2 còn lại sau khi phản ứng sẽ được kết hợp với 100 µL ammonium molybdate ($NH_4Mo_7O_{24}$) tạo phức hợp màu vàng và hấp thu

ở bước sóng 405 nm. Một đơn vị hoạt độ catalase (U/g) tương đương với 1 μmol H_2O_2 thủy phân trong 1 phút theo phương pháp của Goth và cộng sự [108].

Hoạt tính APX được xác định theo phương pháp của Nakano và Asada [109]. Enzyme APX trong mẫu sẽ oxy hóa và làm giảm sự hấp thu tối đa của ascorbate ở bước sóng 290 nm. Đơn vị hoạt độ của APX (U) được tính bằng cách ghi lại độ hấp thu tối đa của ascorbate (290 nm) với sự hiện diện của 0,5 mM H_2O_2 trong 3 phút. Lượng ascorbate oxy hóa được tính trực tiếp với hệ số hấp thu là 2,8 mM/cm. Một đơn vị hoạt độ enzyme (U/g) là lượng APX cần thiết để oxy hóa 1 μmol ascorbate trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

- Xác định hoạt tính bắt gốc tự do DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl):

Phương pháp xác định DPPH được phát triển bởi Blois [110] dựa trên phản ứng các chất chống oxy hóa có trong mẫu với gốc DPPH, chất chống oxy hóa sẽ khử DPPH* (màu tím) thành DPPH (màu vàng nhạt) làm giảm độ hấp thu ở bước sóng 517 nm. Phần trăm bắt gốc tự do (*Radical scavenging activity*) được tính theo công thức:

$$RSA\ (\%) = \frac{Ak - Am}{Ak}.100$$

Trong đó: RSA: Radical scavenging activity (%); Ak: Mật độ quang ống chứa mẫu trắng; Am: Mật độ quang ống chứa mẫu thử.

- Xác định hàm lượng phenolic tổng:

Hàm lượng phenolic tổng được xác định bằng phương pháp quang phổ so màu với thuốc thử Folin – Ciocalteu [111]. Thuốc thử sẽ chuyển màu từ vàng sang xanh đậm khi có chất kháng oxy hóa. Hàm lượng phenolic tổng có trong mẫu phân tích được tính theo đương lượng axit gallic (mg GAE) hấp thu trên 100 g chất khô ở bước sóng 770 nm.

Chỉ tiêu theo dõi: Hoạt tính enzyme SOD (U/g), CAT (U/g), APX (U/g), hoạt tính bắt gốc tự do DPPH (%RSA) và hàm lượng phenolic tổng (mg/100 g chất khô) được thu nhận sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy đối với mô sẹo cây Dâu tây; sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy đối với mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng.

2.3.1.6. Thí nghiệm 6: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự tích lũy hợp chất thứ cấp trong quá trình phát sinh mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy in vitro

Quá trình phân tách các hợp chất thứ cấp (lignan và flavonoid) dựa vào phương pháp của Murugaiyah và Chan [112] với một số điều chỉnh cho phù hợp. Cụ thể, mẫu mô sẹo tươi và rễ bất định tươi 4 tuần tuổi ở điều kiện SMG và G trong thí nghiệm 3 được thu nhận với khối lượng 10 mg/mỗi mẫu, để riêng và được nghiền nhỏ. Tiếp theo, sử dụng dung môi chiết MeOH (tỷ lệ 1/10), chiết trong thời gian 10 phút bằng hệ thống chiết siêu âm đầu dò, lọc dung dịch thu được. Sau đó, cặn chiết tiếp tục chiết lặp lại 2 lần với dung môi chiết MeOH. Hỗn hợp dung dịch thu được cô loại dung môi bằng hệ thống cô quay chân không. Cao thu được hòa tan bằng MeOH và định mức trong bình định mức 10 mL. Dung dịch mẫu được lọc qua màng lọc 0,45 µm, sau đó tiêm vào hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép đầu dò UV (UHPLC-UV Ultimate 3000 của Hãng Thermo, Mỹ), qua cột BDS Hypersil C-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) để phân tách các hợp chất. Dung môi pha động gồm MeOH (A) và 0,1% H_3PO_4 (B). Quá trình phân tách theo chế độ gradient như sau: từ 0 đến 0,5 phút 97% B, từ 0,5 đến 8,0 phút 97-83% B, từ 8,0 đến 10,0 phút 83-70% B, từ 10,0 đến 15,0 phút 70-55% B, từ 15,0 đến 20,0 phút 55-5% B, từ 20,0 đến 22,0 phút 5-97% B, từ 22,0 đến 23,0 phút 97% B. Tốc độ dòng 1,0 ml/phút với thời gian chạy mẫu 23 phút. Sử dụng đầu dò UV với tần số sóng âm 28 kHz, bước sóng 265 nm, nhiệt độ cột 30ºC, quá trình tiêm mẫu bằng hệ thống tự động với thể tích mẫu tiêm là 5 µl. Tính toán kết quả dựa vào phương trình đường chuẩn của các chất chuẩn ở cùng điều kiện. Trong đó, các chất chuẩn (Rutin, quercetin, hypophyllanthin và phyllanthin) đã được đặt mua từ Sigma-Aldrich®, Hoa Kỳ.

Chỉ tiêu theo dõi: Hàm lượng flavonoid (rutin và quercetin) và lignan (hypophyllanthin và phyllanthin) (µg/g chất tươi) được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.3.1.7. Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự chuyển hóa năng lượng (tinh bột và đường) trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường nuôi cấy in vitro

- Phương pháp định lượng tinh bột:

Trong mỗi thời gian nuôi cấy sau 1, 2, 3 và 4 tháng tuổi ở điều kiện SMG và G trong thí nghiệm 1, các SEs tươi được thu nhận với khối lượng 0,3 g; sau đó, rửa trong nước cất, làm đông khô và nghiền bằng cối và chày trước khi phân tích tinh bột. Sự phân hủy của mẫu được thực hiện trong 5 phút và được theo dõi bằng cách quan sát dưới kính hiển vi. Các mẫu cấy được lấy ra khỏi cối và chày bằng dung môi acetone. Tinh bột trong mẫu được thủy phân thành maltodextrin bởi α-amylase (3000 Um/L) và sau đó được thủy phân thành glucose bởi amyloglucosidase (3300 Um/L). Dung dịch trắng được chuẩn bị bằng 0,1 mL nước cất với việc bổ sung 3 mL GOPOD (glucose oxidase-peroxidase). Hàm lượng tinh bột tổng được xác định bằng dung dịch thuốc thử trắng với độ hấp phụ cực đại ở bước sóng 510 nm của máy đo quang phổ. Hàm lượng tinh bột tổng (I) (% w/w DW) xác định theo công thức: $I = A \times F/W \times 90$; *trong đó, A là hệ số hấp thụ của dung dịch thử so với mẫu trắng; F là hệ số chuyển đổi từ giá trị độ hấp thụ sang giá trị glucose và W là khối lượng của mẫu thử (mg)* [113].

- Phương pháp định lượng đường:

Trong mỗi thời gian nuôi cấy sau 1, 2, 3 và 4 tháng tuổi ở điều kiện SMG và G trong thí nghiệm 1, các SEs tươi được thu nhận với khối lượng 0,3 g rồi cắt thành từng miếng nhỏ bằng dao (độ dày 0,2 - 0,3 cm) sau đó được đông lạnh, nghiền bằng cối và chày trước khi phân tích đường. Tất cả các mẫu đã đồng nhất được bảo quản trong túi nhựa (-18°C). Đường trong mẫu được kiểm tra bằng cách sử dụng thuốc thử GOPOD với độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 510 nm của máy đo quang phổ và D-glucose được sử dụng làm đối chứng. Hàm lượng đường của mẫu được xác định bằng cách sử dụng thuốc thử axit 3,5-dinitrosalicylic dựa trên độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 540 nm của máy đo quang phổ, trong khi nước cất được sử dụng làm đối chứng. Trong đó, D-glucose sử dụng nhằm xây dựng đường chuẩn để tính toán hàm lượng đường. Hàm lượng đường (S) (mg/g DW) được xác định theo công thức: $S = A \times n \times V/m$; *trong đó, A là hàm lượng đường trong dung dịch mẫu đã pha loãng*

(mg/g); n là hệ số pha loãng; V là thể tích dung dịch chuẩn (mL) và m là khối lượng của mẫu thử (g) [114].

Chỉ tiêu theo dõi*:* Hàm lượng tinh bột và đường của SEs sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy. Riêng trong giai đoạn SEs 1 tháng tuổi ghi nhận hàm lượng tinh bột và đường ở các mốc thời gian 5, 10, 15, 20, 25 và 30 ngày.

2.3.1.8. Thí nghiệm 8: Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Thu hải đường, cây Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG

Thí nghiệm 8.1. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Thu hải đường có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG

Các SEs 3 tháng tuổi có nguồn gốc dưới điều kiện SMG và G được cấy trong môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật để tạo chồi.

Các chồi có chiều cao 1,5 cm có 2 lá được tách từ cụm chồi *in vitro* có nguồn gốc dưới điều kiện SMG và G được cấy trong môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật để tạo cây con hoàn chỉnh.

Các bình nuôi cấy được đặt ở điều kiện trọng lực thực 1 g.

Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi, chiều cao chồi (cm), số lá, diện tích lá (cm^2), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), hàm lượng chlorophyll tổng ($nmol/cm^2$) được thu nhận sau 1 tháng nuôi cấy đối với thí nghiệm tạo chồi.

Chiều cao cây (cm), số rễ chính/cây (rễ), chiều dài rễ chính (cm), số lá/cây (lá), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), hàm lượng chlorophyll tổng ($nmol/cm^2$) được thu nhận sau 3 tháng nuôi cấy đối với thí nghiệm tạo cây con hoàn chỉnh.

Thí nghiệm 8.2. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG

Các chồi cao 1,0 cm với 3 lá có nguồn gốc dưới điều kiện SMG và G được cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,2 mg/L AgNPs, 8 g/L agar và 30 g/L sucrose để nhân chồi [115].

Các chồi cao 2,0 cm với 4 lá tách từ cụm chồi *in vitro* có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện SMG và G được cấy trên môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L NAA, 0,5 mg/L AgNPs, 8 g/L agar và 30 g/L sucrose để tạo rễ và cây con hoàn chỉnh [115].

Các bình nuôi cấy được đặt ở điều kiện trọng lực thực 1 g.

Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), hoạt tính CAT (U/g), APX (U/g), Hàm lượng phenolic (mg/100 g chất khô) được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy đối với chồi.

Chiều cao cây (cm), số lá/cây, chiều rộng lá (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg) được thu nhận sau 2 tuần nuôi cấy đối với cây con.

2.3.1.9. Thí nghiệm 9: Nghiên cứu ghi nhận sự tăng sinh ở môi trường trọng lực thực của mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG

Các mẫu mô sẹo khỏe mạnh của cây Diệp hạ châu đắng với khối lượng 200 mg có nguồn gốc từ điều kiện SMG và G được cấy vào môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D và 8 g/L agar [105]. Các bình nuôi cấy được đặt ở điều kiện trọng lực thực 1 g.

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g) hàm lượng flavonoid (rutin và quercetin) và lignan (hypophyllanthin và phyllanthin) (µg/g chất tươi), hàm lượng hormone SA và MEL (µg/g chất tươi) được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.3.1.10. Thí nghiệm 10: Nghiên cứu ghi nhận sự thích nghi ở vườn ươm của cây con Dâu tây nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG.

Cây con có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện SMG và G được thu nhận, rửa sạch agar; sau đó, trồng vào vỉ xốp với giá thể đất sạch (Công ty Trang Trại Việt, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam) và đặt ở điều kiện vườn ươm. Cây con được tưới phun sương 2 lần/ngày trong tuần đầu sau khi trồng, sau đó tưới 1 lần/ngày vào sáng sớm, tránh nước đọng nhiều làm cây con bị thối ngọn và rễ. Cây con đã sống sót ở vỉ xốp sẽ được chuyển qua trồng vào các chậu nhựa để ghi nhận sự thích nghi và hình thành ngó.

Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây (cm), số lá, chiều rộng lá, số rễ, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), hàm lượng chlorophyll tổng (nmol/cm^2) được thu nhận sau 4 tuần trồng ở điều kiện vườn ươm.

Thời gian hình thành ngó (ngày), tỷ lệ hình thành ngó (%), số ngó/cây, chiều dài ngó (cm), số lá, khối lượng tươi (mg) và hàm lượng chlorophyll tổng (nmol/cm^2) của ngó được thu nhận sau 8 tuần trồng ở điều kiện vườn ươm.

2.3.2. Phương pháp quan sát hình thái

- Giải phẫu hình thái:

Mẫu SEs của cây hoa Thu hải đường được giải phẫu, nhuộm đơn và quan sát dưới kính hiển vi quang học bao gồm các bước sau: (1) Các mẫu cấy ở các thí nghiệm được cố định bằng xốp và cắt thành các lát mỏng (30 - 40 μm); (2) Ngâm mẫu đã cắt trong dung dịch Javel 10% khoảng 15 phút để tẩy trắng; sau đó, rửa lại mẫu cấy bằng nước cất cho đến khi sạch Javel (3 lần); (3) Các mẫu sau khi rửa được ngâm trong axit axetic 10% khoảng 15 phút, rửa lại bằng nước cất cho đến khi sạch axit axetic (3 lần); (4) Nhuộm mẫu bằng hỗn hợp dung dịch xanh methylen 0,3% và đỏ carmine 1,0 % (Sigma-Aldrich®, Hoa Kỳ) trong 3 phút; rửa lại các mẫu bằng nước cất đến khi mẫu không còn phẩm nhuộm (3 lần); (5) Mẫu được lên lam kính có bổ sung 1 giọt nước hoặc glycerine; sau đó đậy lamen và quan sát, chụp hình dưới kính hiển vi quang học OLYMPUS CH30 (Nhật Bản) ở các vật kính khác nhau (×10, ×40, ×100) [116].

- Quan sát khí khổng:

(1) Các mô biểu bì từ mặt dưới của lá của phôi SEs cây hoa Thu hải đường 3 tháng tuổi được tách ra bằng kim mũi mác; (2) Phủ lớp lanolin mỏng trong suốt lên biểu bì, để khô rồi tách lớp lanolin ra; (3) Đặt biểu bì trên lam kính chứa một giọt nước cất, đậy lamen rồi quan sát và chụp lại bằng kính hiển vi quang học OLYMPUS (Nhật Bản) ở các vật kính khác nhau (×10, ×40, ×100) (×10, ×40, ×100).

Kích thước khí khổng được xác định bằng phần mềm ImageJ phiên bản 1.49.

- Đếm số SEs/mẫu cấy:

Các SEs được thu nhận ở các giai đoạn 1, 2, 3 và 4 tháng tuổi được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, tách và phân loại theo hình thái để phân biệt các giai đoạn phát triển của SE.

2.3.3. Điều kiện nuôi cấy

In vitro: Các mẫu cấy được cấy vào đĩa petri hoặc bình nuôi cấy tùy theo giai đoạn thí nghiệm và đặt trên các kệ cách mặt đất 1,0 m. Phòng nuôi cấy được cài đặt nhiệt độ khoảng 25 ± 2ºC, độ ẩm tương đối 55 - 60%, ánh sáng đèn huỳnh quang chiếu theo phương ngang (song song với trục quay thiết bị Clinostat 2-D để đảm bảo tất cả mẫu cấy được tiếp xúc với ánh sáng) với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày và cường độ ánh sáng 40 - 45 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

Trong giai đoạn nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái: 6 mẫu cấy của cây hoa Thu hải đường được bố trí đặt trong đĩa petri (đường kính 90 mm và chiều cao 15 mm) sao cho vị trí của các mẫu cách tâm trục quay 1,5 - 2,5 cm. Trong khi đó, đối với thí nghiệm trên cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng, 1 mẫu được đặt trong đĩa petri (đường kính 60 mm và chiều cao 15 mm) sao cho vị trí của các mẫu ngay tâm trục quay thiết bị Clinostat 2-D. Việc bố trí mẫu theo nguyên tắc đã được mô tả nhằm đảm bảo lực gia tốc tác động lên mẫu luôn nhỏ hơn $2,8 \times 10^{-3}$ g, đây là thông số đảm bảo mẫu đã ở điều kiện SMG [23]. Lực gia tốc được xác định theo công thức $F' = 1,11825 \times 10^{-5} \times w^2 \times L$ (trong đó: w là tốc độ quay tính bằng rpm; L là khoảng cách từ tâm trục quay đến mẫu tính bằng cm) [27].

Các đĩa petri được cố định trên bộ phận quay của thiết bị Clinostat 2-D với tốc độ quay 2 rpm (điều kiện SMG) [103]; đối chứng là mẫu cấy được đặt dưới điều kiện trọng lực thực 1 g của mặt đất (điều kiện G). Thiết bị Clinostat và mẫu đối chứng được đặt trên các kệ cách mặt đất 1 m trong phòng nuôi cấy.

Ex vitro: Cây con được thu nhận ở điều kiện *in vitro* và trồng ở vườn ươm Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên với nhiệt độ ban ngày khoảng 25 ± 2°C và ban đêm khoảng 17 ± 5°C, độ ẩm khoảng 75 - 80% với ánh sáng tự nhiên được che sáng bằng lưới đen 50%, pH của đất khoảng 6,5. Cây con được thu nhận, rửa agar và trồng vào vỉ xốp với giá thể đất sạch (Công ty Trang Trại Việt, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam). Cây con được tưới phun sương 2 lần/ngày trong tuần đầu sau khi trồng, sau đó tưới 1 lần/ngày vào sáng sớm, tránh nước đọng nhiều làm cây con bị thối ngọn và rễ.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm trên cây hoa Thu hải đường được lặp lại 3 lần với 12 đĩa petri/nghiệm thức (6 mẫu cấy/đĩa petri) cho mục tiêu nghiên cứu phát sinh hình thái

và lặp lại 3 lần với 20 bình nuôi cấy/nghiệm thức (1 mẫu cấy/bình) cho mục tiêu nghiên cứu sinh trưởng *in vitro*.

Mỗi thí nghiệm trên cây Dâu tây được lặp lại 3 lần với 50 đĩa petri/nghiệm thức (1 mẫu cấy/đĩa petri) cho mục tiêu nghiên cứu phát sinh hình thái; lặp lại 3 lần với 20 bình nuôi cấy/nghiệm thức (1 mẫu cấy/bình) cho mục tiêu nghiên cứu sinh trưởng *in vitro* và lặp lại 3 lần với 20 chậu/nghiệm thức (1 cây/chậu) cho mục tiêu nghiên cứu sinh trưởng *ex vitro*.

Mỗi thí nghiệm trên cây Diệp hạ châu đắng được lặp lại 3 lần với 50 đĩa petri/nghiệm thức (1 mẫu cấy/đĩa petri) cho mục tiêu nghiên cứu phát sinh hình thái và lặp lại 3 lần với 20 đĩa petri/nghiệm thức (1 mẫu cấy/đĩa petri) cho mục tiêu nghiên cứu sinh trưởng *in vitro*.

Đối với các thí nghiệm phân tích các chỉ tiêu sinh hóa, mẫu được xử lý để thu dịch chiết rồi chia làm 3 phần, sau đó đem phân tích để đảm bảo số lần lặp lại là 3 lần.

Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS phiên bản 20.0 để so sánh sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình bằng kiểm định ANOVA 1 yếu tố (với phép thử Tukey) hoặc kiểm định t-Test tùy theo từng thí nghiệm với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Các bảng và biểu đồ được tạo bởi phần mềm Microsoft Excel 2016.

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.4.1. Địa điểm nghiên cứu

Trung tâm Khoa học công nghệ Dược Sài Gòn (SAPHARCEN) - Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh: Phân tích hoạt tính enzyme kháng oxy hóa.

Viện Công nghệ sinh học và Môi trường (IBE) - Trường Đại học Tây Nguyên: Xác định hàm lượng đường và tinh bột, hormone nội sinh, hợp chất thứ cấp.

Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên: Thực hiện tất cả các thí nghiệm nghiên cứu còn lại liên quan đến luận án.

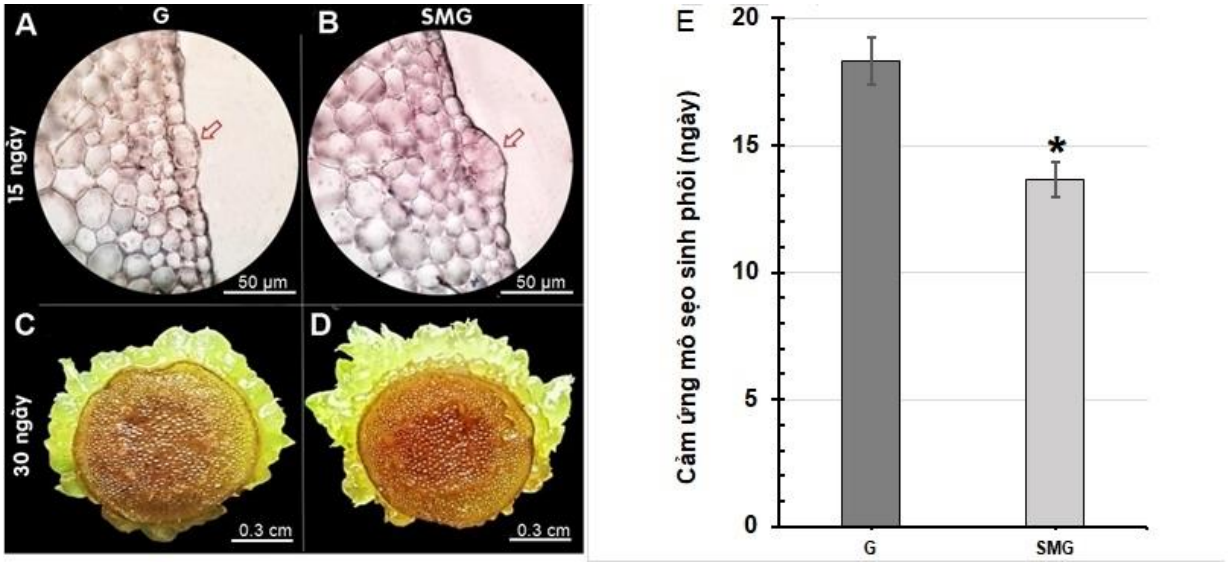
2.4.2. Thời gian nghiên cứu

Thời gian thực hiện luận án: Từ tháng 5/2020 đến 5/2023.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

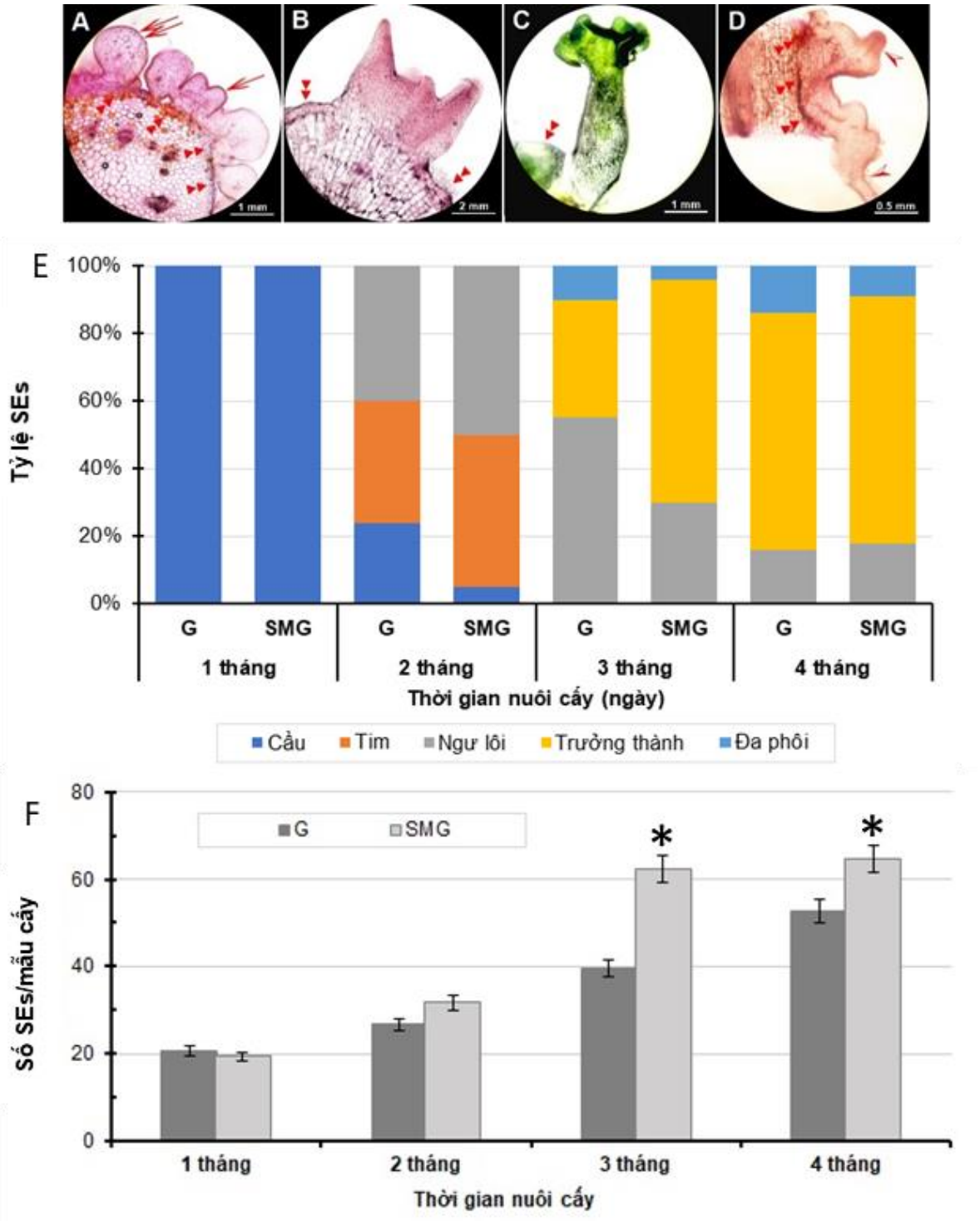
3.1. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh SEs của mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro*

Kết quả ghi nhận được cho thấy điều kiện SMG không ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của các mẫu cấy với tỷ lệ tái sinh đều đạt 100% ở nghiệm thức SMG và G sau 30 ngày nuôi cấy (Hình 3.1A-D). Tuy nhiên, vào ngày nuôi cấy thứ 14, các mẫu cấy của nghiệm thức SMG đã bắt đầu xảy ra hiện tượng cảm ứng (Hình 3.1B); trong khi vẫn chưa có tế bào biểu bì nào của mẫu của nghiệm thức G có hiện tượng này (Hình 3.1A). Hơn nữa, quan sát hình thái cho thấy sự phát sinh SEs từ mô sẹo sinh phôi trong điều kiện G (Hình 3.1C) xảy ra với tốc độ chậm hơn so với điều kiện SMG (Hình 3.1D) sau 30 ngày nuôi cấy. Có thể thấy điều kiện SMG đã rút ngắn thời gian cảm ứng phát sinh SEs so với nghiệm thức ở điều kiện G (khoảng 5 ngày) (Hình 3.1E). Kết quả này cho thấy rằng dù chỉ tiếp xúc trong thời gian ngắn với điều kiện SMG nhưng nó có những tác động sớm lên sự cảm ứng SEs ở cây hoa Thu hải đường.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự cảm ứng SEs của mẫu p-tTCL cây hoa Thu hải đường *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy

A, B: Quá trình tạo SEs bắt đầu từ lớp biểu bì tế bào mẫu p-tTCL sau 15 ngày nuôi cấy (mũi tên chỉ sự cảm ứng của tế bào); **C, D:** Biệt hóa SEs từ mô sẹo sinh phôi sau 30 ngày nuôi cấy; **E:** Thời gian cảm ứng của mô sẹo sinh phôi; *Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình theo phép thử Tukey ($p < 0,05$). Hình ảnh được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính ×40.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên các giai đoạn phát triển của SEs ở mẫu p-tTCL cây hoa Thu hải đường *in vitro* sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy

A-C: Các giai đoạn phát triển của SEs quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính ×40, tam giác kép chỉ lớp biểu bì của tế bào mẫu cấy p-tTCL; **A.** Sự hình thành phôi hình cầu (mũi tên kép) và phôi hình tim (mũi tên) sau 2 tháng nuôi cấy; **B:** Sự hình thành đa phôi sau 3 tháng nuôi cấy; **C:** Sự hình thành phôi hình ngư lôi sau 2 tháng nuôi cấy; **D:** Sự hình thành rễ bất định (mũi tên) từ lớp biểu bì của tế bào mẫu p-tTCL sau 2 tháng nuôi cấy; **E:** Tỷ lệ các loại SEs; **F:** Tổng số SEs tại các thời điểm ghi nhận; *Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình theo phép thử Tukey ($p < 0,05$).

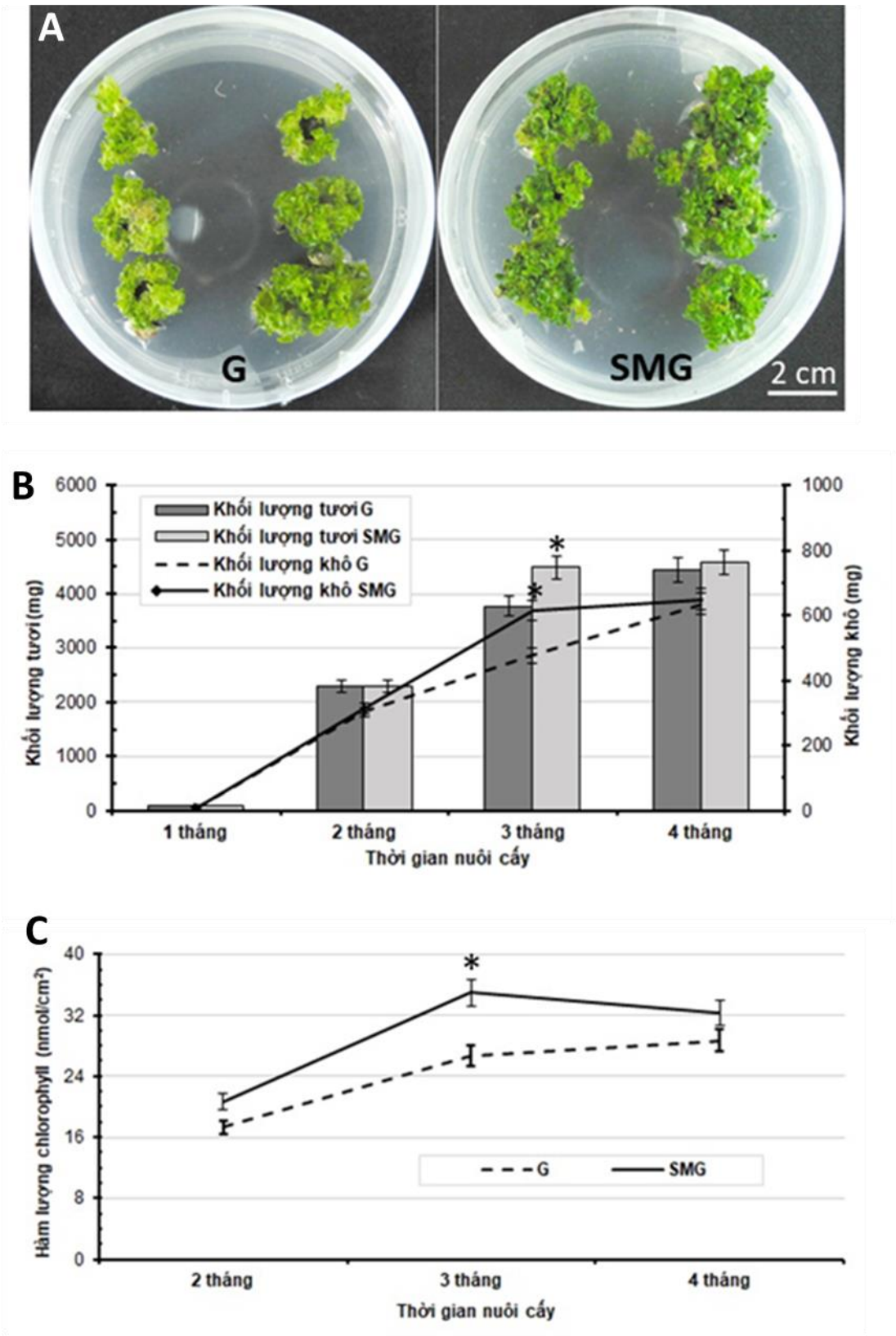
Sau 3 tháng nuôi cấy, kết quả cho thấy có hai chương trình biệt hóa đã diễn ra trong cả điều kiện SMG và G đó là SEs (Hình 3.2A-C) và rễ bất định (Hình 3.2D). Trong đó, SEs là chủ yếu trong khi cơ quan rễ bất định chỉ hình thành với số lượng không đáng kể (dữ liệu không thể hiện). Những kết quả này chỉ ra rằng điều kiện SMG không hề can thiệp đến sự biệt hóa tế bào mẫu p-tTCL cây hoa Thu hải đường. Hơn nữa, quan sát hình thái mô học cho thấy dưới điều kiện SMG thì SEs vẫn trải qua các giai đoạn phát triển điển hình của phôi soma tương tự như G (Hình 3.2E).

Các giai đoạn phát triển của SEs dưới điều kiện SMG đã được quan sát chi tiết, bao gồm cấu trúc hình cầu; hình tim (Hình 3.2A); một dạng khác đã được quan sát gọi là đa phôi (những SEs ở dạng dính liền thành một cụm không thể tách rời) (Hình 3.2B); hình ngư lôi (Hình 3.2C) và dạng trưởng thành (phôi đã hình thành rễ và lá mầm, hoặc thậm chí là lá) (Hình 3.2D). Các giai đoạn phát triển của SEs diễn ra khá đồng thời dưới điều kiện SMG và G. Cụ thể, sau 1 tháng nuôi cấy, các SEs hình cầu đã chiếm ưu thế (với tỷ lệ 100%), bất kể có hay không có sự hiện diện của trọng lực. Vào tháng thứ 2 của quá trình nuôi cấy, tần số SEs hình cầu đã giảm mạnh, mà thay vào đó là sự xuất hiện của SEs ở giai đoạn hình tim và ngư lôi trong cả nghiệm thức SMG và G; cũng như đây đã là thời điểm duy nhất xuất hiện SEs hình tim. Trong giai đoạn 3 - 4 tháng nuôi cấy thì SEs ở giai đoạn hình cầu và hình tim đã hoàn toàn chấm dứt và chuyển tiếp thành các SEs ở giai đoạn hình ngư lôi, trưởng thành và đa phôi trong cả hai nghiệm thức. Trong đó, SEs có cấu trúc đa phôi ở cả hai điều kiện SMG (4% và 9%) và G (10% và 14%) chiếm tỷ lệ thấp hơn các dạng còn lại (Hình 3.2E). Nhìn chung điều kiện SMG không ảnh hưởng đến sự phát triển của SEs; tuy nhiên, sự thiếu hụt trọng lực đã gây ảnh hưởng đáng kể đến tiềm năng tái sinh SEs của các mẫu cấy được thể hiện qua số lượng của chúng ở Hình 3.2F.

Số lượng SEs tại các mốc thời gian 1, 2, 3 và 4 tháng được ghi lại và thể hiện trong Hình 3.2F. Kết quả cho thấy sau 1 và 2 tháng nuôi cấy thì số lượng SEs của nghiệm thức SMG và G không thể hiện sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,05$). Tuy nhiên, sau 3 tháng nuôi cấy dưới điều kiện SMG, số lượng SEs cao hơn 1,57 lần so với điều kiện G (62,33 và 39,67 SEs, tương ứng). Khi thời gian tiếp xúc với điều kiện SMG được kéo dài từ 3 đến 4 tháng, số lượng SEs của nghiệm thức

SMG có xu hướng dừng lại, biểu hiện là số lượng SEs tăng lên không rõ ràng; trong khi đó, số lượng SEs của nghiệm thức G tiếp tục tăng tuyến tính (Hình 3.2F). Dữ liệu thu được đã chứng minh rằng điều kiện SMG kích thích sự phát triển SEs; hay nói cách khác sự hiện diện của trọng lực kìm hãm sự phát triển SEs của cây hoa Thu hải đường.

Các tác động của điều kiện SMG lên sự phát triển của các SEs đã được đánh giá thông qua khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng chlorophyll tổng (Hình 3.3). Kết quả cho thấy không có sự khác biệt đáng kể nào được tìm thấy về sinh khối giữa nghiệm thức SMG và G sau 1 và 2 tháng nuôi cấy. Tuy nhiên, sự phát triển của các SEs được thúc đẩy ở một mức độ nào đó khi tiếp xúc với điều kiện SMG sau 3 tháng nuôi cấy (Hình 3.3A); trong đó khối lượng tươi và khối lượng khô của các SEs đã gia tăng đáng kể trong nghiệm thức thiếu vắng trọng lực (4485,00 mg và 615,00 mg; tương ứng) so với điều kiện G (3776,67 mg và 476,67 mg; tương ứng) (Hình 3.3B). Tuy nhiên, khối lượng tươi và khối lượng khô của các SEs đã không có sự chênh lệch đáng kể giữa hai nghiệm thức sau 4 tháng nuôi cấy (Hình 3.3B). Sau 3 tháng nuôi cấy, hàm lượng chlorophyll của nghiệm thức SMG (35,00 nmol/cm^2) cao hơn đáng kể so với G (26,67 nmol/cm^2); trong khi hàm lượng chlorophyll dưới điều kiện SMG đã giảm khi kéo dài thời gian nuôi cấy lên 4 tháng và kết quả ngược lại đã được ghi nhận trong trường hợp của G (Hình 3.3C). Các kết quả này cho thấy, những tác động tiềm tàng của việc tiếp xúc dài hạn với điều kiện SMG lên sự phát triển của thực vật.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát triển của SEs ở mẫu p-tTCL cây hoa Thu hải đường *in vitro* sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy

A: Quá trình tạo SEs dưới điều kiện SMG và G sau 3 tháng nuôi cấy; **B:** Khối lượng tươi và khối lượng khô của SEs; **C:** Hàm lượng chlorophyll tổng số trong lá của SEs trưởng thành; *Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình theo phép thử Tukey ($p < 0,05$).

Trong giai đoạn cảm ứng SEs, điều kiện SMG được xác định là nguyên nhân gây nên cảm ứng sớm của SEs cây hoa Thu hải đường. Các nghiên cứu hiện có đã xác nhận rằng điều kiện SMG gây ra sự tăng tốc đáng kể quá trình phân chia tế bào thực vật [117], [118]. Những kết quả này gợi ý rằng điều kiện SMG kích thích có lợi cho việc bắt đầu hình thành SEs.

Trong giai đoạn hình thành và phát triển của SEs, bất kể sự thiếu trọng lực thì SEs vẫn diễn ra với đầy đủ và tuần tự theo bốn giai đoạn chính, bao gồm giai đoạn hình cầu, tim, thủy lôi và trưởng thành. Bên cạnh đó các SEs được tái sinh dưới điều kiện SMG không có bất kỳ khiếm khuyết nào đã được quan sát. Kết quả tương tự đã được báo cáo trên các SEs cây Cà rốt [119] hay cây Orchardgrass [117] đều được tái sinh từ tế bào đơn dưới điều kiện TMG. Các kết quả này cho thấy rằng, các tế bào soma có thể thể hiện đầy đủ tính toàn năng của mình để tạo nên những SEs dưới điều kiện MG. Mặc khác, sự phát sinh phôi thông qua hạt giống thì đã tỏ ra thất bại dưới MG; chẳng hạn như trên cây Lúa mì [120], cây *Brassica rapa* [121], [122]. Các kết quả này đề xuất rằng SEs ít chịu tác động của điều kiện MG, trong khi sự phát sinh phôi hợp tử cần được cân nhắc thận trọng cho mục đích tạo ra hạt giống trong môi trường không gian.

Kết quả về ảnh hưởng của điều kiện MG lên SEs đã được công bố trong một số nghiên cứu trước đây dù có sự khác biệt giữa các báo cáo này [117], [119]. Trong trường hợp của cây Cà rốt [119] và *Arabidopsis* [123] thì hệ số tái sinh SEs không hề thay đổi dưới MG. Ngược lại, tác động tiêu cực của điều kiện TMG đối với SEs cây Orchardgrass đã được báo cáo [117], theo đó SEs giảm 70% sau 21 giờ bay vào vũ trụ. Tuy nhiên, việc xử lý để tạo ra trọng lực 1g bằng máy ly tâm trên chuyến bay này (đối chứng tại chỗ) không có cho các thí nghiệm liên quan; do đó các tác giả đề xuất các nghiên cứu chặt chẽ hơn trước khi đưa ra kết luận liệu rằng điều kiện MG hay các yếu tố khác của chuyến bay vũ trụ có tác động tới SEs [117]. Trong trường hợp hiện tại cây hoa Thu hải đường, số lượng SEs được tái sinh từ các mẫu p-tTCL đã tăng cao đáng kể dưới điều kiện SMG. Đây có thể là kết quả của sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh và các chất năng lượng dưới điều kiện MG.

Phân tích các chỉ số sinh trưởng, tỷ lệ phôi trưởng thành cho thấy, các SEs được nuôi cấy dưới điều kiện MG sau 4 tháng đã bắt đầu bước sang giai đoạn già hóa. Hàm lượng chlorophyll tổng trong lá của các phôi trưởng thành đã được tăng

lên rõ ràng trong điều kiện MG. Tuy nhiên, hàm lượng chlorophyll giảm khi số ngày tiếp xúc MG tăng lên; kết quả tương tự đã được ghi nhận trên cây Cẩm chướng [124] và cây Lúa [9]. Bên cạnh đó khối lượng tươi và khối lượng khô của các SEs đều không có sự gia tăng đáng kể trong khoảng thời gian này cũng cho thấy sự dừng lại sinh trưởng để chuyển sang giai đoạn già hóa. Mặt khác, tỷ lệ SEs trưởng thành (phôi đã nảy mầm) dưới điều kiện MG thì cao hơn đáng kể so với G đã được quan sát. Các kết quả tương tự đã được ghi nhận trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau với những cách giải thích khác nhau. Theo Kordyum và cộng sự (2019), MG thúc đẩy các quá trình dị hóa trong tế bào dẫn đến tăng tốc sự phân hóa tế bào và đồng nghĩa với sự lão hóa của thực vật dưới stress này [125]. Sự lão hóa tế bào thực vật cũng có thể liên quan đến sự thay đổi hàm lượng và tỷ lệ hormone nội sinh của mẫu cấy dưới điều kiện MG.

Quá trình phát sinh SEs có thể được thực hiện thông qua hai con đường là trực tiếp hoặc gián tiếp. Khi quá trình phát sinh trực tiếp, SEs sẽ được hình thành ở phần mép của mẫu cấy; trong khi đó, phát sinh SEs gián tiếp sẽ xảy ra thông qua sự tăng sinh của mô sẹo [126]. Trong nghiên cứu này, mẫu cấy sau 14 ngày nuôi cấy đã cảm ứng mô sẹo có khả năng sinh phôi ở nghiệm thức SMG và chậm hơn 5 ngày ở nghiệm thức G. Điều này cho thấy, điều kiện nuôi cấy SMG và G cũng ảnh hưởng lên thời gian cảm ứng mẫu cấy. Ngoài ra, khi các tế bào có khả năng sinh phôi được tạo ra thì sẽ thúc đẩy tế bào tạo phôi; do đó, các tế bào mới này có thể hình thành các cấu trúc có khả năng tái sinh một cây hoàn chỉnh. Cho đến nay, các nhà khoa học vẫn chưa xác định rõ ràng là làm thế nào các tế bào có thể bắt đầu hình thành phôi ngoài việc cho rằng sự phân bố auxin không đối xứng được thiết lập để phôi hình thành [127]. Trong trường hợp phôi hợp tử, sự phân chia tế bào không đối xứng xảy ra, trong khi ở SEs thì điều này thường không được quan sát thấy [127]. Sự phân chia phân bào không đối xứng của hợp tử tạo ra hai tế bào khác nhau: một tế bào tạo ra tế bào treo và tế bào còn lại tạo ra phôi. Ở giai đoạn bát phân và hình cầu, sự hình thành tiền bì và sự khởi đầu nguyên thủy diễn ra [128]. Sự vận chuyển và phân bố auxin không đối xứng tiếp tục trong các giai đoạn này, tạo ra các mô khác nhau sẽ hình thành phôi. Sự vận chuyển và tích lũy auxin tạo ra sự tương tác với các yếu tố khác, chẳng hạn như cytokinin, dẫn đến sự biểu hiện của các gen cụ thể [128]. Ở các giai đoạn phát triển phôi soma như hình cầu, hình tim, hình thủy lôi

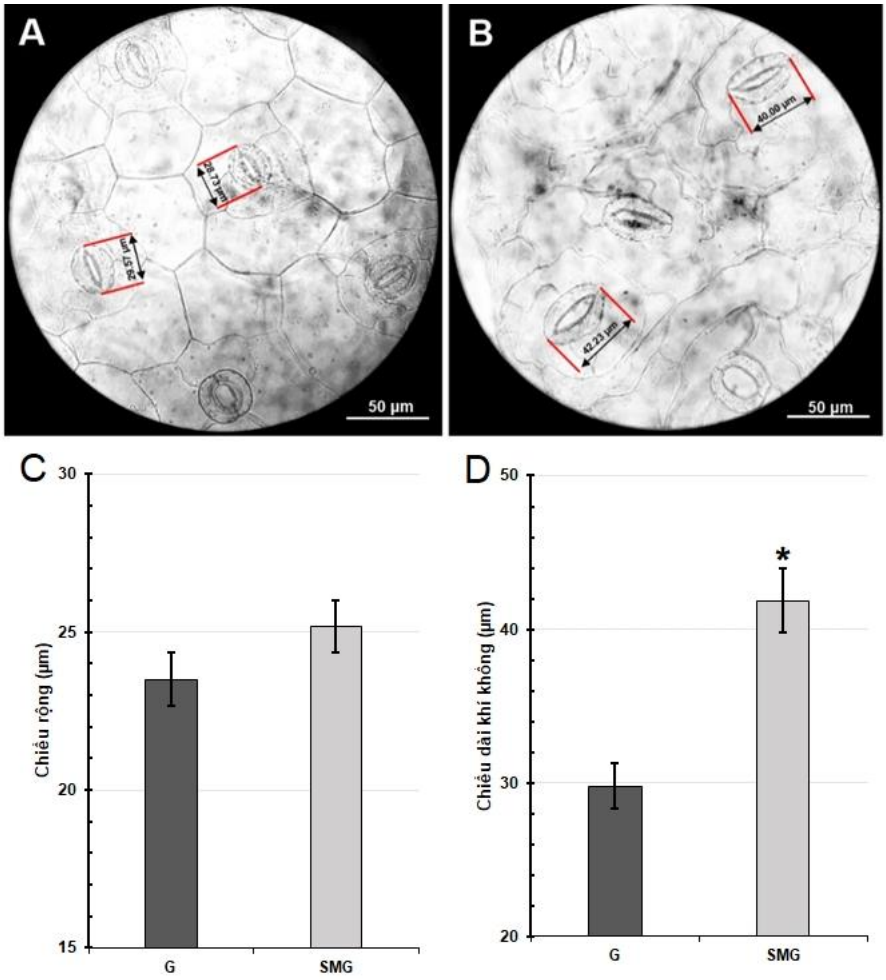
và hai lá mầm thì các phôi phôi soma hay phôi hợp tử có sự giống nhau về hình thái. Các nghiên cứu chứng minh rằng phôi hợp tử được nuôi dưỡng thông qua mô phloem; trong khi đó, phôi soma sử dụng nguồn cung cấp carbohydrate ngoại sinh [129].

Vì vậy, có thể nhận thấy rằng có nhiều yếu tố gây ra sự hình thành phôi soma như loại môi trường nuôi cấy, nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật cao và vết thương của mẫu cấy là những stress khác có thể khiến tế bào thực vật thay đổi chương trình tế bào và phân tử của chúng. Trong nghiên cứu này, điều kiện nuôi cấy SMG và G đã ảnh hưởng đến thời gian cảm ứng phôi và hiệu quả cảm ứng phôi; trong đó, thời gian cảm ứng sớm hơn, số lượng phôi nhiều hơn và phôi ở dạng hình thủy lôi và hai lá mầm nhiều hơn khi mẫu cấy nuôi cấy dưới điều kiện SMG.

Khí khổng có vai trò quan trọng trong việc trao đổi khí giữa bên trong cơ thể thực vật và môi trường; do đó nó tác động đến năng suất cây trồng và hiệu suất trao đổi khí để cung cấp oxy trong không khí. Như đã thể hiện ở Hình 3.4, điều kiện SMG gây ra hình thái khí khổng bất thường. Về cơ bản, các quan sát hình thái cho thấy khí khổng ở điều kiện G có hình bầu dục đặc trưng (Hình 3.4A); trong khi đó khí khổng của nghiệm thức SMG có hình elip (thuôn dài) và độ mở khí khổng lớn hơn đã được quan sát (Hình 3.4B). Dưới điều kiện SMG, các khí khổng có chiều dài gấp 1,4 lần so với đối chứng (Hình 3.4D); trong khi đó, chiều rộng của khí khổng không thay đổi dưới điều kiện SMG (Hình 3.4C). Bằng chứng này tiết lộ rằng việc tiếp xúc lâu dài với điều kiện SMG gây ra những biến đổi lớn trong cấu trúc tế bào.

Khí khổng là cánh cổng kiểm soát việc trao đổi khí của thực vật, trong khi ABA là một phytohormone ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển, sự đóng/mở của khí khổng và sự mở rộng của pavement cells (tiền thân của khí khổng). Ở đây, sự tiếp xúc lâu dài với điều kiện SMG có thể đã kích thích tổng hợp ABA và điều này có thể có liên quan đến sự kéo dài bất thường của các tế bào bảo vệ khí khổng cây hoa Thu hải đường cần được nghiên cứu kỹ lưỡng hơn. Có nhiều tài liệu chứng minh rằng tổ chức cao của các vi ống và sợi actin có thể liên quan đến sự phát sinh hình thái khí khổng [130], [131], [132]; nghĩa là chúng kiểm soát trạng thái và hình thái khí khổng [133]. Theo mô tả của Galatis và cộng sự (2004), các vi ống đóng vai trò quan trọng trong việc phối hợp định hướng lắng đọng các vi sợi cellulose và

điều này trực tiếp quyết định độ dày và tính chất cơ học của vách tế bào khí khổng, từ đó quyết định hình dạng của chúng [132].



Hình 3.4. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hình thái khí khổng trong lá SEs trưởng thành được tạo thành từ mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường *in vitro*
A: Dưới điều kiện G; **B:** Dưới điều kiện SMG; **C, D:** Chiều rộng và chiều dài của khí khổng; *Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình theo phép thử Tukey ($p < 0,05$). Khí khổng được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính ×40.

Tuy nhiên, những rối loạn trong tổ chức của khung tế bào dưới tác dụng của điều kiện thiếu trọng lực đã được báo cáo [134], [135]; và kết quả là các tế bào cho thấy sự gia tăng kích thước bất thường [134]. Một cách nhất quán, kết quả cũng chỉ ra rằng kích thước của tế bào khí khổng cây hoa Thu hải đường đã tăng bất thường dưới điều kiện SMG. Ngoài ra, các ion Ca^{2+} làm thay đổi độ mở của khí khổng [136] bằng cách điều chỉnh hoạt động của nhiều protein liên kết với actin [137]. Tuy nhiên, bằng chứng sẵn có đã chỉ ra rằng nồng độ Ca^{2+} bị thay đổi đáng kể trong điều kiện SMG [138] và nó cũng có thể ảnh hưởng đến sự hình thành khí khổng. Như báo cáo bởi Treesubsuntorn và cộng sự (2020), điều kiện MG đã gây ra hiện

tượng tích tụ IAA bất thường trong lá cây và điều này giúp các khí khổng của cây *Chlorophytum comosum* luôn duy trì ở trạng thái mở từ đó giúp nâng cao hiệu suất loại bỏ benzen trong không khí [139]. Xem xét tất cả các thông tin trên, có thể thấy rằng sự phát sinh hình thái của khí khổng dưới tác dụng của SMG bị thay đổi có thể liên quan đến ABA và tín hiệu Ca^{2+} hoặc sự định hướng của khung tế bào. Hơn nữa, kết quả cho thấy những quan ngại đáng kể về tác động của điều kiện SMG lên cánh cổng trao đổi khí thực vật. Do đó, cần nhiều nghiên cứu sâu rộng hơn về sự thay đổi của khí khổng dưới điều kiện SMG nhằm mục đích cải thiện không khí trong môi trường không gian [139] cũng như khí khổng quyết định đến sinh trưởng thực vật thông qua kiểm soát lượng khí ra vào cây.

3.2. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu cấy lá cây Dâu tây nuôi cấy *in vitro*

Kết quả ghi nhận được cho thấy, thời gian cảm ứng (2 tuần) và hình thái mô sẹo dưới điều kiện SMG và điều kiện G được quan sát là tương đồng; tuy nhiên, khả năng tái sinh chồi của mẫu cấy lá Dâu tây *in vitro* dưới hai điều kiện có sự khác biệt (Bảng 3.1 và Hình 3.5). Mẫu lá nuôi cấy dưới điều kiện SMG cho khả năng tái sinh chồi (3 tuần) sớm hơn khoảng 1 tuần so với điều kiện G. Ngoài ra, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi và mẫu cấy không cảm ứng mô sẹo cũng ghi nhận sự khác biệt giữa hai điều kiện nuôi cấy (Bảng 3.1). Sau 2 tuần nuôi cấy, 53,33% mẫu lá nuôi cấy ở điều kiện SMG cho cảm ứng mô sẹo; chỉ có 25% mẫu lá là có cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện G và chưa ghi nhận tái sinh chồi ở cả hai điều kiện nuôi cấy. Ở tuần thứ 3, mẫu lá ở điều kiện SMG tiếp tục gia tăng cảm ứng mô sẹo (66,33%), một số mẫu tái sinh chồi bất định (6,67%) và số mẫu chưa cảm ứng là 27%; trong khi đó, mẫu lá nuôi cấy ở điều kiện G ghi nhận 46,33% mẫu cấy cảm ứng mô sẹo và 53,67% mẫu cấy chưa cảm ứng mô sẹo (không ghi nhận mẫu cấy tái sinh chồi ở điều kiện G) (Bảng 3.1). Ở tuần thứ 4, mẫu lá tái sinh chồi ở điều kiện SMG (19,33%) cao hơn so với mẫu lá nuôi cấy ở điều kiện nuôi cấy G (13%) và tiếp tục tăng lên ở tuần nuôi cấy thứ 6 (36,33% so với 21,33%) (Bảng 3.1). Tỷ lệ mẫu lá không cho cảm ứng ở điều kiện SMG chỉ đạt 7% thấp hơn so với mẫu lá dưới điều kiện G sau 6 tuần nuôi cấy.

Ngoài ra, sinh khối của mẫu cấy (khối lượng tươi và khô) ở điều kiện SMG cao hơn so với điều kiện G sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy (Bảng 3.1). Kết quả

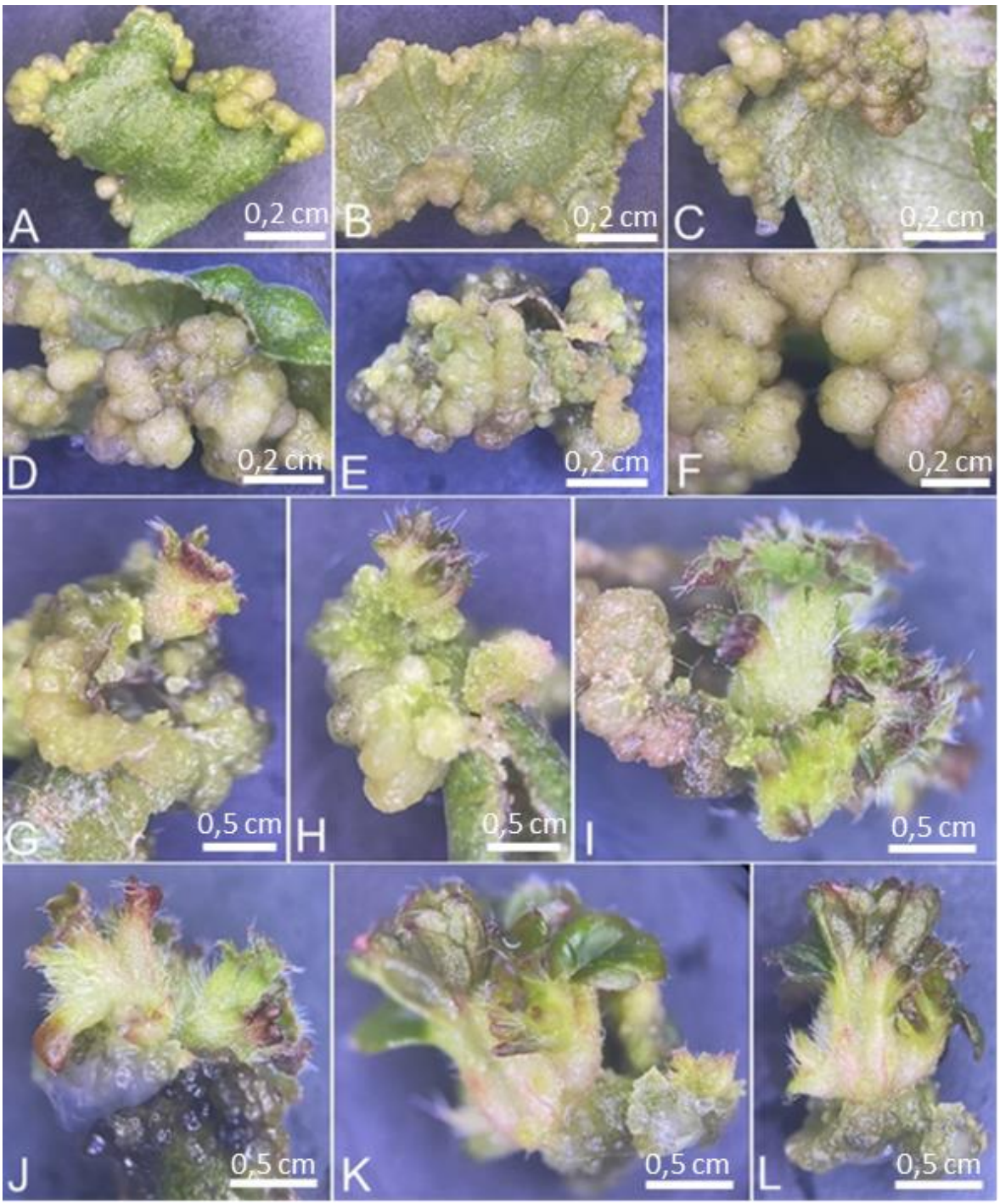
nghiên cứu này cho thấy, khối lượng tươi của mẫu cấy cũng có sự khác biệt giữa 2 điều kiện nuôi cấy sau 2 tuần ghi nhận (Bảng 3.1 và Hình 3.5). Khối lượng tươi của cụm mô sẹo (117,49 mg) tăng 2,35 lần so với mẫu lá ban đầu (50 mg) dưới điều kiện SMG cao hơn so với khối lượng tươi cụm mô sẹo (90,86 mg) nuôi cấy dưới điều kiện G chỉ tăng 1,8 lần. Sinh khối của mẫu cấy tiếp tục tăng sau 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy và dưới điều kiện SMG sinh khối tăng gấp khoảng 1,2 lần so với mẫu cấy dưới điều kiện G (Bảng 3.1). Sự thay đổi về khối lượng khô của cụm mô sẹo cũng tương tự như khối lượng tươi. Sau 4 và 6 tuần nuôi cấy dưới điều kiện SMG, mẫu cấy tái sinh chồi nhiều hơn do đó sinh khối của mẫu cấy cũng gia tăng hơn so với điều kiện G.

Quá trình vi nhân giống được thực hiện thông qua hai con đường là tái sinh trực tiếp hoặc gián tiếp dưới tác động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Trong tái sinh trực tiếp, chồi bất định phát triển từ mẫu cấy; trong khi tái sinh gián tiếp, mô sẹo được hình thành từ mẫu cấy ban đầu và chồi được phát triển từ mô sẹo như kết quả của nghiên cứu này đã được ghi nhận. Lá được coi là một vật liệu hiệu quả được chứng minh là có khả năng tái sinh chồi trực tiếp hoặc gián tiếp với tần suất cao trong nhiều cây trồng khác nhau [140], [141]. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng thực vật và điều kiện nuôi cấy (SMG và G) đã ảnh hưởng lên quá trình cảm ứng mô sẹo cũng như tái sinh chồi gián tiếp thông qua mô sẹo cây Dâu tây.

Sự tiến hóa của thực vật gắn liền với quá trình thay đổi môi trường sống từ đại dương lên cạn được định hướng bởi trọng lực theo một hướng và cường độ không đổi trên Trái Đất. Thực vật đã phát triển các cơ chế kháng trọng lực trong quá trình tiến hóa và thực vật mất tín hiệu ổn định và đáng tin cậy của trọng lực trong điều kiện MG. Thực vật mất đi định hướng tăng trưởng của trọng lực và không cần phải chiến đấu chống lại trọng lực để tồn tại trong môi trường MG [142]. Kết quả là, nó không chỉ mất trọng lực, mà còn dẫn đến sự suy yếu của hệ thống mô nâng đỡ trong cơ thể. Do đó vách tế bào sẽ được nới lỏng để thực vật thích nghi của với việc không sử dụng hệ thống mô nâng đỡ trong điều kiện MG. Khả năng mở rộng của vách tế bào và sự cân bằng giữa độ cứng của vách với áp suất trương nước của tế bào được thiết lập sẽ phá vỡ sự cân bằng của các lực cơ học trong tế bào dẫn đến sự thay đổi quá trình sinh trưởng của tế bào và cơ quan, sau đó ảnh hưởng đến sự sinh

trưởng và phát triển của cây trồng [142]. Mô sẹo của cây Lúa nuôi cấy trong điều kiện MG đã xác định được 8 bản phiên mã liên quan đến sự hình thành vách tế bào; trong đó có 3 bản phiên mã được điều chỉnh liên quan đến sự phân hủy vách tế bào và 5 bản phiên mã được điều chỉnh để sinh tổng hợp các protein tham gia vào quá trình nới lỏng vách tế bào [143].

Sự thay đổi trọng lực ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và tăng sinh không chỉ ở cấp độ tế bào mà còn ở cấp độ toàn bộ cơ thể sinh vật [17]. Kết quả nghiên cứu này đã cho thấy sự gia tăng sinh khối dưới điều kiện SMG tương tự kết quả thu được trên cây họ Đậu [144]; cây Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) [24], [40]. Những kết quả về này có thể được giải thích bởi điều kiện MG duy trì nới lỏng vách tế bào thực vật [24], [142] hoặc tiết kiệm năng lượng dành cho các quá trình khác như sinh tổng hợp các chất chuyển hóa có lợi cho sự tăng trưởng của thực vật [40].



Hình 3.5. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu lá Dâu tây *in vitro* sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy

Tạo mô sẹo sau 2 tuần **(A)**, 3 tuần (**B, C**), 4 tuần (**D**), 6 tuần (**E, F**); Tái sinh chồi sau 3 tuần (**G**) dưới điều kiện SMG; Tái sinh chồi sau 4 tuần dưới điều kiện G (**H**) và SMG (**I**); Tái sinh chồi sau 6 tuần điều kiện G (**J**) và SMG (**K, L**).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và chồi của mẫu lá Dâu tây *in vitro* sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy	**2 tuần**		**3 tuần**		**4 tuần**		**6 tuần**	
Chỉ tiêu theo dõi	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**
Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	25,00 ± 2,89^{d*}	53,33 ± 1,45^{bc}	46,33 ± 1,45^{c}	66,33 ± 1,45^{a}	62,00 ± 2,89^{ab}	57,00 ± 1,53^{abc}	62,67 ± 2,19^{ab}	56,67 ± 3,48^{abc}
Tỷ lệ không cảm ứng (%)	75,00 ± 2,89^{a}	46,67 ± 1,45^{b}	53,67 ± 1,45^{b}	27,00 ± 1,53^{c}	25,00 ± 2,89^{c}	23,67 ± 0,67^{cd}	16,00 ± 1,00^{d}	7,00 ± 1,54^{e}
Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	-**	-	-	6,67 ± 0.89^{d}	13,00 ± 0,00^{c}	19,33 ± 1,20^{b}	21,33 ± 1,76^{b}	36,33 ± 2,33^{a}
Khối lượng tươi (mg)	90,86 ± 3,88^{e}	117,49 ± 2,18^{d}	114,34 ± 5,00^{d}	158,85 ± 4,47^{c}	149,69 ± 3,67^{c}	194,20 ± 4,51^{b}	183,25 ± 3,94^{b}	223,25 ± 6,58^{a}
Khối lượng khô (mg)	10,92 ± 0,43^{e}	13,83 ± 0,30^{d}	13,61 ± 0,36^{d}	17,69 ± 0,48^{c}	17,65 ± 0,05^{c}	20,85 ± 0,85^{b}	19,48 ± 0,42^{bc}	24,97 ± 0,19^{a}

**Các chữ cái khác nhau (a, b,...) trong cùng một dòng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) giữa các nghiệm thức theo phép thử Tukey. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn).*
***Không ghi nhận số liệu.*

3.3. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu cấy lóng thân cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*

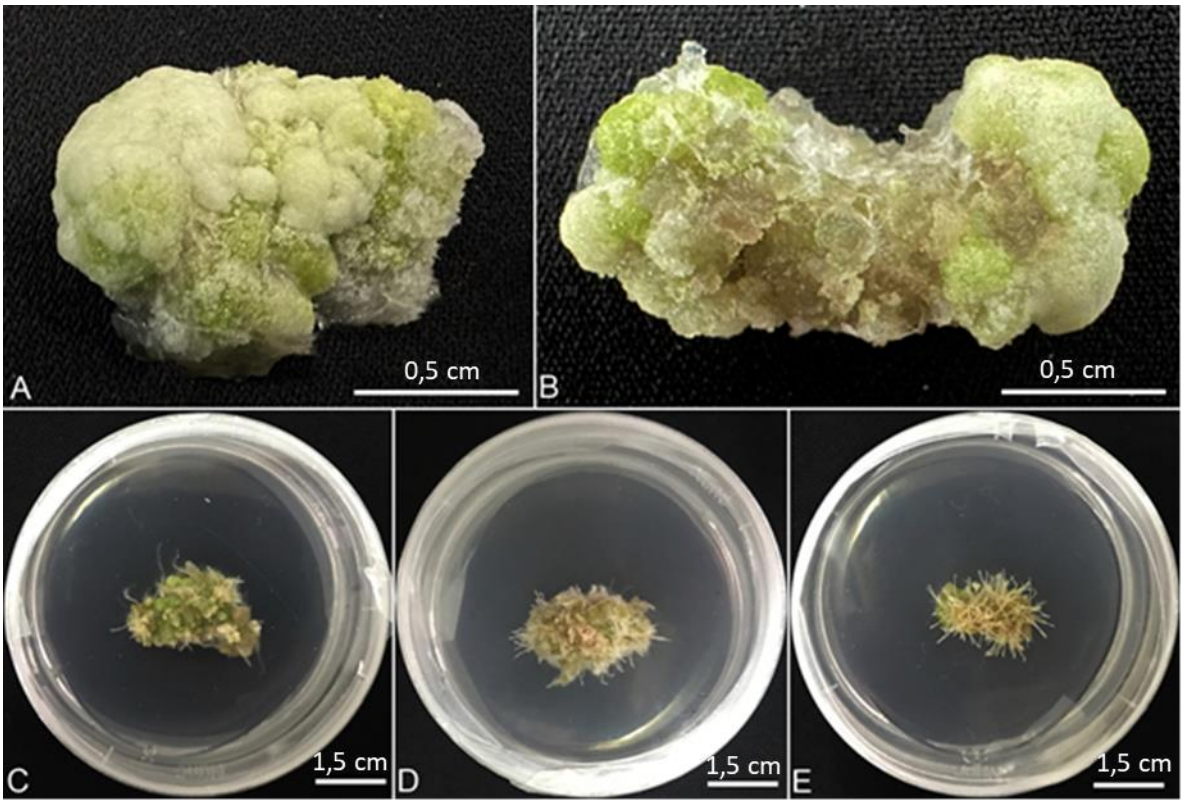
Kết quả ghi nhận được cho thấy, thời gian cảm ứng mô sẹo của mẫu lóng thân cây Diệp hạ châu đắng dưới điều kiện SMG và G không có sự khác biệt. Tuy nhiên, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và hình thành rễ bất định cho thấy sự khác biệt giữa 2 điều kiện nuôi cấy (Bảng 3.2). Sau 2 tuần nuôi cấy, mẫu lóng thân nuôi cấy dưới điều kiện SMG ghi nhận 93,33% cảm ứng mô sẹo và 6,67% hình thành rễ bất định; trong khi đó, tất cả mẫu lóng thân đều cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện G. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo giảm và tỷ lệ hình thành rễ bất định gia tăng ở điều kiện SMG sau 3 và 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.2). Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện SMG chỉ còn 34,33% và tỷ lệ hình thành rễ bất định tăng lên 65,67%. Dưới điều kiện G, không ghi nhận hình thành rễ bất định sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.2 và Hình 3.6).

Khối lượng tươi của mẫu cấy cũng có sự khác biệt giữa 2 điều kiện SMG và G sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.2). Khối lượng tươi của cụm mô sẹo (792,00 mg) tăng 1,46 lần dưới điều kiện SMG cao hơn khối lượng tươi cụm mô sẹo (313,33 mg) nuôi cấy dưới điều kiện G chỉ tăng 1,19 lần sau 4 tuần nuôi cấy. Sự thay đổi về khối lượng khô của cụm mô sẹo trong điều kiện SMG và G cũng tương tự như khối lượng tươi (Hình 3.6). Dưới điều kiện SMG, khối lượng khô cụm mô sẹo (79,17 mg) cao hơn so với khối lượng khô mẫu cấy dưới điều kiện G (30,07 mg). Ngoài ra, hình thái bên ngoài cụm mô sẹo nuôi cấy dưới SMG và đối chứng sau 4 tuần khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi không có sự khác biệt.

Cho đến nay, các nghiên cứu xoay quanh vấn đề làm rõ cơ chế tăng sinh tế bào trong điều kiện không trọng lực [37], [40], [24] đã chứng minh rằng trên mặt đất, các tế bào thực vật phải tiêu tốn năng lượng để duy trì cân bằng nội môi theo hướng chống lại trọng lực, trong điều kiện MG, năng lượng đó có thể được tiết kiệm cho quá trình khác như sinh tổng hợp các chất chuyển hóa có lợi cho sự tăng trưởng. Ngoài ra, điều kiện MG (stress lực hấp dẫn) cho phép các tế bào đi vào quá trình nguyên phân trước khi đạt được kích thước tới hạn [37]. Một cơ chế khác được giải thích dựa trên cấu trúc vách tế bào, bởi vách tế bào thực vật đóng vai trò chủ chốt trong việc điều khiển các hoạt động phát triển và phát sinh hình thái trong cơ thể thực vật [11]. Mặt khác, dưới điều kiện MG đã có sự nới lỏng vách tế bào

thúc đẩy sự tăng sinh [40]. Kết quả nghiên cứu này đã cho thấy sự gia tăng sinh khối của mẫu cấy dưới điều kiện SMG tương tự kết quả thu được trên cây họ Đậu [144]; cây Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) [24], [40]; cây *Arabidopsis thaliana* L. [5], [39].

Trong hầu hết các loài thực vật, sự hình thành rễ bất định đều được khởi phát bởi auxin. Auxin cần thiết cho sự phân chia và tăng trưởng của tế bào nên có vai trò quan trọng trong sự phát sinh hình thái thực vật. Auxin kích thích sự tạo rễ và hoạt hoá cơ quan, có vai trò chủ yếu trong sự cảm ứng tạo rễ [145]. Trong nghiên cứu này sự hình thành rễ bất định ở cây Diệp hạ châu đắng đã được thúc đẩy có thể do điều kiện SMG đã ảnh hưởng sớm lên sự thay đổi hàm lượng auxin của mẫu cấy.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu lóng thân cây Diệp hạ châu đắng *in vitro* sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy
A: Mô sẹo ở điều kiện G sau 4 tuần nuôi cấy; **B:** Mẫu mô sẹo ở điều kiện SMG sau 4 tuần nuôi cấy; **C, D, E:** Rễ bất định ở điều kiện SMG sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định của mẫu lóng thân cây Diệp hạ châu đắng *in vitro* sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy	**2 tuần**		**3 tuần**		**4 tuần**	
Chỉ tiêu theo dõi	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**
Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	100,00 ± 0,00^{a*}	90,33 ± 0,67^{b}	100,00 ± 0,00^{a}	62,67 ± 1,76^{b}	100,00 ± 0,00^{a}	34,33 ± 1,20^{c}
Tỷ lệ hình thành rễ bất định (%)	-**	6,67 ± 0,67^{c}	-	37,33 ± 1,76^{b}	-	65,67 ± 1,20^{a}
Khối lượng tươi (mg)	263,00 ± 3,79^{f}	541,00 ± 3,21^{c}	291,00 ± 1,53^{e}	598,67 ± 4,33^{b}	313,33 ± 2,03^{d}	792,00 ± 1,73^{a}
Khối lượng khô (mg)	24,67 ± 0,67^{e}	53,83 ± 0,41^{c}	29,00 ± 0,45^{d}	59,89 ± 0,43^{b}	30,07 ± 0,25^{d}	79,17 ± 0,27^{a}

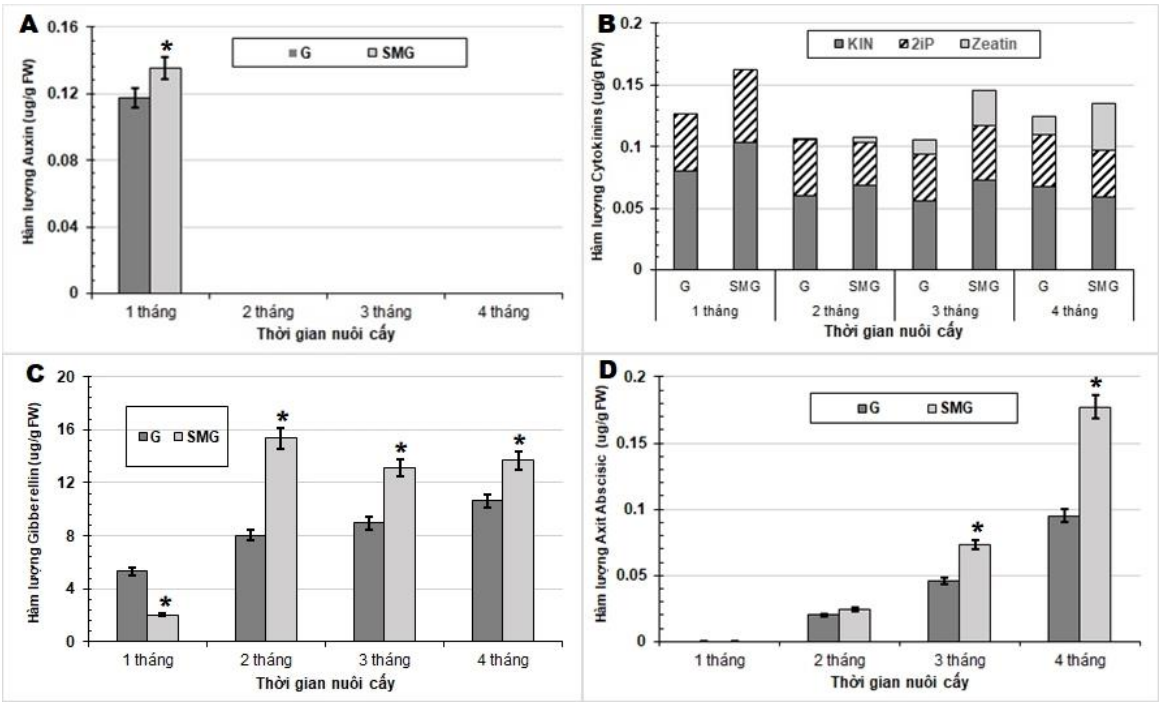
**Các chữ cái khác nhau (a, b,…) trong cùng một dòng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) giữa các nghiệm thức theo phép thử Tukey. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn).*
***Không ghi nhận số liệu.*

3.4. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường, chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*

Kết quả phân tích hàm lượng Auxin (AUX), Cytokinins (CKs), GA_3 và ABA cho thấy đều xuất hiện ở trong SEs cây hoa Thu hải đường, chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng. Tuy nhiên, hàm lượng cũng như thời điểm xuất hiện ở mỗi loại mẫu cấy có sự khác nhau.

Đối với cây hoa Thu hải đường, sự khác biệt là đáng kể ở các giai đoạn SEs của mẫu p-tTCL (Hình 3.7). Bất chấp có sự hiện diện của trọng lực hay không thì tổng hàm lượng ABA cho thấy một xu hướng ngày càng tăng và xu hướng trái ngược của AUX và CKs cũng được ghi nhận. Hàm lượng AUX trong mẫu cấy qua các giai đoạn nuôi cấy khác nhau đã được thể hiện trong Hình 3.7A. Kết quả cho thấy, cả trong nghiệm thức SMG và G thì phát hiện AUX và không phát hiện ABA sau 1 tháng nuôi cấy - giai đoạn cảm ứng SEs. Hàm lượng AUX tổng trong nghiệm thức SMG thì đã cao hơn đáng kể so với G (Hình 3.7A). Ngược lại, trong suốt giai đoạn nuôi cấy sau đó là 2, 3 và 4 tháng thì đã không phát hiện được AUX nhưng phát hiện được ABA. Kết quả này cho thấy ảnh hưởng sớm của điều kiện SMG lên sự thay đổi hàm lượng AUX, và có thể dẫn đến những thay đổi đáng kể trong giai đoạn SEs tiếp sau đó. KIN, 2iP và ZEA là những hormone đại diện cho CKs đã được định lượng. Kết quả cho thấy KIN và 2iP đã được tổng hợp trong suốt toàn bộ quá trình tạo SE, cũng như hàm lượng của chúng không có sự thay đổi đáng kể theo thời gian ở cả hai nghiệm thức SMG và G. ZEA đã được phát hiện sau 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy với hàm lượng cao hơn đáng kể ở nghiệm thức SMG so với G (Hình 3.7B). Ngoại trừ tổng hàm lượng GA_3 thấp nhất ở giai đoạn cảm ứng SEs (1 tháng), hàm lượng của GA_3 trong nghiệm thức SMG cao hơn đáng kể so với G. Hàm lượng GA_3 đã tăng tuyến tính theo thời gian nuôi cấy trong điều kiện G; trong khi đó dưới điều kiện SMG hàm lượng GA_3 đã đạt cao nhất sau 2 tháng nuôi cấy (giai đoạn phát triển SE) và giảm đáng kể sau đó (Hình 3.7C). Ngược lại so với AUX chỉ xuất hiện ở giai đoạn đầu SEs (1 tháng), ABA xuất hiện ở các giai đoạn sau đó. Đặc biệt, hàm lượng ABA trong điều kiện SMG cao hơn 1,85 lần so với G sau 4 tháng nuôi cấy (Hình 3.7D). Kết quả này cho thấy rằng sự vắng mặt của ABA trong giai đoạn đầu

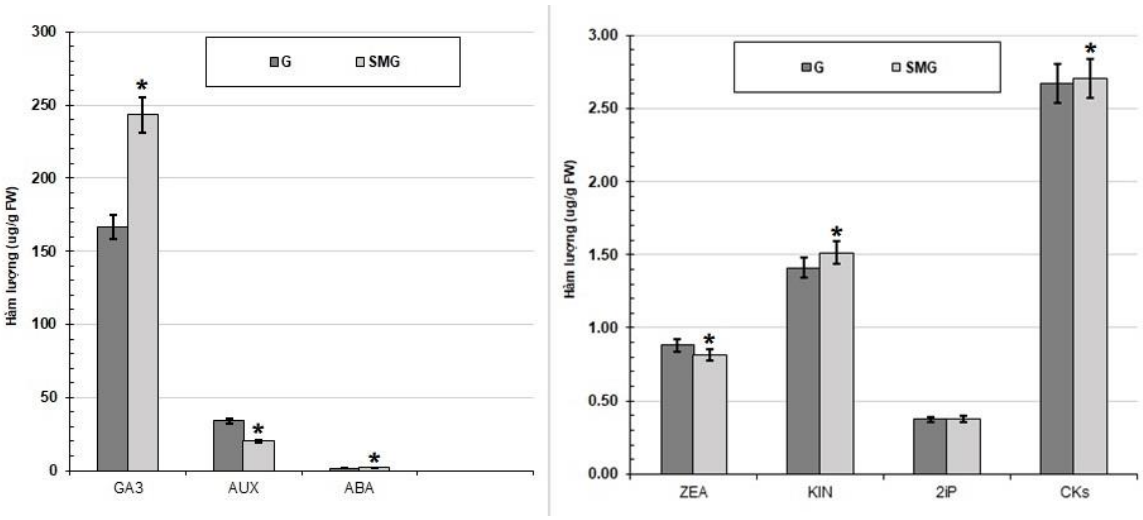
thì có lợi cho sự cảm ứng SE, và hàm lượng cao của ABA kích thích sự trưởng thành và già hóa của SE



Hình 3.7. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh trong SEs mẫu cấy p-tTCL cây hoa Thu hải đường *in vitro*
A: Hàm lượng AUX; **B:** Hàm lượng KIN, 2iP, ZEA; **C:** Hàm lượng GA_3; **D:** Hàm lượng ABA; *Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình theo phép thử Tukey ($p < 0,05$).

Đối với cây Dâu tây, mẫu chồi có nguồn gốc ở điều kiện SMG ghi nhận hàm lượng GA_3, ABA, KIN cao hơn so với điều kiện G sau 6 tuần nuôi cấy; trong khi đó, hàm lượng AUX, ZEA lại cho kết quả ngược lại (Hình 3.8). Hàm lượng 2iP hầu như không có sự khác biệt ở cả 2 điều kiện nuôi cấy (Hình 3.8).

Đối với cây Diệp hạ châu đắng, mô sẹo có nguồn gốc ở điều kiện SMG ghi nhận hàm lượng GA_3, AUX, ABA cao hơn so với điều kiện G; trong khi đó, hàm lượng KIN lại cho kết quả ngược lại (Bảng 3.3). Hàm lượng 2iP, ZEA ở mô sẹo hầu như không có sự khác biệt ở cả 2 điều kiện nuôi cấy (Bảng 3.3). Đối với rễ bất định chỉ xuất hiện dưới điều kiện SMG, hàm lượng GA_3, AUX thấp hơn trong mô sẹo. Ngoài ra, hàm lượng KIN, ZEA và 2iP ở mô sẹo và rễ bất định dưới điều kiện SMG không có sự khác biệt (Bảng 3.3).



Hình 3.8. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh trong chồi mẫu cấy lá cây Dâu tây *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy; *Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình theo phép thử Tukey ($p < 0,05$).

Hàm lượng hormone nội sinh trong mẫu cấy có vai trò quan trọng trong sự phát sinh hình thái, vì chúng điều chỉnh các quá trình phân chia, phân hóa tế bào và trao đổi chất trong suốt quá trình nuôi cấy. Sự khác biệt về hàm lượng hormone nội sinh được xem là sự khác biệt chính giữa các kiểu gen với các mức phản ứng khác nhau. Tuy nhiên, sự tác động của các hormone nội sinh lên sự phát sinh hình thái ở các loài khác nhau là không giống nhau [146]. Trong nghiên cứu này hàm lượng của GA_3 trong SEs cây hoa Thu hải đường, chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng ở điều kiện SMG là vượt trội hơn so với các hormone nội sinh khác cũng như điều kiện nuôi cấy G. Điều này chứng tỏ, dưới điều kiện SMG, GA_3 được sản sinh nhiều hơn và kích thích khả năng phát sinh hình thái của mẫu cấy. Kết quả này ngược lại với báo cáo của Ezura và Harberd (1995) khi chỉ ra rằng, mô sẹo có nguồn gốc từ cây *Arabidopsis thaliana* đột biến làm giảm khả năng tổng hợp hoặc cảm ứng với GA_3 làm cho sự tái sinh chồi dễ dàng hơn so với mô sẹo có nguồn gốc từ các cây hoang dại [147].

Trong khi đó, ABA là một hormone quan trọng tham gia điều hòa nhiều quá trình sinh lý ở thực vật như sự hình thành phôi, sự trưởng thành của hạt, sinh trưởng và phát triển của cây, sự lão hóa, cũng như trong các phản ứng của thực vật với các stress sinh học và phi sinh học [148], [149]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng của ABA trong SEs cây hoa Thu hải đường, chồi cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng ghi nhận dưới điều kiện SMG là cao hơn so với điều kiện G. Kết

quả trái ngược với nồng độ ABA cao trong mô sẹo của 2 giống Lúa mạch KN5 và K-3 có tác dụng ức chế sự tái sinh chồi [150].

AUX được biết có liên quan đến việc thiết lập và duy trì tính phân cực của tế bào; đồng thời, đóng vai trò chính trong việc truyền tín hiệu và giao tiếp giữa các tế bào [151]. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng AUX cần thiết cho sự hình thành và phát triển tính phân cực của SE; sự phong phú của AUX tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tạo SEs [152], [153]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, hàm lượng AUX trong SEs cây hoa Thu hải đường và trong mô sẹo, rễ cây Diệp hạ châu đắng ghi nhận dưới điều kiện SMG là cao hơn so với điều kiện G.

CKs cũng được biết đến như là chìa khóa để cảm ứng SEs và đóng vai trò hàng đầu trong việc hình thành chồi [154]. Trong nghiên cứu này, điều kiện SMG đã làm gia tăng đáng kể hàm lượng CKs trong giai đoạn phát triển của SEs cây hoa Thu hải đường; trong khi đó với cây Dâu tây thì hàm lượng CKs ở chồi dưới điều kiện SMG và G không có sự khác biệt đáng kể. Đối với cây Diệp hạ châu đắng, hàm lượng CKs ở mô sẹo dưới điều kiện SMG cho kết quả thấp hơn dưới điều kiện G. Điều này có thể được lý giải rằng, sự tác động của các hormone nội sinh lên sự phát sinh hình thái ở các loài khác nhau là không giống nhau [146].

Tương tự như hàm lượng thì sự cân bằng hormone nội sinh có vai trò quan trọng trong việc phát sinh hình thái thực vật và nó được thể hiện qua tỷ lệ hormone nội sinh. Tỷ lệ hormone nội sinh trong các giai đoạn khác nhau của SEs cây hoa Thu hải đường đã được đánh giá, bao gồm các giai đoạn cảm ứng (1 tháng), biệt hóa và tăng trưởng (2 - 3 tháng), trưởng thành (4 tháng). Tỷ lệ AUX/CKs, AUX/GA_3, CKs/GA_3, CKs/ABA giảm dần theo thời gian nuôi cấy; ngược lại tỷ lệ ABA/GA_3 tăng lên theo sự trưởng thành của các SE. Trong giai đoạn cảm ứng SEs thì tỷ lệ AUX/GA_3 (0,07 và 0,02; tương ứng) và CKs/GA_3 (0,08 và 0,02; tương ứng) dưới điều kiện SMG cao hơn đáng kể so với G; trong khi sự trái ngược đã được ghi nhận ở tỷ lệ AUX/CKs (0,83 và 0,93; tương ứng). Trong giai đoạn biệt hóa, CKs/ABA giảm ở cả hai nghiệm thức. Ở giai đoạn trưởng thành, tỷ lệ CKs/ABA của nghiệm thức SMG thấp hơn đáng kể so với G, tỷ lệ này lần lượt là 4,42 và 5,25; 2,07 và 2,33; 0,77 và 1,29 sau 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy. Kết quả hormone nội sinh dưới điều kiện SMG chỉ ra rằng tỷ lệ cao của AUX/GA3 và CKs/GA3 tăng tốc cảm ứng SEs hơn so với điều kiện G. Từ kết quả này, có khả

năng điều kiện SMG đã đẩy nhanh quá trình cảm ứng SEs thông qua việc thay đổi sự cân bằng của hormone nội sinh trong các mẫu cấy p-tTCL.

Trên cây Dâu tây, tỷ lệ giữa các nhóm hormone nội sinh cũng có sự khác biệt giữa 2 điều kiện nuôi cấy là SMG và G. Tỷ lệ GA_3/AUX ở điều kiện SMG là gấp 12 lần; trong khi đó, tỷ lệ này chỉ thu nhận gấp 5 lần ở điều kiện G. Ngoài ra, tỷ lệ GA_3/CKs (ZEA, KIN và 2iP) ở điều kiện SMG cũng cao hơn 1,5 lần so với điều kiện G (khoảng 90 lần so với 60 lần; tương ứng). Trong khi đó, tỷ lệ AUX/CKs cho kết quả ngược lại; ở điều kiện G tỷ lệ AUX/CKs (khoảng 13 lần) cao hơn so với điều kiện SMG (7 lần). Điều này tương tự với các nghiên cứu khác cho thấy tỷ lệ AUX/CKs thấp đã thúc đẩy sự hình thành chồi của lá cây Dứa [155] và mô sẹo cây Mướp đắng [106].

Trên cây Diệp hạ châu đắng, có thể thấy tỷ lệ AUX/CKs (ZEA, KIN, 2iP, MT) ở mô sẹo dưới điều kiện SMG đạt cao nhất, đây có thể là lý do thúc đẩy sự hình thành rễ bất định như đã thảo luận trong thí nghiệm phát sinh hình thái của cây Diệp hạ châu đắng. Ngoài ra, tỷ lệ ABA/AUX đạt cao nhất trong rễ bất định dưới điều kiện SMG (0,84 lần), do đó có thể sự gia tăng tỷ lệ ABA/AUX có lợi cho sự hình thành và phát triển của rễ bất định. Bên cạnh đó, tỷ lệ ABA/GA_3 đạt cao nhất ở rễ và mô sẹo dưới điều kiện SMG (0,06 lần), điều này chỉ ra rằng tỷ lệ cao hơn của các chất ức chế sinh trưởng so với các chất kích thích sinh trưởng có lợi cho sự phát sinh hình thái của cây Diệp hạ châu đắng, tương tự như nghiên cứu trên cây Chè [156].

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng hormone nội sinh ở mô sẹo rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng sau 4 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức		**GA_3**	**AUX**	**ABA**	**ZEA**	**KIN**	**2iP**
G	Mô sẹo	28,00 ± 0,130^{b}	2,12 ± 0,017^{b}	0,88 ± 0,003^{c}	0,19 ± 0,006^{a}	0,23 ± 0,009^{a}	0,032 ± 0,001^{a}
SMG	Mô sẹo	29,62 ± 0,064^{a}	3,24 ± 0,052^{a}	1,81 ± 0,018^{a}	0,18 ± 0,006^{a}	0,17 ± 0,006^{b}	0,028 ± 0,001^{a}
	Rễ	27,62 ± 0,064^{b}	2,06 ± 0,009^{b}	1,74 ± 0,009^{b}	0,17 ± 0,001^{a}	0,17 ± 0,011^{b}	0,27 ± 0,001^{a}

***Các chữ cái khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức theo phép thử Tukey. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn).*

3.5. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong quá trình phát sinh mô sẹo cây Dâu tây, mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*

Trên cây Dâu tây, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa (APX, CAT), hoạt tính bắt gốc tự do DPPH và hàm lượng phenolic tổng có sự khác biệt ở cả 2 điều kiện nuôi cấy sau 2, 3, 4 tuần. Sự khác biệt này vẫn thể hiện ở tuần thứ 6 với hoạt tính APX và DPPH, trong khi hoạt tính CAT và hàm lượng phenolic tổng không còn sự khác biệt (Bảng 3.4). Hoạt tính CAT gia tăng tuyến tính từ 2 - 6 tuần ở cả 2 điều kiện nuôi cấy và hoạt tính CAT ở điều kiện SMG cao hơn so với điều kiện G sau 2, 3 và 4 tuần (Bảng 3.4). Hoạt tính APX gia tăng từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 3 và giảm dần ở tuần thứ 4 và thứ 6 ở cả 2 điều kiện nuôi cấy (Bảng 3.4). Trong khi đó, hoạt tính DPPH gia tăng từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 6 ở cả 2 điều kiện nuôi cấy; trong đó, ở điều kiện SMG hoạt tính DPPH cao hơn so với G (Bảng 3.4). Ngoài ra, hàm lượng phenolic có sự gia tăng từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 4 và giảm ở tuần thứ 6 cả 2 điều kiện nuôi cấy; trong đó, hàm lượng phenolic của mẫu cấy ở điều kiện G luôn cao hơn điều kiện SMG ở tuần 2 đến tuần thứ 4 và tương đương nhau sau 6 tuần nuôi cấy (Bảng 3.4).

Trên cây Diệp hạ châu đắng, hoạt tính của các enzyme kháng oxy hóa SOD ghi nhận có sự khác biệt ở điều kiện SMG và G sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy, trong khi đó hoạt tính APX, CAT và hàm lượng phenolic tổng bắt đầu qua tuần thứ 3 mới có sự khác biệt (Bảng 3.5). Các hoạt tính SOD, CAT, APX và hàm lượng phenolic tổng ở điều kiện SMG luôn cao hơn G. Tuy nhiên, hoạt tính APX của mẫu mô sẹo ở điều kiện G và SMG sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy là tương đương (Bảng 3.5). Trong cùng điều kiện SMG, các hoạt tính kháng oxy hóa này và hàm lượng phenolic tổng ở rễ luôn cao hơn ở mô sẹo tại tất cả thời gian ghi nhận.

Môi trường MG không có tín hiệu của lực hấp dẫn tạo ra một sự thay đổi nghiêm trọng của các quá trình và cơ chế sinh học duy trì sự sống của thực vật. Trọng lực chịu trách nhiệm cho các tín hiệu cơ học được tạo ra trong các cơ quan khác nhau của cây và tạo ra các tín hiệu định hướng cụ thể. Những tín hiệu này là động lực chính cho sự sinh trưởng và phát triển bình thường của thực vật trên Trái Đất. Ngoài ra, các quá trình vật lý thiết yếu ảnh hưởng lớn đến cơ chế phản ứng sinh hóa, ví dụ sự vận chuyển của chất khí và chất lỏng trong cây chịu tác động của

trọng lực. Kết quả làm các chuyển động của nước và khí bị thay đổi trong môi trường MG, điều này có thể gây xáo trộn về nồng độ của các chất quan trọng trong tế bào và mô thực vật [73]. Điều này rõ ràng khiến thực vật trong môi trường MG phải đối mặt với một loạt điều kiện bất lợi, hậu quả là chúng sẽ bị stress.

Thực vật có một độ dẻo dai rất lớn và có khả năng tồn tại, thích nghi với nhiều loại môi trường bất lợi như hạn hán, mặn, nóng lạnh do chúng đã tạo ra "ký ức" cho thực vật trong suốt chiều dài tiến hóa. Tuy nhiên, MG là một môi trường hoàn toàn mới mẻ nên thực vật hoàn toàn không có "ký ức" và chúng phải phát triển các chiến lược mới để thích nghi. Sự phát triển của thực vật dưới điều kiện MG có thể gây ra sự tích lũy ROS (Reactive Oxygen Species) và dòng Ca^{2+} đi vào tế bào chất [157]. Để khắc phục tổn thương do stress oxy hóa, thực vật có cơ chế kiểm soát và điều chỉnh mức ROS một cách thích hợp, bao gồm tăng hoạt độ enzyme chống oxy hóa như APX, CAT và SOD [158]. Trong nghiên cứu này, khả năng cảm ứng mô sẹo cũng như tái sinh chồi của mẫu cấy cây Dâu tây dưới điều kiện SMG là sớm hơn cũng như sinh khối thu nhận được là cao hơn. Điều này có thể lý giải bằng việc điều kiện SMG đã gia tăng các hoạt tính kháng oxy hóa (APX, CAT, DPPH) và giảm hàm lượng phenolic; từ đó, đã làm gia tăng khả năng cảm ứng mô sẹo/chồi cũng như sinh khối của mẫu cấy. Đối với cây Diệp hạ châu đắng, mẫu lóng thân cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện SMG có khối lượng tươi và khô cao hơn đối chứng có thể do điều kiện nuôi cấy SMG làm gia tăng hoạt tính của SOD, CAT và hàm lượng phenolic, kết quả đã làm cho tỷ lệ cảm ứng mô sẹo, sinh khối của mẫu cấy được tăng cường. Các kết quả này tương tự với báo cáo của Soleimani và cộng sự (2019) cho thấy mối quan hệ tích cực giữa chất kháng oxy hóa và các thông số tăng trưởng trong tế bào cây Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) trong điều kiện SMG [40]. Nghiên cứu gần đây của Halimeh (2022) trên cây dược liệu chỉ ra rằng, dưới điều kiện MG, hoạt tính của enzyme kháng oxy hóa gia tăng tỷ lệ thuận với thời gian nuôi cấy so với điều kiện G. Sự thay đổi này giúp tế bào có cơ chế thích nghi và sinh trưởng tốt hơn trong điều kiện stress lực hấp dẫn [159].

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa của mô sẹo cây Dâu tây sau 2, 3, 4 và 6 tuần nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy	**2 tuần**		**3 tuần**		**4 tuần**		**6 tuần**	
Chỉ tiêu theo dõi	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**
CAT (U/g)	96,82 ± 0,929^{f}	107,69 ± 1,227^{e}	121,13 ± 2,147^{d}	137,67 ± 0,633^{c}	140,05 ± 2,887^{c}	156,73 ± 0,829^{b}	163,42 ± 0,229^{ab}	167,90 ± 0,241^{a}
APX (U/g)	0,11 ± 0,006^{e}	0,16 ± 0,007^{bc}	0,18 ± 0,003^{b}	0,22 ±0,007^{a}	0,15 ± 0,003^{cd}	0,17 ± 0,003^{b}	0,12 ± 0,007^{de}	0,11 ± 0,006^{e}
DPPH (% RSA)	6,61 ± 0,208^{f}	8,20 ± 0,062^{de}	7,56 ± 0,026^{e}	8,69 ± 0,174^{d}	8,06 ±0,050^{de}	11,42 ± 0,136^{b}	9,53 ± 0,136^{c}	13,38 ± 0,15^{a}
Phenolic (mg GAE/100 g chất khô)	124,57 ± 2,378^{d}	81,84 ± 2,436^{f}	131,38 ± 0,882^{d}	96,05 ± 1,443^{e}	171,72 ± 0,667^{a}	148,69 ± 2,273^{c}	161,88 ± 1,167^{b}	155,38 ± 2,315^{bc}

**Các chữ cái khác nhau (a, b,…) trong cùng một dòng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức theo phép thử Tukey. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn).*

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hoạt tính enzyme kháng oxy hóa ở mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy	**2 tuần**			**3 tuần**			**4 tuần**		
Chỉ tiêu theo dõi	**G**	**SMG**		**G**	**SMG**		**G**	**SMG**	
	Mô sẹo	**Mô sẹo**	**Rễ**	**Mô sẹo**	**Mô sẹo**	**Rễ**	**Mô sẹo**	**Mô sẹo**	**Rễ**
SOD (U/g)	22,28 ± 0,36^{i}	51,23 ± 0,48^{f}	75,79 ± 0,20^{c}	31,18 ± 0,52^{h}	60,90 ± 0,61^{e}	90,42 ± 0,36^{b}	44,72 ± 0,71^{g}	71,38 ± 0,83^{d}	121,39 ± 0,41^{a}
CAT (U/g)	174,95 ± 1,37^{f}	181,05 ± 0,74^{f}	227,70 ± 0,70^{d}	215,81 ± 1,19^{e}	222,80 ± 1,5^{de}	303,70 ± 3,18^{b}	236,46 ± 1,77^{c}	243,29 ± 1,15^{c}	344,79 ± 1,21^{a}
APX (U/g)	0,28 ± 0,012^{ef}	0,24 ± 0,003^{f}	0,63 ± 0,023^{b}	0,35 ± 0,015^{de}	0,32 ± 0,012^{ef}	0,67 ± 0,023^{b}	0,43 ± 0,023^{cd}	0,44 ± 0,009^{c}	0,95 ± 0,015^{a}
Phenolic (mg GAE /100 g chất khô)	50,91 ± 0,607^{f}	56,47 ± 0,364^{f}	81,40 ± 0,549^{d}	71,56 ± 0,820^{e}	77,19 ± 1,025^{de}	97,33 ± 0,884^{bc}	92,31 ± 0,787^{c}	99,24 ± 0,549^{b}	126,24 ± 2,728^{a}

**Các chữ cái khác nhau (a, b,...) trong cùng một dòng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức theo phép thử Tukey. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn).*

3.6. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự tích lũy hợp chất thứ cấp trong quá trình phát sinh mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng nuôi cấy *in vitro*

Các hợp chất thứ cấp quyết định dược tính của cây Diệp hạ châu đắng là rutin, quercetin là các flavonoid với vai trò được biết đến là khả năng kháng viêm, ngăn ngừa tế bào ung thư và hypophyllanthin, phyllanthin là các lignan có chức năng bảo vệ gan [96], [97], [98], [99]. Kết quả phân tích HPLC cho thấy hàm lượng flavonoid (rutin và quercetin), lignan (hypophyllanthin và phyllanthin) có sự khác biệt ở điều kiện SMG và G (Bảng 3.6). Hợp chất rutin xuất hiện trong cả mô sẹo và rễ ở điều kiện SMG với hàm lượng ở mô sẹo cao hơn ở rễ; trong khi đó, hợp chất này không xuất hiện trong mô sẹo ở điều kiện G. Với hợp chất quercetin được phát hiện ở cả hai điều kiện nuôi cấy, hàm lượng hợp chất này cao nhất trong mô sẹo ở điều kiện G (9,61 µg/g chất tươi) và thấp nhất trong mô sẹo (3,25 µg/g chất tươi) ở điều kiện SMG (Bảng 3.6).

Bảng 3.6. Sự tích lũy hợp chất thứ cấp ở mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu đắng sau 4 tuần nuôi cấy dưới điều kiện SMG

Nghiệm thức		**Flavonoid (µg/g chất tươi)**		**Lignan (µg/g chất tươi)**	
		Rutin	**Quercetin**	**Hypophyllanthin**	**Phyllanthin**
G	Mô sẹo	-**	9,61 ± 0,024[a]	17,29 ± 0,008[b]	11,53 ± 0,005[b]
SMG	Mô sẹo	1,79 ± 0,047[a*]	3,25 ± 0,007[b]	29,06 ± 0,039[a]	16,01 ± 0,041[a]
	Rễ	1,19 ± 0,007[b]	9,54 ± 0,066[a]	9,03 ± 0,043[c]	-

**Các chữ cái khác nhau (a, b,…) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) giữa các nghiệm thức theo phép thử Tukey;*

*** Không ghi nhận số liệu. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn).*

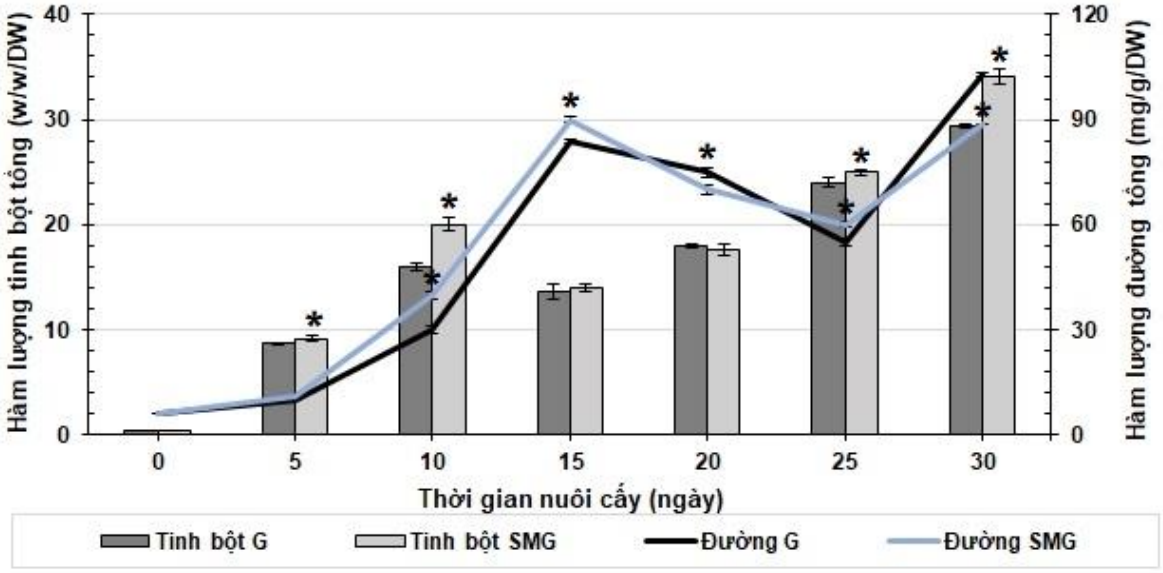
Đối với hoạt chất hypophyllanthin và phyllanthin, hàm lượng của chúng trong mô sẹo ở điều kiện SMG đều cao hơn G. Ở điều kiện SMG, hàm lượng hypophyllanthin trong mô sẹo (29,06 μg/g chất tươi) cao hơn trong rễ (9,03 μg/g chất tươi), trong khi hoạt chất phyllanthin chỉ xuất hiện ở mô sẹo mà không có ở rễ (Bảng 3.6).

Môi trường MG có một số yếu tố bất lợi có thể gây ra hiện tượng tế bào bị oxy hóa bao gồm tổn thương ADN, oxy hóa protein, mất ổn định màng và gây nhiễm độc gen [160], [161], [162]. Các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây dược liệu có thể góp phần làm giảm nguy cơ rối loạn tế bào do tổn thương oxy hóa. Quá trình tích lũy các hoạt chất sinh học thay đổi trong các điều kiện sinh trưởng khác nhau và có thể bảo vệ các tế bào thực vật chống lại các tổn thương oxy hóa gây ra bởi ROS [163], [164]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy hàm lượng hypophyllanthin, phyllanthin ở điều kiện SMG đều cao hơn G. Điều này tương tự với nghiên cứu của Nhut và cộng sự (2022) khi đã chứng minh ở điều kiện SMG, sự tích lũy hàm lượng coumarin, saponin ở cây Sâm bố chính và phyllanthin ở cây Diệp hạ châu đắng đã được tăng cường [165]. Tương tự, nghiên cứu của Halimeh (2022) trên cây Cúc La Mã cho thấy điều kiện SMG đã làm tăng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học [159].

3.7. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên sự chuyển hóa năng lượng (tinh bột và đường) trong quá trình phát sinh SEs cây hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro*

Sự cảm ứng, biệt hóa và phát triển của SEs gắn liền với sự thay đổi trong quá trình tổng hợp và huy động carbohydrate. Sự tích lũy tinh bột đóng vai trò then chốt trong việc phân chia tế bào và hình thành mô phân sinh trong suốt quá trình phát sinh cơ quan/SEs *in vitro* [23], [166]. Trong tháng đầu tiên của quá trình nuôi cấy, tương ứng với giai đoạn cảm ứng của SE, những thay đổi về tinh bột và lượng đường dưới điều kiện G và SMG đã được ghi lại và hiển thị trong Hình 3.9. Kết quả cho thấy hàm lượng tinh bột và đường tổng số tăng đáng kể ở cả nghiệm thức SMG và G. Tuy nhiên, trong khoảng thời gian từ 15 đến 25 ngày, lượng đường tổng số giảm dần và hàm lượng tinh bột tăng dần ở cả hai nghiệm thức. Việc giảm lượng đường trong khoảng thời gian từ 15 đến 25 ngày có thể bởi vì chúng được tiêu thụ để kích hoạt quá trình chuyển hóa năng lượng cần thiết cho SE. Thêm vào đó, lượng

đường tổng số của nghiệm thức SMG cao hơn đáng kể so với G ở 15 và 25 ngày nuôi cấy, nghĩa là nó có thể cung cấp nhiều năng lượng hơn cho SE. Ngoài ra, hàm lượng tinh bột trong các mẫu p-tTCL trong điều kiện SMG cao hơn đáng kể so với G ở 5, 10, 25 và 30 ngày nuôi cấy; trong khi đó, lượng đường tổng số của nghiệm thức SMG thấp hơn so với G ở 20 và 30 ngày nuôi cấy.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng tinh bột và đường tổng số trong giai đoạn cảm ứng SEs cây hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro*; *Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình theo phép thử Tukey ($p < 0,05$).

Kết quả cũng cho thấy hàm lượng tinh bột tổng của nghiệm thức SMG đạt cực đại sau 2 tháng nuôi cấy (Bảng 3.7) khi SEs hình cầu đang biệt hóa thành hình tim và hình ngư lôi. Sau đó, hàm lượng tinh bột tổng của nghiệm thức SMG giảm trùng với thời điểm trưởng thành của SEs. Điều thú vị là hàm lượng tinh bột tổng dưới điều kiện SMG luôn cao hơn đáng kể so với G sau 1, 2 tháng nuôi cấy, tương ứng với quá trình phát triển của SEs (Bảng 3.7). Hàm lượng tinh bột giảm theo thời gian có thể là do chúng được tiêu thụ để kích hoạt quá trình chuyển hóa tế bào cần thiết cho SEs [23], [166].

Trong khi đó, hàm lượng đường tổng số của nghiệm thức SMG và G đều đạt cực đại sau 3 tháng nuôi cấy và sau đó giảm. Tuy nhiên, hàm lượng đường tổng số của nghiệm thức SMG cao hơn đáng kể so với G ở giai đoạn này (153,61 mg/g DW và 124,43 mg/g DW; tương ứng). Điều này chỉ ra rằng điều kiện SMG thúc đẩy quá trình chuyển hóa năng lượng trong SEs ở cây hoa Thu hải đường; do đó có thể có

một yếu tố có vai trò trong việc điều chỉnh SEs trong giai đoạn trưởng thành liên quan đến điều kiện SMG.

Như đã biết, carbohydrate là nguồn năng lượng trao đổi chất liên quan mật thiết đến việc cảm ứng, biệt hóa và phát triển SEs [167]. Nghiên cứu sâu hơn cho thấy hàm lượng tinh bột và đường được tích lũy cao hơn trong các mẫu cấy p-tTCL dưới điều kiện SMG cho thấy mối tương quan cao với sự cảm ứng SEs sớm. Theo báo cáo của Mangat và cộng sự (1990), sự tích lũy tinh bột là một trong những phản ứng trao đổi chất đầu tiên của các mẫu cấy *in vitro*; trong đó các mẫu chuyển hóa lượng sucrose chứa trong môi trường nuôi cấy thành tinh bột để dự trữ trong các mô - nơi mà hình thành mô phân sinh sau đó [168]. Hàm lượng tinh bột tích lũy cao hơn trong các mẫu cấy thực vật đã được chứng minh là thúc đẩy tiềm năng tái sinh cao hơn ở cây trồng nuôi cấy *in vitro* [166], [169], [170] bởi lẽ nó là nguồn năng lượng trao đổi chất hỗ trợ sinh trưởng và phát triển cho các mô [171], cũng như carbohydrate là thành phần chính của bộ xương carbon cấu tạo nên tế bào [167]. Trong nghiên cứu hiện tại, lượng đường cao hơn sau 3 tháng nuôi cấy do chuyển hóa tinh bột được tích lũy trước đó có thể đã thúc đẩy SEs dưới điều kiện MG. Sự gia tăng tích lũy và chuyển hóa tinh bột dưới điều kiện MG cũng đã được phát hiện ở cây *Brassica rap*a L. [122], Khoai lang [171], *Matricaria chamomilla* [163] và cây Đậu xanh [172]. Trong một nghiên cứu gần đây, điều kiện MG đã được báo cáo là nguyên nhân gây ra sự hấp thu nước trong cây con Đậu xanh, do đó đã tăng cường hoạt động của enzyme amylase cũng như sinh trưởng của cây con [173].

Dựa trên các nghiên cứu trước đây, thực vật phản ứng với stress MG thông qua sự gia tăng sinh khối [24], [5], [144], [9], [118], [174]. Sự gia tăng này có thể do tác động của MG lên tính chất cơ học, hàm lượng cellulose và lignin của vách tế bào - bộ khung định hình và quy định nghiêm ngặt sự tăng sinh tế bào [11]. Gần đây, sự duy trì nới lỏng vách tế bào thực vật dưới điều kiện MG đã được xác nhận [24], [142] cũng như xu hướng tiết kiệm năng lượng dưới điều kiện MG để phục vụ cho sự tăng trưởng [24]. Trong trường hợp hiện tại, sự gia tăng sinh khối của SEs cây hoa Thu hải đường dưới điều kiện SMG có mối tương quan cao với hàm lượng cao đường tổng số. Hàm lượng tích lũy tinh bột trước giai đoạn sinh khối cao trào (3 tháng) đã được xác định là cao hơn trong nghiệm thức MG so với G; do đó có thể lượng tinh bột này đã được chuyển hóa thành đường và giải phóng năng lượng cần

thiết cho sự tăng sinh sau 3 tháng nuôi cấy. Mặc dù cần những nghiên cứu sâu hơn để làm rõ sự gia tăng này ở cấp độ phân tử nhưng rõ là sự gia tăng sinh khối dưới điều kiện MG có tiềm năng trong việc tạo ra lượng thực phẩm đủ lớn để phục vụ cho các phi hành gia trong chuyến bay dài hạn. Hơn nữa, sinh lý gia tăng sinh khối bởi kích thích MG có thể được mở rộng để ứng dụng nhân nhanh sinh khối thực vật trên quy mô công nghiệp.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của điều kiện SMG lên hàm lượng tinh bột và đường của SEs cây hoa Thu hải đường sau 1, 2, 3 và 4 tháng nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy	**1 tháng**		**2 tháng**		**3 tháng**		**4 tháng**	
Hàm lượng	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**	**G**	**SMG**
Tinh bột (% w/w DW)	29,37 ± 0,14^{g*}	34,06 ± 0,44^{e}	38,28 ± 0,09^{b}	39,91 ± 0,03^{a}	38,13 ± 0,06^{b}	35,06 ± 0,04^{d}	30,02 ± 0,03^{f}	35,91 ± 0,10^{c}
Đường (mg/g DW)	103,01 ± 0,07^{e}	88,74 ± 0,34^{f}	84,67 ± 0,23^{g}	68,19 ± 0,21^{h}	124,43 ± 0,65^{c}	153,61 ± 0,30^{a}	105,67 ± 0,31^{d}	150,00 ± 0,36^{b}

**Các chữ cái khác nhau (a, b,...) trong cùng một dòng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức theo phép thử Tukey. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn).*

3.8. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Thu hải đường, cây Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG

3.8.1. Nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Thu hải đường có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG

Trong thí nghiệm tạo chồi, kết quả ghi nhận được cho thấy các cụm chồi có nguồn gốc tái sinh dưới điều kiện SMG sinh trưởng tốt khi được chuyển về điều kiện nuôi cấy có trọng lực, bên cạnh đó không kèm theo bất kỳ hình thái bất thường nào đã được quan sát. Mặc khác, sau 1 tháng nuôi cấy trong điều kiện trọng lực thực, mẫu cấy của cây hoa Thu hải đường có nguồn gốc dưới điều kiện SMG cho chỉ tiêu về số chồi (136,67 chồi), khối lượng tươi (4774,67 mg), khối lượng khô (423,33 mg) đạt cao hơn so với điều kiện G; tuy nhiên, chiều cao chồi (1,13 cm), diện tích lá (0,90 cm^2) và hàm lượng chlorophyll tổng (38,37 $nmol/cm^2$) đạt giá trị thấp hơn đáng kể so với điều kiện G (Bảng 3.8). Điều này cho thấy số lượng chồi lớn đã hạn chế khả năng sinh trưởng của các chồi trong cùng một cụm. Kết quả tương tự đã ghi nhận được trên cây Lúa được nghiên cứu bởi Zulkifli và cộng sự (2018) cho thấy hạt giống có nguồn gốc xử lý điều kiện SMG có số nhánh lúa/cây tăng lên nhưng chiều cao nhánh lại không khác biệt so với đối chứng [175]. Trong một nghiên cứu gần đây, Cai và cộng sự (2019) đã báo cáo rằng diện tích lá cây *Arabidopsis* tăng lên đáng kể khi được đưa về điều kiện nuôi trồng có trọng lực sau khi hạt giống được xử lý trong điều kiện MG 11 ngày; trái ngược với kết quả của nghiên cứu này. Điều này có thể giải thích bởi sự khác biệt không chỉ về đối tượng, giống và tuổi của mẫu mà còn cần xét đến mẫu ở dạng đơn lẻ hoặc cụm [142].

Trong thí nghiệm tạo cây con hoàn chỉnh, kết quả cho thấy cây hoa Thu hải đường có nguồn gốc từ điều kiện SMG có chỉ tiêu về chiều cao cây (12,33 cm), số rễ chính (8,67 cm), số lá (6,67), hàm lượng chlorophyll tổng (47,77 $nmol/cm^2$) và khối lượng tươi (2212,00 mg), khối lượng khô (217,33 mg) cao hơn đáng kể khi so sánh với điều kiện G (Bảng 3.9). Như vậy, SEs của cây hoa Thu hải đường có nguồn gốc được phát sinh trong điều kiện SMG có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt tạo thành cây con hoàn chỉnh mà không có bất kỳ sự bất thường về hình thái.

Các nghiên cứu ứng dụng điều kiện MG trong công tác chọn, tạo và nhân giống cây trồng (space - breeding) từ lâu đã hấp dẫn các nhà khoa học và nghiên cứu này cũng tiếp nối điều đó, bởi điều kiện này không chỉ ảnh hưởng đến một số chỉ tiêu sinh trưởng, mà còn tăng năng suất và khả năng kháng bệnh của cây trồng khi được trồng trong điều kiện trọng lực bình thường [54], điển hình là trên đối tượng cây Lúa [175], [176].

Bảng 3.8. Sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây hoa Thu hải đường có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 1 tháng nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực

Nghiệm thức	**Số chồi**	**Chiều cao chồi (cm)**	**Số lá**	**Diện tích lá (cm^2)**	**Hàm lượng chlorophyll tổng ($nmol/cm^2$)**	**Khối lượng tươi (mg)**	**Khối lượng khô (mg)**
G	67,00 ± 1,15*	2,00 ± 0,06	3,33 ± 0,33	2,03 ± 0,09	45,40 ± 0,12	4007,67 ± 3,84	327,67 ± 0,88
SMG	136,67 ± 1,20	1,13 ± 0,12	2,33 ± 0,33	0,90 ± 0,56	38,37 ± 0,16	4774,67 ± 13,84	423,33 ± 0,88
Sig. t-Test	0	0,003	0,101	0	0	0	0
	≠	≠	×	≠	≠	≠	≠

*****Các giá trị trong bảng thể hiện giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn) theo kiểm định t-Test ($p < 0,05$);*

≠ Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình; × Không có sự khác biệt.

Bảng 3.9. Sự sinh trưởng và phát triển của cây con Thu hải đường hoàn chỉnh có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 3 tháng nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực

Nghiệm thức	**Chiều cao cây (cm)**	**Số rễ chính**	**Chiều dài rễ chính (cm)**	**Số lá**	**Hàm lượng chlorophyll tổng (nmol/cm^2)**	**Khối lượng tươi (mg)**	**Khối lượng khô (mg)**
G	9,00 ± 0,58*	6,67 ± 0,33	4,33 ± 0,33	4,67 ± 0,33	45,43 ± 0,09	2013,00 ± 1,15	203,33 ± 1,45
SMG	12,33 ± 0,33	8,67 ± 0,33	5,33 ± 0,33	6,67 ± 0,33	47,77 ± 0,09	2212,00 ± 0,58	217,33 ± 0,88
Sig. t-Test	0,007	0,013	0,101	0,013	0	0	0,01
	≠	≠	×	≠	≠	≠	≠

**Các giá trị trong bảng thể hiện giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn) theo kiểm định t-Test ($p < 0,05$);*
≠ Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình; × Không có sự khác biệt.

3.8.2. Nghiên cứu sự sinh trưởng ở môi trường trọng lực thực của chồi và cây con Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy in vitro dưới điều kiện SMG

Trong giai đoạn nhân nhanh chồi, cụm chồi có nguồn gốc từ điều kiện SMG và G không ghi nhận bất cứ hiện tượng bất thường nào về hình thái. Sau 4 tuần nuôi cấy, cụm chồi ở điều kiện SMG ghi nhận chiều cao chồi (2,90 cm), khối lượng tươi cụm chồi (464 mg) và khối lượng khô cụm chồi (35,67 mg) là cao hơn so với cụm chồi ở điều kiện G (Bảng 3.10). Ngoài ra, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa (CAT và APX) ở điều kiện SMG ghi nhận cũng cao hơn so với điều kiện G như CAT (174,53 U/g và 167,85 U/g; tương ứng), APX (0,46 U/g và 0,13 U/g; tương ứng); trong khi đó, hàm lượng phenolic tổng lại cho kết quả ngược lại (153,36 mg và 195,18 mg; tương ứng) (Bảng 3.10).

Trong giai đoạn ra rễ *in vitro*, sự sinh trưởng của cây cũng tương đồng với giai đoạn nhân nhanh chồi (Bảng 3.11). Các chỉ tiêu tăng trưởng của cây như chiều cao cây (8,33 cm), chiều rộng lá (1,70 cm), khối lượng tươi (653,33 mg) và khối lượng khô (65,67 mg) của cây dưới điều kiện SMG cao hơn so với cây nuôi cấy dưới điều kiện G (Bảng 3.11).

Kết quả đã cho thấy rằng, sự sinh trưởng của chồi và cây có nguồn gốc từ mẫu cấy dưới điều kiện SMG và G cho sự sinh trưởng bình thường. Điều này hứa hẹn tiềm năng của việc đánh giá khả năng phát sinh hình thái *in vitro* của mẫu cấy dưới điều kiện MG; sau đó, chuyển mẫu cấy sang môi trường tối ưu nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển tiếp theo của mẫu cấy.

Bảng 3.10. Sự sinh trưởng trong quá trình nhân nhanh chồi của cây Dâu tây có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 4 tuần nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực

Nghiệm thức	**Số chồi**	**Chiều cao chồi (cm)**	**Khối lượng tươi (mg)**	**Khối lượng khô (mg)**	**CAT (U/g)**	**APX (U/g)**	**Phenolic (mg GAE/100 g chất khô)**
G	8,33±0,33*	0,67 ± 0,03	351,33±5,78	26,00±0,58	167,85±0,26	0,13±0,00	195,18±0,26
SMG	7,33 ±0,33	2,90 ± 0,12	464,00±6,66	35,67±0,67	174,53±0,05	0,46±0,02	153,36±0,26
Sig. t-Test	0,101	0	0	0	0	0	0
	×	≠	≠	≠	≠	≠	≠

**Các giá trị trong bảng thể hiện giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn) theo kiểm định t-Test ($p < 0,05$);*
≠ Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình; × Không có sự khác biệt.

Bảng 3.11. Sự sinh trưởng và phát triển trong quá trình tạo rễ *in vitro* của chồi cây Dâu tây có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 2 tuần nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực

Nghiệm thức	**Chiều cao cây (cm)**	**Số lá**	**Chiều rộng lá (cm)**	**Số rễ**	**Chiều dài rễ (cm)**	**Khối lượng tươi (mg)**	**Khối lượng khô (mg)**
G	6,23 ± 0,15*	6,00 ± 0,00	1,10 ± 0,10	7,33 ± 0,67	4,67 ± 0,33	233,33 ± 17,64	26,00 ± 2,08
SMG	8,33 ± 0,33	6,67 ± 0,33	1,70 ± 0,10	9,33 ± 0,67	4,33 ± 0,33	653,33 ± 68,88	65,67± 3,38
Sig. t-Test	0,004	0,184	0,013	0,101	0,59	0,004	0,001
	≠	×	≠	×	×	≠	≠

******Các giá trị trong bảng thể hiện giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn) theo kiểm định t-Test (p < 0,05);*
≠ Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình; × Không có sự khác biệt.

3.9. Nghiên cứu ghi nhận sự tăng sinh của mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi *cấy in vitro* dưới điều kiện SMG

Sau 4 tuần nuôi cấy kết quả cho thấy có hai quá trình đã diễn ra đó là tăng sinh và tái sinh (chồi và rễ) (Hình 3.10C-D) dưới cả hai điều kiện SMG và G; tuy nhiên, mô sẹo tăng sinh là chủ yếu trong khi cơ quan chồi và rễ chỉ hình thành với số lượng không đáng kể (dữ liệu không thể hiện). Dưới điều kiện SMG khối lượng tươi của mô sẹo tăng gấp 16,1 lần so với ban đầu; trong khi đó, dưới điều kiện G chỉ tăng 9,67 lần. Ngoài ra, khối lượng tươi của mô sẹo dưới điều kiện SMG đạt cao hơn dưới điều kiện G 1,67 lần. Trong khi đó, khối lượng khô của mô sẹo dưới điều kiện SMG cũng cao hơn điều kiện G xấp xỉ 1,6 lần (Bảng 3.12, Hình 3.10A-B). Điều này cho thấy, việc mẫu cấy tiếp xúc với điều kiện SMG có khả năng góp phần làm thay đổi quá trình tăng sinh tế bào, từ đó làm tăng sinh khối của mô sẹo.

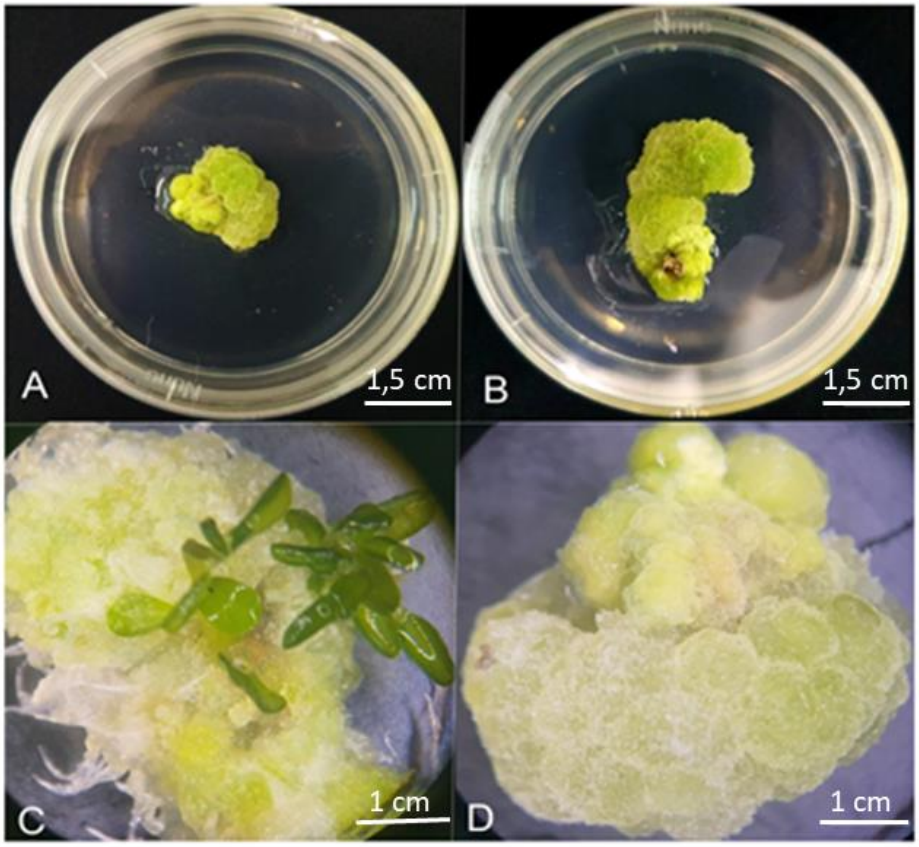
Các phương pháp xử lý MG có thể ảnh hưởng đến sự tăng sinh và kéo dài tế bào - hai quá trình sinh học cơ bản điều phối sự sinh trưởng và phát triển của thực vật [39], [118]. Trong nuôi cấy *in vitro* quá trình tạo mô sẹo bị tác động bởi nhiều yếu tố bên ngoài và các tín hiệu bên trong [177], [178]. Do đó, sự tiếp xúc của mô sẹo với điều kiện MG có khả năng góp phần làm thay đổi sự tăng sinh tế bào và trao đổi chất của tế bào mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng khi trở về nuôi cấy ở môi trường trọng lực thực của mặt đất.

Sinh khối cao hơn của mô sẹo khi được xử lý dưới điều kiện SMG có thể là kết quả của một số cơ chế quan trọng như thay đổi độ cứng của vách tế bào [142], khung xương tế bào [179], điều hòa gen [143], trao đổi chất [180]. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự với nghiên cứu trên đối tượng cây Cần sa của Farzaneh Darigh (2022) khi báo cáo rằng mô sẹo nuôi cấy dưới điều kiện SMG cho thấy tăng sinh khối gấp 2,5 lần so với mô sẹo nuôi cấy dưới điều kiện G [181].

Điều kiện SMG không chỉ làm tăng sinh mô sẹo mà còn tăng cường sản xuất các hợp chất thứ cấp. Kết quả ở Bảng 3.12 cho thấy, hàm lượng flavonoid (rutin và quercetin) cũng như hàm lượng lignan (hypophyllanthin và phyllanthin) trong mô sẹo được nuôi cấy dưới điều kiện SMG đều cao hơn so với điều kiện G. Điều này có thể được giải thích rằng điều kiện SMG không chỉ làm tăng sinh khối mô sẹo mà còn gây ra những thay đổi về sinh lý và biến đổi ở mức độ phân tử, từ đó góp phần cải thiện việc sản xuất các hợp chất thứ cấp [181]. Ngoài ra, sự xuất hiện với hàm

lượng cao của SA và MEL trong mô sẹo nuôi cấy dưới điều kiện SMG so với điều kiện G (Bảng 3.12) có thể là nguyên nhân làm cho các hợp chất flavonoid và lignan được tăng cường. Bởi vì, SA được chứng minh góp phần hiệu quả trong việc kích hoạt các phản ứng liên quan đến stress [181], giúp cây trồng chống lại các stress phi sinh học [182] và quá trình chuyển hóa thứ cấp [181]; trong khi đó MEL được biết đến với vai trò điều hòa quá trình sinh tổng hợp flavonoid và các hợp chất thứ cấp khác trong điều kiện thực vật bị stress [183].

Từ kết quả nghiên cứu này, có thể thấy được những gợi ý bước đầu cho việc khai thác điều kiện SMG để nuôi cấy tế bào thực vật *in vitro* tạo ra các dòng tế bào gia tăng sinh khối và sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp là vô cùng quý giá, đáp ứng yêu cầu của ngành công nghiệp dược phẩm. Tuy nhiên, cần có thêm các đánh giá sâu hơn ở mức độ sinh hóa và phân tử để có thêm các bằng chứng rõ rệt về vai trò của điều kiện SMG đối với quá trình gia tăng sinh khối và tích lũy các hợp chất thứ cấp ở thực vật.



Hình 3.10. Sự tăng sinh mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 4 tuần nuôi cấy *in vitro* ở môi trường trọng lực thực
A: Mô sẹo có nguồn gốc dưới điều kiện G; **B:** Mô sẹo có nguồn gốc dưới điều kiện SMG; **C:** Mô sẹo tái sinh chồi và rễ**; D:** Mô sẹo quan sát dưới kính hiển vi soi nổi với thị kính ×10.

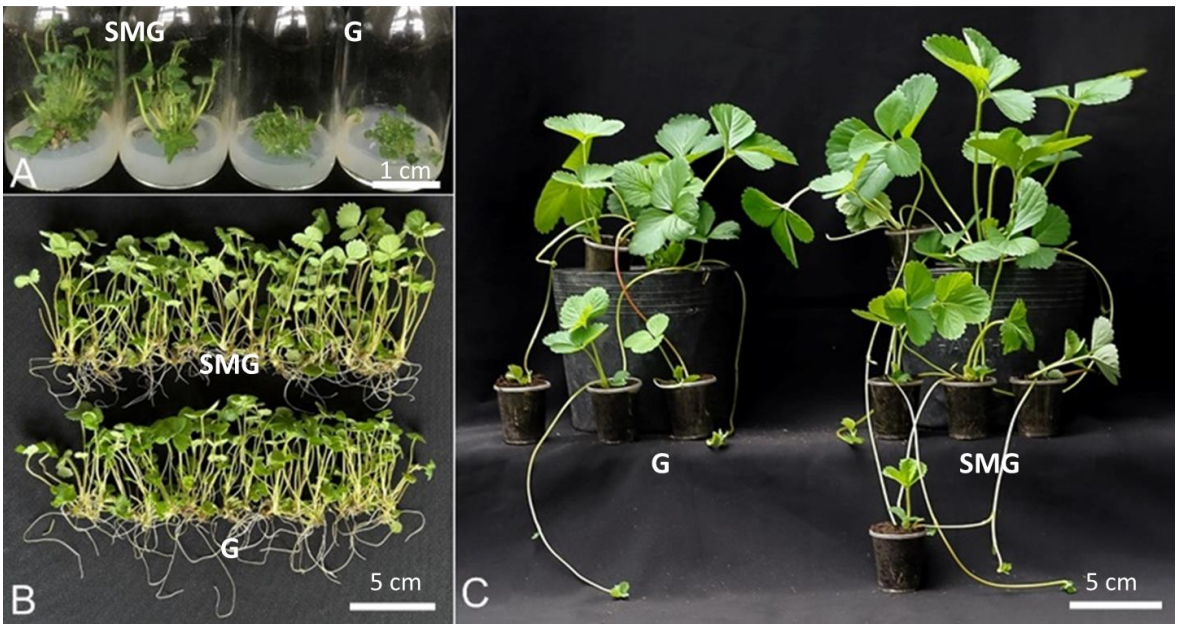
Bảng 3.12. Sự tăng sinh mô sẹo cây Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sau 4 tuần nuôi cấy ở môi trường trong lực thực

Nghiệm thức	**Khối lượng tươi (mg)**	**Khối lượng khô (mg)**	**Flavonoid (µg/g chất tươi)**		**Lignan (µg/g chất tươi)**		**Hormone (µg/g chất tươi)**	
			Rutin	**Quercetin**	**Hypophyllanthin**	**Phyllanthin**	**SA**	**MEL**
G	1933,33±20,28*	196,67±8,82	-**	10,49±0,01	18,71±0,04	12,40±0,30	1,46±0,002	0,2±0,0008
SMG	3213,33±34,80	310,00±11,55	2,39±0,02	17,67±0,02	39,77±0,02	29,03±0,04	1,59±0,006	0,39±0,003
Sig. t-Test	0	0,01	0	0	0	0	0	0
	≠	≠	≠	≠	≠	≠	≠	≠

**Các giá trị trong bảng thể hiện giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn) theo kiểm định t-Test (p < 0,05); ** Không ghi nhận số liệu.*
≠ Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình.

3.10. Nghiên cứu ghi nhận sự thích nghi ở vườn ươm của cây Dâu tây con có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* dưới điều kiện SMG

Những cây Dâu tây con có nguồn gốc từ điều kiện SMG và G được tiếp tục đánh giá khả năng thích nghi cũng như hình thành cây ngó ở điều kiện vườn ươm. Kết quả cho thấy, cây con có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện SMG cũng ghi nhận khả năng thích nghi và đa số các chỉ tiêu về sự sinh trưởng không có sự khác biệt so với điều kiện G sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.13). Tương tự, sự hình thành cây ngó cũng ghi nhận không có sự khác biệt ở 2 điều kiện nuôi cấy sau 8 tuần (Bảng 3.14 và Hình 3.11). Tuy nhiên, cây con nguồn gốc từ điều kiện SMG ghi nhận thời gian hình thành cây ngó sớm hơn khoảng 4 ngày (27,67 và 30 ngày; tương ứng) so với điều kiện G. Kết quả này một lần nữa chứng minh cây con có nguồn gốc dưới điều kiện SMG không chỉ thích nghi bình thường, không có sự bất thường về hình thái mà còn có thời gian ra ngó sớm hơn so với cây con ở điều kiện G. Những kết quả nghiên cứu trước đây chủ yếu dừng lại ở mức nghiên cứu sự đáp ứng của mẫu cấy dưới điều kiện MG thông qua biểu hiện gen, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa hay các chất có tính sinh học mà chưa đánh giá sâu hơn về sự sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy. Nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp vi nhân giống với mẫu cấy được nuôi cấy trên các đĩa petri có kích thước nhỏ giúp dễ quan sát sự phát sinh hình thái *in vitro* cũng như khối lượng hệ thống nuôi cấy nhỏ có thể bố trí thí nghiệm với nhiều mẫu cấy. Kết quả của nghiên cứu mở ra một hướng đi mới có nhiều triển vọng trong việc ứng dụng các thành tựu của lĩnh vực công nghệ vũ trụ cho công tác nhân giống cây trồng.



Hình 3.11. Sự sinh trưởng và phát triển của chồi, cây con và hình thành ngó của cây Dâu tây có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện SMG ở vườn ươm
A: Nhân chồi sau 4 tuần nuôi cấy; **B:** Cây con sau 4 tuần nuôi cấy ở vườn ươm;
C: Sự hình thành cây ngó sau 8 tuần ở vườn ươm.

Bảng 3.13. Sự thích nghi của cây Dâu tây có nguồn gốc dưới điều kiện SMG ở giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần

Nghiệm thức	**Chiều cao cây (cm)**	**Số lá**	**Chiều rộng lá (cm)**	**Số rễ**	**Chiều dài rễ (cm)**	**Khối lượng tươi (mg)**	**Khối lượng khô (mg)**	**Hàm lượng chlorophyll tổng (nmol/cm^2)**
G	11,37 ± 0,19*	8,00 ± 0,58	4,67 ± 0,09	10,33 ±0,88	11,20 ± 0,21	3775,67 ±102,28	431,00 ± 17,21	45,33 ± 1,45
SMG	12,63 ± 0,09	9,00 ± 0,58	5,17 ± 0,20	12,67 ±0,88	13,67 ± 0,90	4096,00 ±54,53	469,00 ± 10,58	48,00 ± 1,53
Sig. t-Test	0,004	0,288	0,087	0,135	0,056	0,051	0,133	0,275
	≠	×	×	×	×	×	×	×

**Các giá trị trong bảng thể hiện giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn) theo kiểm định t-Test ($p < 0,05$);*
[≠] *Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình.*

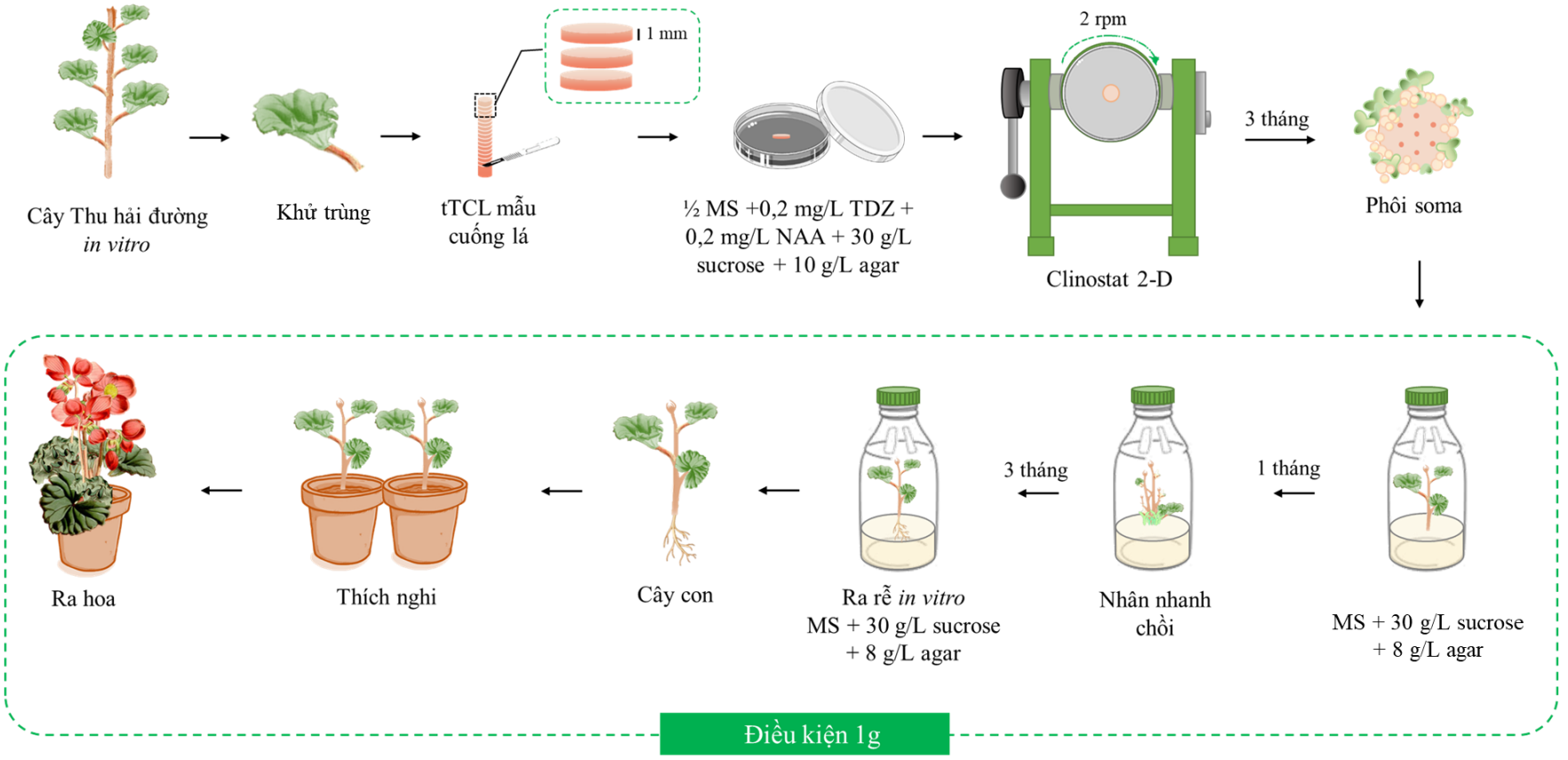
Bảng 3.14. Sự hình thành ngó của cây Dâu tây có nguồn gốc dưới điều kiện SMG ở giai đoạn vườn ươm sau 8 tuần

Nghiệm thức	**Thời gian hình thành ngó (ngày)**	**Tỷ lệ hình thành ngó (%)**	**Số ngó/cây**	**Cây ngó**			
				Chiều dài ngó (cm)	**Số lá**	**Khối lượng tươi (mg)**	**Hàm lượng chlorophyll tổng (nmol/cm^2)**
G	30,00 ± 0,58*	83,33 ± 3,33	4,00 ± 0,00	7,73 ± 0,63	4,00 ± 0,00	2049,67 ± 42,98	42,67 ± 0,80
SMG	27,67 ± 0,33	93,33 ± 3,33	5,33 ± 0,33	9,07 ± 0,15	4,33 ± 0,33	2336,33 ± 66,47	43,60± 0,68
Sig. t-Test	0,025	0,101	0,057	0,109	0,423	0,022	0,425
	≠	×	×	×	×	≠	×

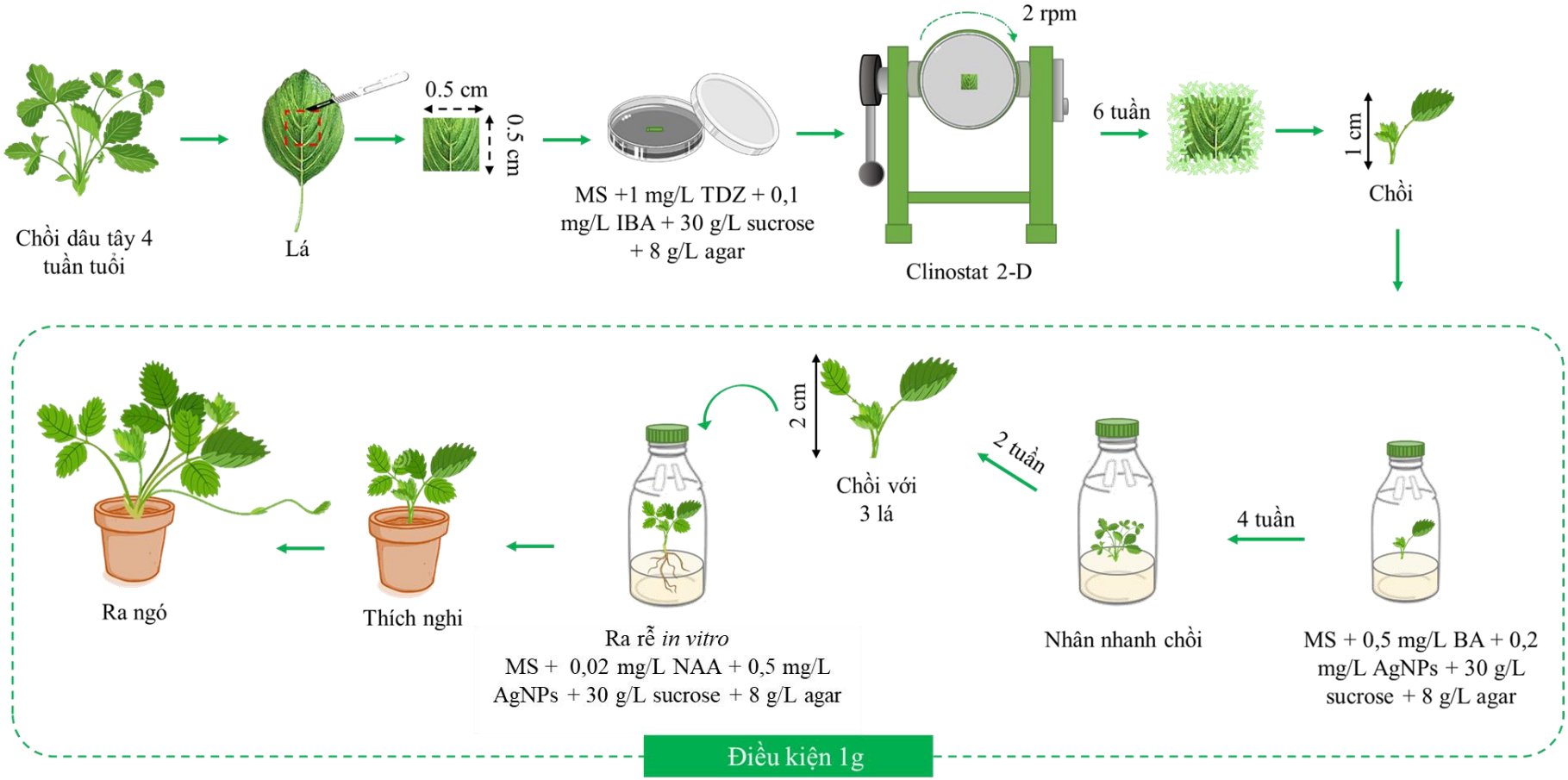
**Các giá trị trong bảng thể hiện giá trị trung bình ± SE (sai số chuẩn) theo kiểm định t-Test ($p < 0,05$);*
≠ Sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình.

3.11. Đề xuất quy trình vi nhân giống cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và sản xuất hợp chất thứ cấp trên cây Diệp hạ châu đắng

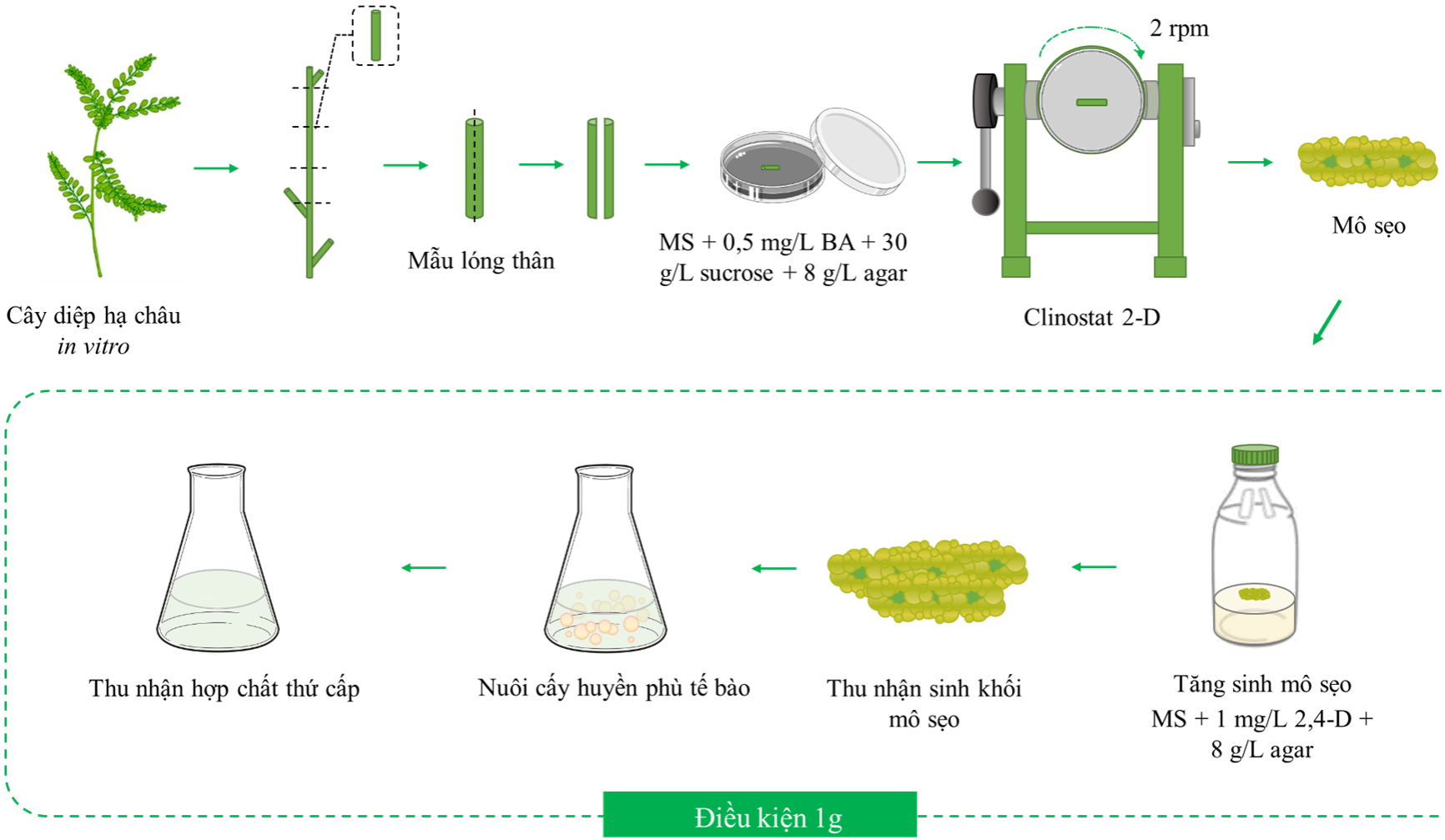
Dựa trên những kết quả của nghiên cứu này, quy trình nhân giống cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và sản xuất hợp chất thứ cấp trên cây Diệp hạ châu đắng thông qua quá trình phát sinh hình thái dưới điều kiện SMG được đề xuất như sau:



Sơ đồ 3.1. Quy trình nhân giống cây hoa Thu hải đường thông qua quá trình phát sinh hình thái dưới điều kiện SMG.



Sơ đồ 3.2. Quy trình nhân giống cây Dâu tây thông qua quá trình phát sinh hình thái dưới điều kiện SMG.



Sơ đồ 3.3. Quy trình sản xuất hợp chất thứ cấp trên cây Diệp hạ châu đắng thông qua quá trình phát sinh hình thái dưới điều kiện SMG.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy tác động tích cực của điều kiện SMG trong quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng *in vitro* của cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng.

1. Đối với quá trình phát sinh hình thái:

Trên cây hoa Thu hải đường, điều kiện SMG đã thúc đẩy sự cảm ứng, biệt hóa và trưởng thành ở SEs từ mẫu cuống lá nuôi cấy *in vitro*.

Trên cây Dâu tây, điều kiện SMG đã kích thích khả năng hình thành mô sẹo cũng như tái sinh chồi của mẫu lá nuôi cấy *in vitro*.

Trên cây Diệp hạ châu đắng, điều kiện SMG đã thúc đẩy quá trình cảm ứng mô sẹo và hình thành rễ bất định của mẫu cấy lóng thân cây nuôi cấy *in vitro*.

2. Quá trình phát sinh hình thái trong điều kiện stress lực hấp dẫn đã được thích nghi bằng cách điều chỉnh hàm lượng và tỷ lệ hormone nội sinh (AUX, GA_3, ABA và CKs) ở cây hoa Thu hải đường, cây Dâu tây và cây Diệp hạ châu đắng. Hoặc bằng cách tăng cường hoạt tính các enzyme kháng oxy hóa (CAT, APX) ở cây Dâu tây, cây Diệp hạ châu đắng. Sự thích nghi này cũng được thể hiện bằng việc gia tăng tích lũy hợp chất thứ cấp và tăng sinh tế bào ở cây Diệp hạ châu đắng.

3. Sự sinh trưởng *in vitro* của chồi cũng như sự tạo cây con hoàn chỉnh của cây hoa Thu hải đường ở môi trường trọng lực thực từ SEs được hình thành dưới điều kiện SMG cũng được tăng cường; cây con có nguồn gốc dưới điều kiện SMG sinh trưởng, phát triển tốt và không có bất thường về hình thái.

Trên cây Dâu tây, sự sinh trưởng tiếp theo của chồi, cây con có nguồn gốc dưới điều kiện SMG là tốt hơn so với điều kiện G. Ở giai đoạn vườn ươm, khả năng thích nghi và hình thành cây ngó của cây con có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện SMG cho thấy không có sự khác biệt so với điều kiện G, duy chỉ có thời gian hình thành ngó của cây con có nguồn gốc dưới điều kiện SMG là sớm hơn.

Trên cây Diệp hạ châu đắng, sự tăng sinh mô sẹo được hình thành dưới điều kiện SMG cho sinh khối và sự tích lũy hợp chất thứ cấp flavonoid (rutin và quercetin) và lignan (phyllanthin và hypophyllanthin) cho thấy là tốt hơn điều kiện G.

4.2. Kiến nghị

1. Tiếp tục nghiên cứu ghi nhận sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* ở các giai đoạn tạo chồi và tạo rễ của cây Diệp hạ châu đắng nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện SMG.

2. Tiếp tục nghiên cứu ghi nhận sự thích nghi của cây con Thu hải đường, Diệp hạ châu đắng có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện SMG ở giai đoạn vườn ươm.

3. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện SMG trên các đối tượng cây trồng với các thiết bị mô phỏng và tốc độ quay khác nhau; đặc biệt đi sâu tìm hiểu vai trò của SMG đối với các cơ chế sinh hóa và biểu hiện gen.

4. Nghiên cứu ứng dụng việc xử lý mẫu cấy dưới điều kiện SMG trong lĩnh vực vi nhân giống cây trồng cũng như nuôi cấy tế bào để sản xuất các hợp chất thứ cấp trên quy mô công nghiệp.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Hoang Dac Khai, **Le The Bien**, Nguyen Quang Vinh, Doan Manh Dung, Ngo Dai Nghiep, Nguyen Thi Nhu Mai, Hoang Thanh Tung, Vu Quoc Luan, Do Manh Cuong, Duong Tan Nhut, *Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of Begonia somatic embryos under clinorotation*, Plant Science, 2021, 312, 111045.

2. **Le The Bien**, Hoang Thanh Tung, Nguyen Thi Nhu Mai, Truong Hoai Phong, Do Manh Cuong, Hoang Dac Khai, Vu Quoc Luan, Nguyen Ba Nam, Trinh Thi Huy Tra, Bui Van The Vinh, Duong Tan Nhut, *Morphogenesis of in vitro strawberry leaf cultured under Clinostat 2-D condition*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2023, 152(1), 1-12.

3. **Lê Thế Biên**, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Như Mai, Hoàng Đắc Khải, Đỗ Mạnh Cường, Trương Hoài Phong, Vũ Quốc Luận, Bùi Văn Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt, *Phát sinh hình thái in vitro, hoạt tính enzyme kháng ôxy hóa và tích lũy hợp chất thứ cấp của mẫu lóng thân cây Diệp hạ châu đắng (Phyllanthus amarus) dưới điều kiện Clinostat 2D*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Bản B), 2024, 66(2), 49-54.

4. Duong Tan Nhut, Hoang Dac Khai, Nguyen Xuan Tuan, **Le The Bien**, Hoang Thanh Tung, *In vitro growth and development of plant under simulated microgravity condition*, In: Duong Tan Nhut, Hoang Thanh Tung, Edward Chee-Tak Yeung (Eds), *Plant tissue culture: New techniques and application in horticultural species of tropical region*, Springer, Singapore, 2022, 343-382.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M. Cooper, M. Perchonok, G.L. Douglas, *Initial assessment of the nutritional quality of the space food system over three years of ambient storage*, NPJ Microgravity, 2017, 3, 17.

[2] K. Soga, K. Wakabayashi, S. Kamisaka, T. Hoson, *Stimulation of elongation growth and xyloglucan breakdown in Arabidopsis hypocotyls under microgravity conditions in space*, Planta, 2002, 215, 1040-1046.

[3] C.M. Johnson, A. Subramanian, R.E. Edelmann, J.Z. Kiss, *Morphometric analyses of petioles of seedlings grown in a spaceflight experiment*, Journal of Plant Research, 2015, 128, 1007-1016.

[4] A.I. Manzano, I. Matía, F. González-Camacho, E. Carnero-Díaz, J.J. Van Loon, C. Dijkstra, O. Larkin, P. Anthony, M.R. Davey, R. Marco, *Germination of Arabidopsis seed in space and in simulated microgravity: alterations in root cell growth and proliferation*, Microgravity Science and Technology, 2009, 21, 293-297.

[5] I. Matía, F. González-Camacho, R. Herranz, J.Z. Kiss, G. Gasset, J.J. Van Loon, R. Marco, F.J. Medina, *Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight*, Journal of Plant Physiology, 2010, 167, 184-193.

[6] R. Laurinavičius, A. Stočkus, B. Buchen, A. Sievers, *Structure of cress root statocytes in microgravity (BION-10 mission)*, Advances in Space Research, 1996, 17, 91-94.

[7] O. Kuznetsov, C. Brown, H. Levine, W. Piastuch, M. Sanwo-Lewandowski, K. Hasenstein, *Composition and physical properties of starch in microgravity-grown plants*, Advances in Space Research, 2001, 28, 651-658.

[8] K. Miyamoto, T. Yuda, T. Shimazu, J. Ueda, *Leaf senescence under various gravity conditions: relevance to the dynamics of plant hormones*, Advances in Space Research, 2001, 27, 1017-1022.

[9] S.S. Jagtap, R.B. Awhad, B. Santosh, P.B. Vidyasagar, *Effects of clinorotation on growth and chlorophyll content of rice seeds*, Microgravity Science and Technology, 2011, 23, 41-48.

[10] D.T. Nhựt, N.T.T. Anh, N.X. Tuấn, N.B. Nam, V.Q. Luận, N.P. Huy, *Ảnh hưởng của điều kiện không trọng lực lên khả năng nảy mầm, sinh trưởng, phát triển và một số khác biệt kiểu hình của cây bóng nước (Impatiens balsamina)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2016, 14, 479-489.

[11] T. Hoson, K. Wakabayashi, *Role of the plant cell wall in gravity resistance*, Phytochemistry, 2015, 112, 84-90.

[12] J.P. Vandenbrink, J.Z. Kiss, R. Herranz, F.J. Medina, *Light and gravity signals synergize in modulating plant development*, Frontiers in plant science, 2014, 5, 563.

[13] D. Eichholz, *Theophrastus, De Causis Plantarum-B. Einarson, GKK Link: Theophrastus, De Causis Plantarum I.(Loeb Classical Library.) Pp.*

lxvii+ 361. London and Cambridge, Mass.; W. Heinemann and Harvard University Press, 1976. Cloth, £ 2.95, The Classical Review, 1978, 28, 12-14.
[14] T.A. Knight, *V. On the direction of the radicle and germen during the vegetation of seeds. By Thomas Andrew knight, Esq. FRS In a letter to the right Hon. Sir Joseph banks, KBPR S*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1806, 99-108.
[15] C. Darwin, F. Darwin, *The power of movement in plants*, John Murray, 1880.
[16] M.M. Vazquez, C.A. Casalongué, R. París, *Nitrate reductase mediates nitric oxide-dependent gravitropic response in Arabidopsis thaliana roots*, Plant Signaling and Behavior, 2019, 14, e1578631.
[17] J. Xie, H. Zheng, *Arabidopsis flowering induced by photoperiod under 3-D clinostat rotational simulated microgravity*, Acta Astronautica, 2020, 166, 567-572.
[18] M. Böhmer, E. Schleiff, *Microgravity research in plants: A range of platforms and options allow research on plants in zero or low gravity that can yield important insights into plant physiology*, EMBO Reports, 2019, 20, e48541.
[19] S. Brungs, M. Egli, S.L. Wuest, P.C. M. Christianen, J.J. WA van Loon, T.J. Ngo Anh, R. Hemmersbach, *Facilities for simulation of microgravity in the ESA ground-based facility programme*, Microgravity Science and Technology, 2016, 28, 191-203.
[20] S.L. Wuest, S. Richard, S. Kopp, D. Grimm, M. Egli, *Simulated microgravity: critical review on the use of random positioning machines for mammalian cell culture*, BioMed Research International, 2015, 2015.
[21] J.J. Van Loon, *Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research*, Advances in Space research, 2007, 39, 1161-1165.
[22] M. Schulz, B. Solscheid, H. Schnabl, *Changes in the soluble protein pattern and evidence for stress reactions in leaf tissue of Vicia faba L. after clinostat rotation*, Journal of Plant Physiology, 1992, 140, 502-507.
[23] H. Wang, H.Q. Zheng, W. Sha, R. Zeng, Q.C. Xia, *A proteomic approach to analysing responses of Arabidopsis thaliana callus cells to clinostat rotation*, Journal of experimental botany, 2006, 57, 827-835.
[24] M. Soleimani, F. Ghanati, Z. Hajebrahimi, A. Hajnorouzi, P. Abdolmaleki, F. Zarinkamar, *Energy saving and improvement of metabolism of cultured tobacco cells upon exposure to 2-D clinorotation*, Journal of Plant Physiology, 2019, 234, 36-43.
[25] T. Hoson, S. Kamisaka, B. Buchen, A. Sievers, M. Yamashita, Y. Masuda, *Possible use of a 3-D clinostat to analyze plant growth processes under microgravity conditions*, Advances in Space Research, 1996, 17, 47-53.
[26] T. Shimazu, T. Yuda, K. Miyamoto, M. Yamashita, J. Ueda, *Growth and development in higher plants under simulated microgravity conditions on a 3-dimensional clinostat*, Advances in Space Research, 2001, 27, 995-1000.

[27] R. Dedolph, M. Dipert, *The physical basis of gravity stimulus nullification by clinostat rotation*, Plant Physiology, 1971, 47, 756-764.
[28] R. Herranz, R. Anken, J. Boonstra, M. Braun, P.C. Christianen, M. de Geest, J. Hauslage, R. Hilbig, R.J. Hill, M. Lebert, *Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology*, Astrobiology, 2013, 13, 1-17.
[29] T.F. Kraft, J.J. van Loon, J.Z. Kiss, *Plastid position in Arabidopsis columella cells is similar in microgravity and on a random-positioning machine*, Planta, 2000, 211, 415-422.
[30] Ž. Barjaktarović, A. Nordheim, T. Lamkemeyer, C. Fladerer, J. Madlung, R. Hampp, *Time-course of changes in amounts of specific proteins upon exposure to hyper-g, 2-D clinorotation, and 3-D random positioning of Arabidopsis cell cultures*, Journal of Experimental Botany, 2007, 58, 4357-4363.
[31] P. Faraoni, E. Sereni, A. Gnerucci, F. Cialdai, M. Monici, F. Ranaldi, *Glyoxylate cycle activity in Pinus pinea seeds during germination in altered gravity conditions*, Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 139, 389-394.
[32] R. Herranz, M.A. Valbuena, A. Manzano, K.Y. Kamal, A. Villacampa, M. Ciska, J.J. van Loon, F.J. Medina, *Use of reduced gravity simulators for plant biological studies*, Plant Gravitropism: Methods and Protocols, 2022, 241-265.
[33] G.C. Phillips, *In vitro morphogenesis in plants-recent advances*, *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 2004, 40, 342-345.
[34] T. Hoson, K. Soga, R. Mori, M. Saiki, K. Wakabayashi, S. Kamisaka, S. Kamigaichi, S. Aizawa, I. Yoshizaki, C. Mukai, *Morphogenesis of rice and Arabidopsis seedlings in space*, Journal of Plant Research, 1999, 112, 477-486.
[35] K. Soga, A. Kurita, S. Yano, T. Ichikawa, M. Kamada, M. Takaoki, *Growth and morphogenesis of Azuki bean seedlings in space during SSAF2013 program*, Biological Sciences in Space, 2014, 28, 6-11.
[36] A.I. Manzano, I. Matía, F. González-Camacho, E. Carnero-Díaz, J.J. van Loon, C. Dijkstra, O. Larkin, P. Anthony, M.R. Davey, R. Marco, *Germination of Arabidopsis seed in space and in simulated microgravity: alterations in root cell growth and proliferation*, Microgravity Science and Technology, 2009, 21, 293-297.
[37] E. Boucheron-Dubuisson, A.I. Manzano, I. Le Disquet, I. Matía, J. Sáez-Vasquez, J.J. van Loon, R. Herranz, E. Carnero-Diaz, F.J. Medina, *Functional alterations of root meristematic cells of Arabidopsis thaliana induced by a simulated microgravity environment*, Journal of plant physiology, 2016, 207, 30-41.
[38] A. Manzano, R. Herranz, L.A. den Toom, S. Te Slaa, G. Borst, M. Visser, F.J. Medina, J.J. van Loon, *Novel, Moon and Mars, partial gravity simulation paradigms and their effects on the balance between cell growth*

and cell proliferation during early plant development, npj Microgravity, 2018, 4, 1-11.
[39] K.Y. Kamal, J.J. van Loon, F.J. Medina, R. Herranz, *Differential transcriptional profile through cell cycle progression in Arabidopsis cultures under simulated microgravity*, Genomics, 2019, 111, 1956-1965.
[40] M. Soleimani, F. Ghanati, Z. Hajebrahimi, *The role of phenolic compounds in growth improvement of cultured tobacco cells after exposure to 2-D clinorotation*, Iranian Journal of Plant Physiology, 2019, 9, 2921-2929.
[41] H.G. Levine, W.C. Piastuch, *Growth patterns for etiolated soybeans germinated under spaceflight conditions*, Advances in Space Research, 2005, 36, 1237-1243.
[42] G. Colla, A. Battistelli, S. Proietti, S. Moscatello, Y. Rouphael, M. Cardarelli, M. Casucci, *Rocket seedling production on the International Space Station: Growth and Nutritional properties*, Microgravity Science and Technology, 2007, 19, 118-121.
[43] K. Weterings, J. Wamsteker, J.v. Loon, *Seeds-In-Space education experiment during the Dutch Soyuz mission DELTA*, Microgravity Science and Technology, 2007, 19, 244-248.
[44] H. Wu, C. Huang, K. Zhang, Y. Sun, *Mutations in cauliflower and sprout broccoli grown from seeds flown in space*, Advances in Space Research, 2010, 46, 1245-1248.
[45] Y. Shen, S. Guo, P. Zhao, L. Wang, X. Wang, J. Li, Q. Bian, *Research on lettuce growth technology onboard Chinese Tiangong II Spacelab*, Acta Astronautica, 2018, 144, 97-102.
[46] T. Takakura, E. Goto, M. Tanaka, *The effect of gravity on plant germination*, Advances in Space Research, 1996, 18, 255-258.
[47] J. Aarrouf, C. Demandre, N. Darbelley, C. Villard, G. Perbal, *Development of the primary root and mobilisation of reserves in etiolated seedlings of Brassica napus grown on a slowly rotating clinostat*, Journal of Plant Physiology, 2003, 160, 409-413.
[48] S. Nakajima, Y. Ogawa, T. Suzuki, N. Kondo, *Enhanced antioxidant activity in mung bean seedlings grown under slow clinorotation*, Microgravity Science and Technology, 2019, 31, 395-401.
[49] J.O. Chandler, F.B. Haas, S. Khan, L. Bowden, M. Ignatz, E. Enfissi, F. Gawthrop, A. Griffiths, P.D. Fraser, S.A. Rensing, *Rocket science: The effect of spaceflight on germination physiology, ageing, and transcriptome of Eruca sativa seeds*, Life, 2020, 10, 49.
[50] D. Zeng, J. Cui, Y. Yin, M. Zhang, S. Shan, M.Y. Liu, D. Cheng, W. Lu, Y. Sun, *Proteomic analysis in different development stages on SP0 generation of rice seeds after space flight*, Life Sciences in Space Research, 2020, 26, 34-45.
[51] H. Zhao, T. Zhu, J. Wu, B. Xi, *Effect of simulated microgravity on aged pea seed vigour and related physiological properties*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 27, 311-314.

[52] N.X. Tuấn, N.B. Nam, L.Đ. Đôn, D.T. Nhựt, *Đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của Diệp hạ châu đắng (Phyllanthus amarus) nuôi cấy in vitro dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2015, 13 (2A), 501 - 512.
[53] D.T. Nhựt, N.X. Tuấn, N.T.T. Anh, N.B. Nam, N. Phúc, H.T.T. Huy, V.T. Hiền, V.Q. Luận, B.T. Vinh, T.C. Luận, *Ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực lên khả năng nảy mầm, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hợp chất thứ cấp của sâm Bố chính nuôi cấy in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2017, 15, 73-85.
[54] S. Jagtap, *Effects on growth, development, chlorophyll content and their reversibility in rice and wheat seeds when exposed to altered (micro and hyper) gravity conditions*, 39th COSPAR Scientific Assembly, 2012, 39, 808.
[55] E.B. Blancaflor, P.H. Masson, *Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process*, Plant Physiology, 2003, 133, 1677-1690.
[56] K.D. Millar, P. Kumar, M.J. Correll, J.L. Mullen, R.P. Hangarter, R.E. Edelmann, J.Z. Kiss, *A novel phototropic response to red light is revealed in microgravity*, New Phytologist, 2010, 186, 648-656.
[57] D. Raklevičienė, R. Losinska, D. Švegždienė, *Clinorotation effect on response of cress leaves to red and far-red light*, Microgravity Science and Technology, 2011, 23, 227-233.
[58] S. Kochubey, N. Adamchuk, E. Kordyum, J. Guikema, *Microgravity affects the photosynthetic apparatus of Brassica rapa L*, Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 2004, 138, 1-9.
[59] S. Jiao, E. Hilaire, A.Q. Paulsen, J.A. Guikema, *Brassica rapa plants adapted to microgravity with reduced photosystem I and its photochemical activity*, Physiologia Plantarum, 2004, 122, 281-290.
[60] G. Stutte, O. Monje, G.D. Goins, B. Tripathy, *Microgravity effects on thylakoid, single leaf, and whole canopy photosynthesis of dwarf wheat*, Planta, 2005, 223, 46-56.
[61] B.C. Tripathy, C.S. Brown, H.G. Levine, A.D. Krikorian, *Growth and photosynthetic responses of wheat plants grown in space*, Plant Physiology, 1996, 110, 801-806.
[62] S. Jiao, E. Hilaire, J. Guikema, *Influence of spaceflight on photosystem I (PSI) of Brassica rapa*, Gravitational and Space Biology Bulletin, 1998, 12, 14.
[63] Y. Takahashi, S. Wada, K. Noguchi, C. Miyake, A. Makino, Y. Suzuki, *Photochemistry of photosystems II and I in rice plants grown under different N levels at normal and high temperature*, Plant and Cell Physiology, 2021, 62, 1121-1130.
[64] Y. Kitaya, M. Kawai, J. Tsuruyama, H. Takahashi, A. Tani, E. Goto, T. Saito, M. Kiyota, *The effect of gravity on surface temperature and net photosynthetic rate of plant leaves*, Advances in Space Research, 2001, 28, 659-664.

[65] Y. Kitaya, T. Shibuya, M. Yoshida, M. Kiyota, *Effects of air velocity on photosynthesis of plant canopies under elevated CO_2 levels in a plant culture system*, Advances in Space Research, 2004, 34, 1466-1469.
[66] Y. Kitaya, M. Kawai, J. Tsuruyama, H. Takahashi, A. Tani, E. Goto, T. Saito, M. Kiyota, *The effect of gravity on surface temperatures of plant leaves*, Plant, Cell and Environment, 2003, 26, 497-503.
[67] O. Monje, G. Stutte, G.D. Goins, D. Porterfield, G. Bingham, *Farming in space: environmental and biophysical concerns*, Advances in Space Research, 2003, 31, 151-167.
[68] D. Rioux, M. Lagacé, L.Y. Cohen, J. Beaulieu, *Variation in stem morphology and movement of amyloplasts in white spruce grown in the weightless environment of the International Space Station*, Life Sciences in Space Research, 2015, 4, 67-78.
[69] V. Gaina, D. Švegždien, D. Raklevičien, D. Koryznien, R. Stanevičien, R. Laurinavičius, *Kinetics of amyloplast movement in cress root statocytes under different gravitational loads*, Advances in Space Research, 2003, 31, 2275-2281.
[70] D. Švegždienė, D. Raklevičienė, D. Koryznienė, *Space botany in Lithuania. I. Root gravisensing system formation during satellite'Bion-10'flight*, Botanica Lithuanica, 2013, 19.
[71] G. Lorenzi, G. Perbal, *Root growth and statocyte polarity in lentil seedling roots grown in microgravity or on a slowly rotating clinostat*, Physiologia Plantarum, 1990, 78, 532-537.
[72] D. Švegždienė, D. Koryznienė, D. Raklevičienė, *Comparison study of gravity-dependent displacement of amyloplasts in statocytes of cress roots and hypocotyls*, Microgravity Science and Technology, 2011, 23, 235-241.
[73] D.M. Porterfield, *The biophysical limitations in physiological transport and exchange in plants grown in microgravity*, Journal of Plant Growth Regulation, 2002, 21.
[74] A. Aliyev, *The ultrastructure and physiological characteristics of the photosynthesis system of shoots of garden peas grown for 29 days on the" Salyut-7" space station*, USSR Space Life Sciences Digest, 1987, 10, 15-16.
[75] G. Nechitailo, A. Gordeev, *Effect of artificial electric fields on plants grown under microgravity conditions*, Advances in Space Research, 2001, 28, 629-631.
[76] N. Belyavskaya, *Free and membrane-bound calcium in microgravity and microgravity effects at the membrane level*, Advances in Space Research, 1996, 17, 169-177.
[77] M. Tairbekov, G. Parfyonov, R. Platonova, V. Abramova, V. Golov, A. Rostopshina, V.Y. Lyubchenko, V. Chuchkin, *Biological investigations aboard the biosatellite Cosmos-1129*, Advances in Space Research, 1981, 1, 89-94.
[78] E. Kordyum, E. Nedukha, K. Stynik, A. Mashinsky, *Optical and electron-microscopic studies of the Funaria hygrometrica protonema after*

cultivation for 96 days in space, Advances in Space Research, 1981, 1, 159-162.
[79] S. Nakajima, K. Shiraga, T. Suzuki, N. Kondo, Y. Ogawa, *Chlorophyll, carotenoid and anthocyanin accumulation in mung bean seedling under clinorotation*, Microgravity Science and Technology, 2017, 29, 427-432.
[80] S. Nakajima, Y. Ogawa, T. Suzuki, N. Kondo, *Enhanced antioxidant activity in mung bean seedlings grown under slow clinorotation*, Microgravity Science and Technology, 2019, 31, 395-401.
[81] G. Stutte, O. Monje, R. Hatfield, A.-L. Paul, R. Ferl, C. Simone, *Microgravity effects on leaf morphology, cell structure, carbon metabolism and mRNA expression of dwarf wheat*, Planta, 2006, 224, 1038-1049.
[82] J. Croxdale, M. Cook, T.W. Tibbitts, C.S. Brown, R.M. Wheeler, *Structure of potato tubers formed during spaceflight*, Journal of Experimental Botany, 1997, 48, 2037-2043.
[83] W.J. Al-Awaida, A.S. Sharab, H.J. Al-Ameer, N.Y. Ayoub, *Effect of simulated microgravity on the antidiabetic properties of wheatgrass (Triticum aestivum) in streptozotocin-induced diabetic rats*, npj Microgravity, 2020, 6, 1-10.
[84] M.E. Musgrave, A. Kuang, C.S. Brown, S.W. Matthews, *Changes in Arabidopsis Leaf Ultrastructure, Chlorophyll and Carbohydrate Content During Spaceflight Depend on Ventilation*, Annals of Botany, 1998, 81, 503-512.
[85] D.G. Frodin, *History and concepts of big plant genera*, Taxon, 2004, 53, 753-776.
[86] C.I. Peng, C.W. Lin, H.A. Yang, Y. Kono, H.Q. Nguyen, *Six new species of Begonia (Begoniaceae) from limestone areas in Northern Vietnam*, Botanical Studies, 2015, 56, 1-23.
[87] N.O. Anderson, *Flower breeding and genetics: issues, challenges and opportunities for the 21st century*, Springer Science & Business Media, 2006.
[88] D.T. Nhut, N.T. Hai, P.X. Huyen, D.T.Q. Huong, N.T.T. Hang, J.A.T. da Silva, *Thidiazuron induces high frequency shoot bud formation from Begonia petiole transverse thin cell layer culture*, Propagation of Ornamental Plants, 2005, 5, 149-155.
[89] F. Espino, R. Linacero, J. Rueda, A. Vazquez, *Shoot regeneration in four Begonia genotypes*, Biologia Plantarum, 2004, 48, 101-104.
[90] K. Sara, G. Yousef, N. Ghorbanali, A. Roghayeh, S.K. Behzad, Y. Mohammad, *Effect of explant type and growth regulators on in vitro micropropagation of Begonia rex*, International Research Journal of Basic and Applied Science, 2012, 3, 896-901.
[91] F. Velasco Martínez, H. González Rosas, A.M. Castillo González, E.A. Gaytán Acuña, *In vitro cultivation of petals of four varieties of Begonia elatior*, Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 2018, 9, 1207-1216.
[92] B. Vandecasteele, J. Debode, K. Willekens, T. Van Delm, *Recycling of P and K in circular horticulture through compost application in sustainable*

growing media for fertigated strawberry cultivation, European Journal of Agronomy, 2018, 96, 131-145.
[93] R. Ganhão, J. Pinheiro, C. Tino, H. Faria, M.M. Gil, *Characterization of nutritional, physicochemical, and phytochemical composition and antioxidant capacity of three strawberry "Fragaria× ananassa Duch." cultivars ("Primoris","Endurance", and "Portola") from Western Region of Portugal*, Foods, 2019, 8, 682.
[94] M. Munir, S. Iqbal, J. Baloch, A. Khakwani, *In vitro explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars*, Journal of Applied Horticulture, 2015, 17.
[95] S. Palei, A.K. Das, G.R. Rout, *In vitro studies of strawberry-an important fruit crop: a review*, The Journal of Plant Science Research, 2015, 31, 115.
[96] Đ.T. Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Hồng Đức, 2013.
[97] M. Wongnawa, P. Thaina, N. Bumrungwong, A. Nitiruangjarat, A. Muso, V. Prasartthong, *Effect of Phyllanthus amarus Schum. & Thonn. and its protective mechanism on paracetamol hepatotoxicity in rats*, Acta Horticulturae, 2005, 680, 195-201.
[98] R. Sane, V. Kuber, M.S. Chalissery, S. Menon, *Hepatoprotection by Phyllanthus amarus and Phyllanthus debilis in CCl 4-induced liver dysfunction*, Current Science, 1995, 68, 1243-1246.
[99] H. Harikrishnan, I. Jantan, A. Alagan, M.A. Haque, *Modulation of cell signaling pathways by Phyllanthus amarus and its major constituents: potential role in the prevention and treatment of inflammation and cancer*, Inflammopharmacology, 2020, 28, 1-18.
[100] M. Elamvaluthi, S. Saravanan, P. Sathyanarayanan, *Optimization of in vitro regeneration of Phyllanthus amarus and its antibacterial potential*, Journal of Academia and Industrial Research, 2016, 5, 54-57.
[101] J.R. Xavier, R. Gnanam, M.P. Murugan, A. Pappachan, *Clonal propagation of Phyllanthus amarus: A hepatoprotector*, Pharmacognosy Magazine, 2012, 8, 78.
[102] T. Murashige, F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*, Physiologia Plantarum, 1962, 15, 473-497.
[103] R. Hemmersbach, M. von der Wiesche, D. Seibt, *Ground-based experimental platforms in gravitational biology and human physiology*, Signal Transduction, 2006, 6, 381-387.
[104] E.G. Sutter, H. Ahmadi, J.M. Labavitch, Direct regeneration of strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) from leaf disks, in: III International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding 447, 1996, pp. 243-246.
[105] K. Nitnaware, D. Naik, T. Nikam, *Thidiazuron-induced shoot organogenesis and production of hepatoprotective lignan phyllanthin and*

hypophyllanthin in Phyllanthus amarus, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2011, 104, 101-110.
[106] Y. Tang, L. Wang, C. Ma, J. Liu, B. Liu, H. Li, *The use of HPLC in determination of endogenous hormones in anthers of bitter melon*, Journal of Life Sciences, 2011, 5, 139-142.
[107] S. Marklund, G. Marklund, *Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase*, European Journal of Biochemistry, 1974, 47, 469-474.
[108] L. Goth, *A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range*, Clinica Chimica Acta, 1991, 196, 143-151.
[109] Y. Nakano, K. Asada, *Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts*, Plant and Cell Physiology, 1981, 22, 867-880.
[110] M.S. Blois, *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*, Nature, 1958, 181, 1199-1200.
[111] T. Nikolaeva, P. Lapshin, N. Zagoskina, *Method for Determining the Total Content of Phenolic Compounds in Plant Extracts with Folin–Denis Reagent and Folin–Ciocalteu Reagent: Modification and Comparison*, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2022, 48, 1519-1525.
[112] V. Murugaiyah, K.L. Chan, *Determination of four lignans in Phyllanthus niruri L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection*, Journal of Chromatography A, 2007, 1154, 198-204.
[113] B. Fernandes, G. Dragone, A.P. Abreu, P. Geada, J. Teixeira, A. Vicente, *Starch determination in Chlorella vulgaris - a comparison between acid and enzymatic methods*, Journal of Applied Phycology, 2012, 24, 1203-1208.
[114] T. Krivorotova, J. Sereikaite, *Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants*, Electronic Journal of Biotechnology, 2014, 17, 329-333.
[115] H.T. Tung, T.T. Thuong, D.M. Cuong, V.Q. Luan, V.T. Hien, T. Hieu, N.B. Nam, H.T.N. Phuong, B.V.T. Vinh, H.D. Khai, *Silver nanoparticles improved explant disinfection, in vitro growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (Fragaria× ananassa)*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2021, 145, 393-403.
[116] R.L. Peterson, C.A. Peterson, L.H. Melville, *Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises*, NRC Research Press, 2008.
[117] B. Conger, Z. Tomaszewski Jr, J. McDaniel, A. Vasilenko, *Spaceflight reduces somatic embryogenesis in orchardgrass (Poaceae)*, Plant, Cell and Environment, 1998, 21, 1197-1203.
[118] H. Hassanpour, M. Ghanbarzadeh, *Induction of cell division and antioxidative enzyme activity of Matricaria chamomilla L. cell line under clino-rotation*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2021, 146, 215-224.

[119] A.D. Krikorian, F. Steward, *Morphogenetic responses of cultured totipotent cells of carrot (Daucus carota var. carota) at zero gravity*, Science, 1978, 200, 67-68.
[120] D. Strickland, W. Campbell, F. Salisbury, G. Bingham, *Morphological assessment of reproductive structures of wheat grown on Mir*, Gravitational and Space Biology Bulletin, 1997, 11, 14.
[121] M.E. Musgrave, A. Kuang, Y. Xiao, S.C. Stout, G.E. Bingham, L.G. Briarty, M.A. Levinskikh, V.N. Sychev, I.G. Podolski, *Gravity independence of seed-to-seed cycling in Brassica rapa*, Planta, 2000, 210, 400-406.
[122] A. Kuang, Y. Xiao, G. McClure, M.E. Musgrave, *Influence of microgravity on ultrastructure and storage reserves in seeds of Brassica rapa L*, Annals of Botany, 2000, 85, 851-859.
[123] R. Laurinavičius, D. Švegždien, D. Raklevičien, P. Kenstavičien, *Ontogeny of plants under various gravity condition*, Advances in Space Research, 2001, 28, 601-606.
[124] Q. Zhao, J. Li, M. Liu, *Effects of simulated microgravity on characteristics of photosynthesis in plant seedling*, Space Medicine & Medical Engineering, 2002, 15, 79-83.
[125] E. Kordyum, D. Chapman, V. Brykov, *Plant cell development and aging may accelerate in microgravity*, Acta Astronautica, 2019, 157, 157-161.
[126] H.T. Tung, H.T.M. Ngan, D.M. Cuong, V.T. Hien, T.T. Huong, B.V.T. Vinh, V.T. Mo, T.T.L. Anh, N. Van Binh, L.T. Diem, *Somatic embryo as a tool for micropropagating of some plants*, In: *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*, Springer, 2022, pp. 129-166.
[127] R.E. Márquez-López, C. Pérez-Hernández, Á. Ku-González, R.M. Galaz-Ávalos, V.M. Loyola-Vargas, *Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in Coffea canephora*, Protoplasma, 2018, 255, 695-708.
[128] H.A. Méndez-Hernández, M. Ledezma-Rodríguez, R.N. Avilez-Montalvo, Y.L. Juárez-Gómez, A. Skeete, J. Avilez-Montalvo, C. De-la-Peña, V.M. Loyola-Vargas, *Signaling overview of plant somatic embryogenesis*, Frontiers in plant science, 2019, 10, 77.
[129] L.A.P. Quinga, A.S. Heringer, H.P. de Freitas Fraga, L. do Nascimento Vieira, V. Silveira, D.A. Steinmacher, M.P. Guerra, *Insights into the conversion potential of Theobroma cacao L. somatic embryos using quantitative proteomic analysis*, Scientia horticulturae, 2018, 229, 65-76.
[130] B. Palevitz, *Potential significance of microtubule rearrangement, translocation and reutilization in plant cells*, Academic Press London, 1991.
[131] A.L. Cleary, *Actin in formation of stomatal complexes*, Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions, 2000, 411-426.

[132] B. Galatis, P. Apostolakos, *The role of the cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes*, New Phytologist, 2004, 161, 613-639.
[133] J.U. Hwang, S.O. Eun, Y. Lee, *Structure and function of actin filaments in mature guard cells*, Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions, 2000, 427-436.
[134] E.B. Skagen, T.H. Iversen, *Simulated weightlessness and hyper-g results in opposite effects on the regeneration of the cortical microtubule array in protoplasts from Brassica napus hypocotyls*, Physiologia Plantarum, 1999, 106, 318-325.
[135] J. Tabony, N. Glade, C. Papaseit, J. Demongeot, *Microtubule self-organisation and its gravity dependence*, Advances in Space Biology and Medicine, 2002, 8, 19-58.
[136] A.M. Hetherington, *Guard cell signaling*, Cell, 2001, 107, 711-714.
[137] P. Forscher, *Calcium and polyphosphoinositide control of cytoskeletal dynamics*, Trends in neurosciences, 1989, 12, 468-474.
[138] M. Toyota, T. Furuichi, M. Sokabe, H. Tatsumi, *Analyses of a gravistimulation-specific Ca^{2+} signature in Arabidopsis using parabolic flights*, Plant Physiology, 2013, 163, 543-554.
[139] C. Treesubsuntorn, K. Lakaew, S. Autarmat, P. Thiravetyan, *Enhancing benzene removal by Chlorophytum comosum under simulation microgravity system: Effect of light-dark conditions and indole-3-acetic acid*, Acta Astronautica, 2020, 175, 396-404.
[140] P. Pathak, A. Kumari, B. Thakur, *Regeneration competence of an endangered orchid, Vanda cristata* Wall. ex Lindl. *using leaf explants: A study in vitro*, South African Journal of Botany, 2022, 151, 1018-1024.
[141] N. Aswathi, T.D. Thomas, *Direct and indirect shoot regeneration from leaf explants of Centratherum punctatum* Cass., *A wild ornamental plant*, Scientia Horticulturae, 2023, 320, 112201.
[142] W. Cai, H. Chen, J. Jin, P. Xu, T. Bi, Q. Xie, X. Pang, J. Hu, *Plant adaptation to microgravity environment and growth of plant cells in altered gravity conditions*, Life Science in Space: Experiments on Board the SJ-10 Recoverable Satellite, 2019, 131-166.
[143] J. Jin, H. Chen, W. Cai, *Transcriptomic analysis reveals the effects of microgravity on Rice calli on board the Chinese spaceship Shenzhou 8*, Microgravity Science and Technology, 2018, 30, 807-816.
[144] G. Lionheart, J.P. Vandenbrink, J.D. Hoeksema, J.Z. Kiss, *The impact of simulated microgravity on the growth of different genotypes of the model legume plant Medicago truncatula*, Microgravity Science and Technology, 2018, 30, 491-502.
[145] L. Taiz, E. Zeiger, *Plant physiology, 3rd edn Sunderland*, MA Sinauer Associates, 2002, 690.

[146] V. Jiménez, E. Guevara, J. Herrera, F. Bangerth, *Endogenous hormone levels in habituated nucellar Citrus callus during the initial stages of regeneration*, Plant Cell Reports, 2001, 20, 92-100.
[147] H. Ezura, N.P. Harberd, *Endogenous gibberellin levels influence in-vitro shoot regeneration in Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Planta, 1995, 197, 301-305.
[148] R. Finkelstein, *Abscisic acid synthesis and response*, The Arabidopsis book/American society of plant biologists, 2013, 11.
[149] Y. Murata, I.C. Mori, S. Munemasa, *Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism*, Annual Review of Plant Biology, 2015, 66, 369-392.
[150] K. Rikiishi, T. Matsuura, Y. Ikeda, M. Maekawa, *Light inhibition of shoot regeneration is regulated by endogenous abscisic acid level in calli derived from immature barley embryos*, PLoS One, 2015, 10, e0145242.
[151] J. Kleine-Vehn, J. Friml, *Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development*, Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2008, 24, 447-473.
[152] W. Liu, D. Zhang, X. Li, L. Zheng, C. Cui, Y. Cui, J. Sun, J. Xie, X. Zhou, *TGF-β1 facilitates cell–cell communication in osteocytes via connexin43-and pannexin1-dependent gap junctions*, Cell Death Discovery, 2019, 5, 141.
[153] X. Zhou, R. Zheng, G. Liu, Y. Xu, Y. Zhou, T. Laux, Y. Zhen, S.A. Harding, J. Shi, J. Chen, *Desiccation treatment and endogenous IAA levels are key factors influencing high frequency somatic embryogenesis in Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook, Frontiers in Plant Science, 2017, 8, 2054.
[154] H. Guo, J. Li, Y. Ma, Z. Zhu, L. Du, *Somatic embryogenesis processes and changes in endogenous hormone content of Cinnamomum camphora* L., 2022.
[155] H. Mercier, B.M. Souza, J.E. Kraus, R.M. Hamasaki, B. Sotta, *Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro*, Brazilian Journal of Plant Physiology, 2003, 15, 107-112.
[156] Y. Guo, D. Huang, X. Chang, C. Zhu, X. Li, Z. Lai, *Somatic embryogenesis and the changes of endogenous hormones in Camellia sinensis Tieguanyin*, Chinese Journal of Applied Environmental Biology, 2018, 24, 824-832.
[157] E. Kordyum, O. Nedukha, V. Grakhov, A. Mel'nik, T. Vorobyova, O. Klimenko, I. Zhupanov, *Study of the influence of simulated microgravity on the cytoplasmic membrane lipid bilayer of plant cells*, Space Science and Technology, 2015, 21.
[158] H.T.M. Ngan, D.M. Cuong, H.T. Tung, N.D. Nghiep, B.V. Le, D.T. Nhut, *The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (Rosa hybrida* L.'Baby Love'*)*

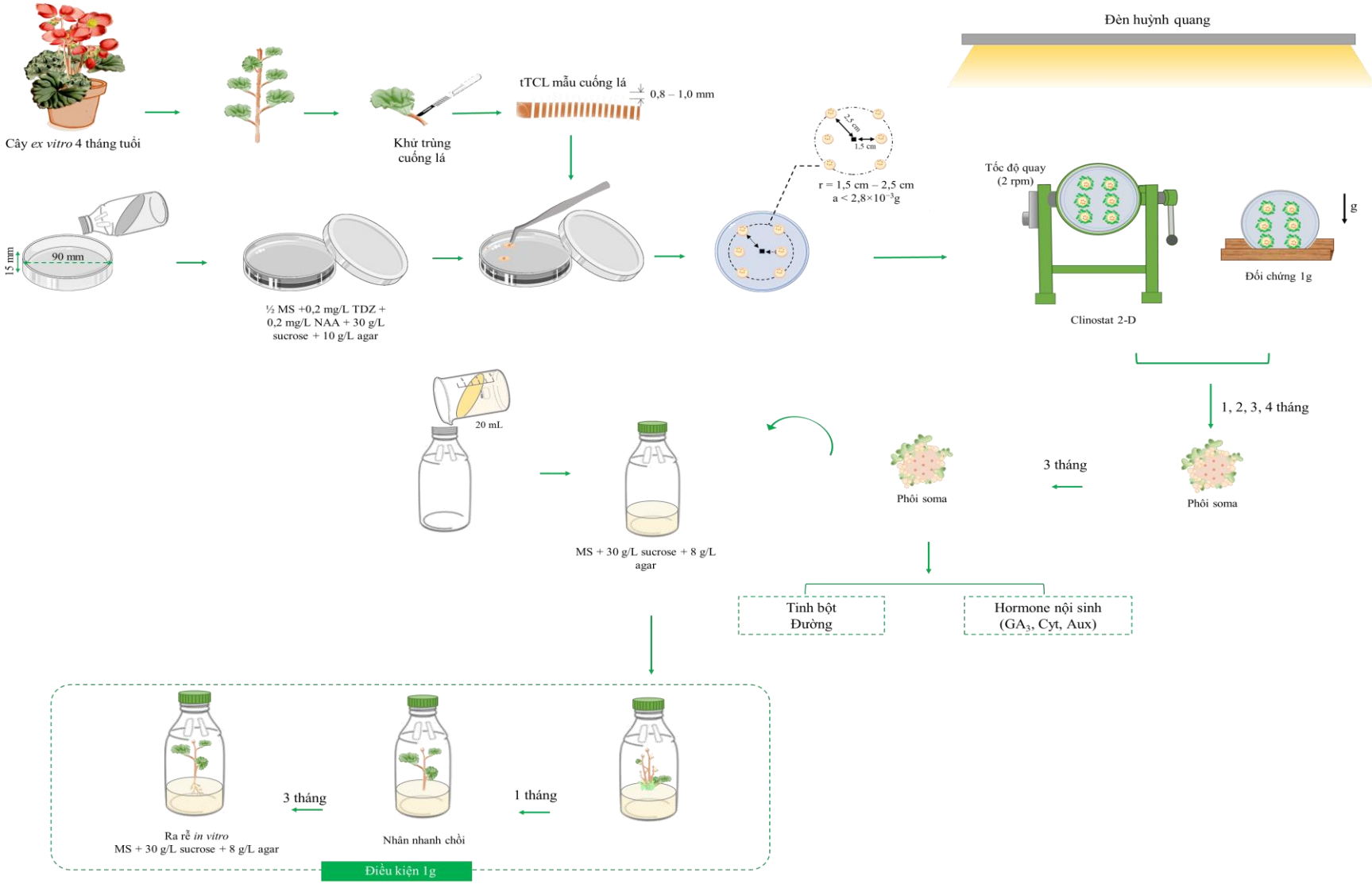
plantlets cultured in vitro, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2020, 141, 393-405.
[159] H. Halimeh, *Antioxidant metabolism and oxidative damage in Anthemis gilanica cell line under fast clinorotation*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2022, 150, 709-719.
[160] M. Stavnichuk, N. Mikolajewicz, T. Corlett, M. Morris, S.V. Komarova, *A systematic review and meta-analysis of bone loss in space travelers*, NPJ Microgravity, 2020, 6, 13.
[161] M. Shelhamer, J. Bloomberg, A. LeBlanc, G.K. Prisk, J. Sibonga, S.M. Smith, S.R. Zwart, P. Norsk, *Selected discoveries from human research in space that are relevant to human health on Earth*, NPJ Microgravity, 2020, 6, 5.
[162] M. Moreno-Villanueva, M. Wong, T. Lu, Y. Zhang, H. Wu, *Interplay of space radiation and microgravity in DNA damage and DNA damage response*, NPJ Microgravity, 2017, 3, 14.
[163] H. Hassanpour, M. Ghanbarzadeh, *Induction of cell division and antioxidative enzyme activity of Matricaria chamomilla L. cell line under clino-rotation*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2021, 146, 215-224.
[164] H. Hassanpour, N. Ahmadi, M. Hekmati, M. Ghanbarzadeh, *Effect of SiO2 nanoparticles on phytochemical and anatomical alterations in Anthemis gilanica*, Iranian Journal of Plant Physiology, 2020, 10, 3223-3231.
[165] D.T. Nhut, H.D. Khai, N.X. Tuan, L.T. Bien, H.T. Tung, *In Vitro Growth and Development of Plants Under Simulated Microgravity Condition*, In: *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*, Springer, 2022, pp. 343-381.
[166] I.L. Lai, C.W. Lin, T.Y. Chen, W.H. Hu, *Micropropagation shortens the time to blooming of Begonia montaniformis× Begonia ningmingensis var. bella F1 Progeny*, HortScience, 2018, 53, 1855-1861.
[167] G. Wu, X. Wei, X. Wang, Y. Wei, *Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in Ormosia henryi Prain*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2021, 144, 505-517.
[168] B. Mangat, M. Pelekis, A. Cassells, *Changes in the starch content during organogenesis in in vitro cultured Begonia rex stem explants*, Physiologia Plantarum, 1990, 79, 267-274.
[169] J. Chen, M. Ziv, *The effects of storage condition on starch metabolism and regeneration potentials of twin-scales and inflorescence stem explants of Narcissus tazetta, In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 2005, 41, 816-821.
[170] D. Stoyanova-Koleva, M. Stefanova, M. Zhiponova, V. Kapchina-Toteva, *Effect of N 6-benzyladenine and indole-3-butyric acid on photosynthetic apparatus of Orthosiphon stamineus plants grown in vitro*, Biologia Plantarum, 2012, 56, 607-612.

[171] D.G. Mortley, C.K. Bonsi, W.A. Hill, C.E. Morris, C.S. Williams, C.F. Davis, J.W. Williams, L.H. Levine, B.V. Petersen, R.M. Wheeler, *Influence of microgravity environment on root growth, soluble sugars, and starch concentration of sweetpotato stem cuttings*, Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008, 133, 327-332.
[172] S. Nakajima, K. Shiraga, T. Suzuki, N. Kondo, Y. Ogawa, *Chlorophyll, carotenoid and anthocyanin accumulation in mung bean seedling under clinorotation*, Microgravity Science and Technology, 2017, 29, 427-432.
[173] S. Nakajima, M. Nagata, A. Ikehata, *Mechanism for enhancing the growth of mung bean seedlings under simulated microgravity*, NPJ Microgravity, 2021, 7, 26.
[174] K.Y. Kamal, R. Herranz, J.J. Van Loon, F.J. Medina, *Cell cycle acceleration and changes in essential nuclear functions induced by simulated microgravity in a synchronized Arabidopsis cell culture*, Plant, Cell and Environment, 2019, 42, 480-494.
[175] N.A. Zulkifli, T.C. Chuang, O.K. Khim, N.A. Bakar, U. Fahri, A. Rauf, W.M.Z.W. Yunus, *Effects of simulated microgravity on rice (MR 219) growth and yield*, Malaysian Journal of Fundamental Applied Sciences, 2018, 14, 278-283.
[176] C. Teoh, N. Zulkifli, K. Ong, A. Norliza, U.A. Rauf, W.W. Yunus, *Influence of clinorotation on total grain yield per plant of MR 219 rice seed*, Materials Today: Proceedings, 2019, 19, 1446-1450.
[177] G. Asgari-Targhi, A. Iranbakhsh, Z.O. Ardebili, A.H. Tooski, *Synthesis and characterization of chitosan encapsulated zinc oxide (ZnO) nanocomposite and its biological assessment in pepper (Capsicum annuum) as an elicitor for in vitro tissue culture applications*, International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 189, 170-182.
[178] S. Rajaee Behbahani, A. Iranbakhsh, M. Ebadi, A. Majd, Z.O. Ardebili, *Red elemental selenium nanoparticles mediated substantial variations in growth, tissue differentiation, metabolism, gene transcription, epigenetic cytosine DNA methylation, and callogenesis in bittermelon (Momordica charantia); an in vitro experiment*, PloS one, 2020, 15, e0235556.
[179] G. Pozhvanov, E. Sharova, S. Medvedev, *Microgravity modelling by two-axial clinorotation leads to scattered organisation of cytoskeleton in Arabidopsis seedlings*, Functional Plant Biology, 2021, 48, 1062-1073.
[180] P. Xu, H. Chen, J. Jin, W. Cai, *Single-base resolution methylome analysis shows epigenetic changes in Arabidopsis seedlings exposed to microgravity spaceflight conditions on board the SJ-10 recoverable satellite*, NPJ Microgravity, 2018, 4, 12.
[181] F. Darigh, A. Iranbakhsh, Z.O. Ardebili, M. Ebadi, H. Hassanpour, *Simulated microgravity contributed to modification of callogenesis performance and secondary metabolite production in Cannabis Indica*, Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 186, 157-168.

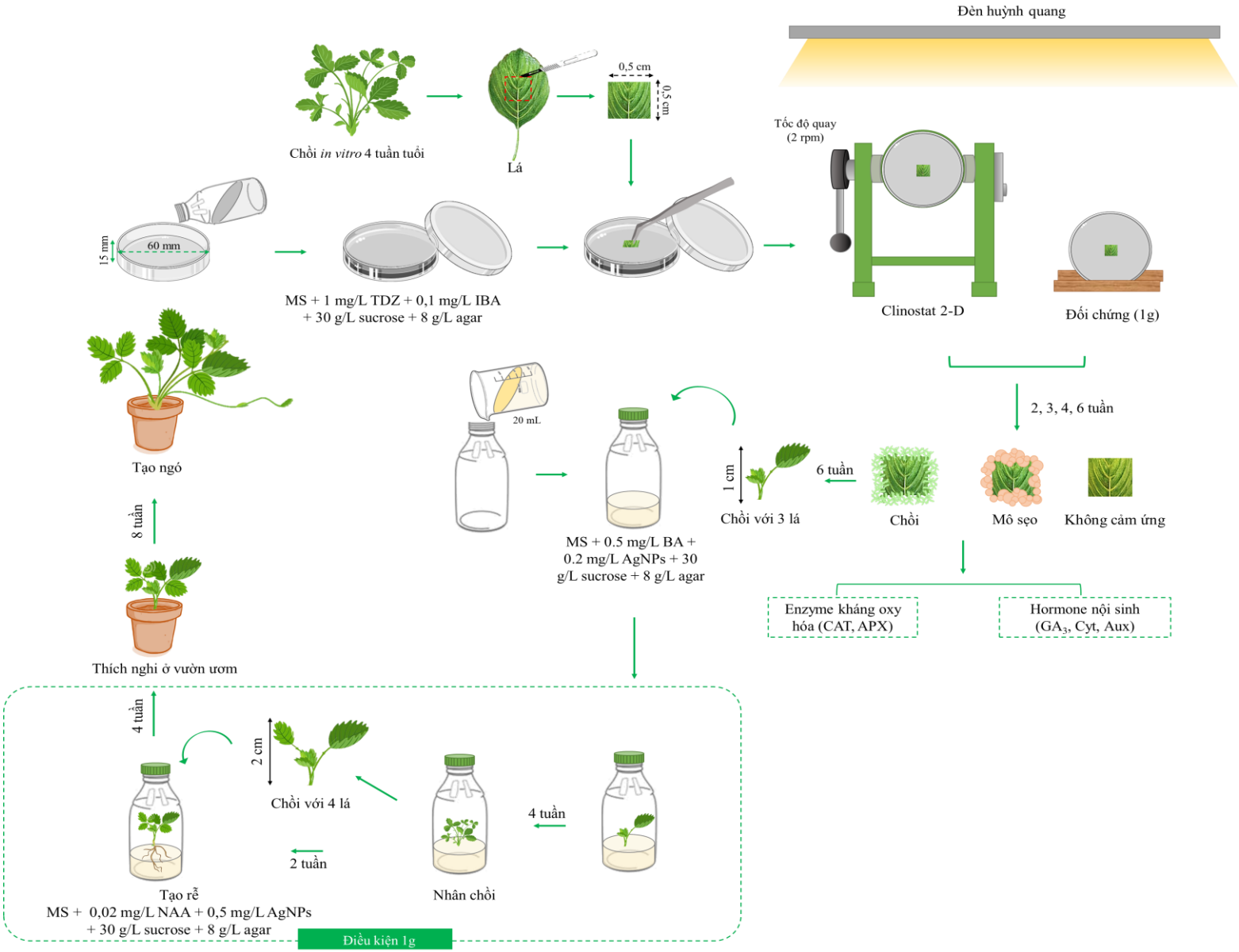
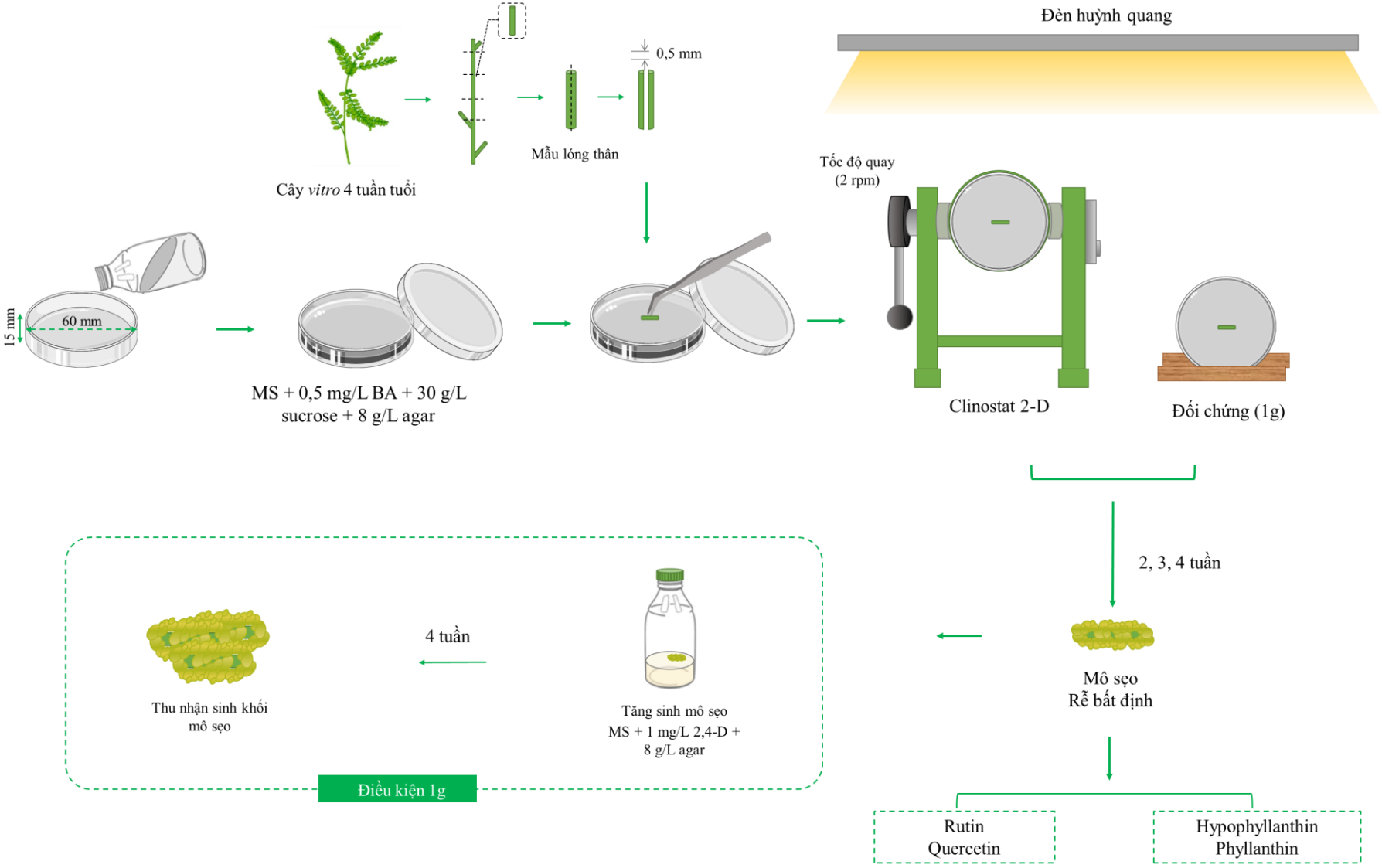
[182] L. Popova, T. Pancheva, A. Uzunova, *Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role,* Bulgarian Journal Plant Physiology, 1997, 23, 85-93.
[183] M.B. Arnao, J. Hernández-Ruiz, *Is phytomelatonin a new plant hormone?*, Agronomy, 2020, 10, 95.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Sơ đồ bố trí các thí nghiệm trên đối tượng cây hoa Thu hải đường



Phụ lục 2. Sơ đồ bố trí các thí nghiệm trên đối tượng cây Dâu tây



Phụ lục 3. Sơ đồ bố trí các thí nghiệm trên đối tượng cây Diệp hạ châu đắng