

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN MÔ PHÒNG KHÔNG TRỌNG LỰC LÊN KHẢ NĂNG NẢY MẦM, SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ TÍCH LŨY HỢP CHẤT THỨ CẤP CỦA SÂM BỔ CHÍNH NUÔI CÂY *IN VITRO*

Dương Tấn Nhựt¹ ✉, Nguyễn Xuân Tuấn¹, Nguyễn Thị Thùy Anh¹, Nguyễn Bá Nam¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Vũ Thị Hiền¹, Vũ Quốc Luận¹, Bùi Thế Vinh², Trần Công Luận²

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 16.01.2016

Ngày nhận đăng: 23.11.2016

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, sâm Bồ chính *in vitro* được sử dụng như nguồn vật liệu nhằm bước đầu nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực (trên máy clinostat 2D) lên khả năng nảy mầm, nhân chồi, sinh trưởng phát triển và tích lũy hợp chất ở loài cây dược liệu tại Việt Nam. Các hạt sâm Bồ chính sau khi được khử trùng, được cấy vào các đĩa petri có chứa môi trường MS bổ sung 10 g/l agar, 30 g sucrose (9 hạt/đĩa, hạt cách hạt 1,5 cm và cùng hướng với nhau), sau đó được đặt trong máy clinostat với tốc độ quay 2 rpm. Sau 3 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy, điều kiện mô phỏng không trọng lực làm giảm khả năng sinh trưởng, phát triển của rễ mầm sâm Bồ chính (chiều dài rễ: 11,83 cm, khối lượng tươi: 58,28 mg, khối lượng khô: 5,23 mg) nhưng lại làm tăng khả năng nảy mầm (87%) và tích lũy hợp chất (saponin toàn phần: 53 mg/g, coumarin toàn phần: 25,67 mg/g). Điều kiện mô phỏng không trọng lực còn làm tăng khả năng nhân chồi (chiều cao chồi: 3,07 cm, 6,33 đốt, 3,33 chồi, khối lượng tươi: 401,33 mg, khối lượng khô: 37,00 mg) và sinh trưởng, phát triển của chồi sâm Bồ chính (chiều cao cây: 12,17 cm, 5,67 lá, chiều dài rễ: 1,77 cm, khối lượng tươi: 419,00 mg, khối lượng khô: 36,00 mg) sau 4 tuần nuôi cấy. Kết quả này mở ra một hướng đi mới trong việc nâng cao hiệu quả nhân giống và khả năng tích lũy hợp chất ở thực vật.

Từ khóa: clinostat, mô phỏng không trọng lực, nảy mầm, sinh trưởng, phát triển

MỞ ĐẦU

Tất cả các sinh vật trên trái đất đều chịu tác động theo trọng lực. Do đó, ở sinh vật nói chung và thực vật nói riêng đã sử dụng trọng lực trong việc điều chỉnh sự sinh trưởng và phát triển. Cây trồng sẽ phản ứng như thế nào nếu không có trọng lực? Một số nghiên cứu về ảnh hưởng của điều kiện không trọng lực lên cây đã được thực hiện trong điều kiện không trọng lực thực ở không gian như Merkys và Laurinavicius (1983), Kiss và đồng tác giả (1998) trên đối tượng *Arabidopsis thaliana*; Musgrave và đồng tác giả (1997) trên đối tượng *Brassica rapa*... nhằm tìm ra khả năng đáp ứng của cây trồng với điều kiện không trọng lực. Tuy nhiên, để thực hiện các nghiên cứu này gặp nhiều khó khăn do chi phí cao, khó tiếp cận với không gian. Clinostat 2D ra đời được miêu tả bởi Sachs (1879) là một thiết bị mô phỏng điều kiện không trọng lực, thiết bị này thay thế cho những tác động của trọng lực đối với sự sinh

trưởng và phát triển ở thực vật cũng như ở trên động vật. Các nghiên cứu trên thực vật đã cho thấy rằng, khi cây trồng phát triển trong điều kiện không trọng lực có hình thái, sinh trưởng, phát triển và sự trao đổi chất thay đổi (Krikorian, Steward, 1978; Cowles *et al.*, 1984; Kasahara *et al.*, 1994; Briarty *et al.*, 1995; Hoson *et al.*, 1997; Porterfield *et al.*, 1997; Kiss *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999, Pedroso, Durzan, 2000; Musgrave *et al.*, 2000). Do đó, nghiên cứu về không trọng lực là hướng đi mới trong việc nâng cao hiệu quả nhân giống.

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực trên Clinostat 2D (2 rpm) đã được nghiên cứu trên đối tượng cây sâm Bồ chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz.) một loài cây dược liệu được trồng phổ biến tại Việt Nam, nhằm bước đầu tìm hiểu khả năng áp dụng điều kiện mô phỏng không trọng lực trong việc nâng cao hiệu quả nhân giống, thay đổi về hình thái cũng như tích

lũy hợp chất thứ cấp trong điều kiện mô phỏng không trọng lực.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt giống cây sâm Bồ chính hoa đỏ (*Hibiscus sagittifolius* Kurz.) kích thước đồng đều (khử trùng trong HgCl₂ 0,1% với thời gian 5 phút), đốt thân (0,5 cm) và chồi (1 cm) sâm Bồ chính có nguồn gốc *in vitro* được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường MS được sử dụng làm nguồn mẫu cấy cho các thí nghiệm.

Môi trường thí nghiệm

Môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) bổ sung 30 g/l sucrose, 10 g/l agar. Các chất điều hòa sinh trưởng được bổ sung vào môi trường với loại và nồng độ thích hợp tùy vào mục đích thí nghiệm khác nhau trước khi điều chỉnh pH về 5,8. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút.

Phương pháp

Định tính và định lượng hợp chất coumarin và saponin toàn phần

Định tính và định lượng coumarin toàn phần

Bột rễ mầm sâm Bồ chính (1 g) chiết soxlet với ether. Dịch chiết cất thu hồi dung môi đến dịch đặc. Kiểm hóa bằng NaOH 10%. Loại tạp bằng ether dầu. Dịch kèm acid hóa bằng dung dịch HCl 10% đến pH = 2. Dịch acid lắc với ether. Tập trung dịch chiết ether, cất thu hồi dung môi đến gần khô rồi sấy khô ở 45-50°C. Thu được coumarin toàn phần (Dong, 2006).

Cần coumarin toàn phần được hòa tan trong methanol và triển khai trên hệ dung môi cloroform:ethyl acetat:acid formic (5:4:1) trong sắc ký lớp mỏng (TLC), sau đó sử dụng hơi ammoniac để phát hiện coumarin dưới đèn UV.

Cần cần, xác định hàm lượng coumarin toàn phần.

Định tính và định lượng saponin toàn phần

Bột rễ mầm sâm Bồ chính (1 g) chiết siêu âm với methanol (MeOH). Lọc và cô lọc đến cần. Hòa cần với nước và dietyleter, lắc đều loại dietyleter. Dịch nước được tiếp tục lắc với n-BuOH bão hòa, đem cô cách thủy dịch n-BuOH đến cần. Thu được saponin toàn phần (Namba *et al.*, 1974).

Cần saponin toàn phần được hòa tan trong methanol và khai triển trên hệ dung môi n-butanol:ethanol (8:2) sau đó bản silicagel được phun thuốc thử H₂SO₄ (10%) trong cồn để khô, quan sát vết hiện màu hồng tím xác định sự hiện diện của saponin.

Cần cần, xác định hàm lượng saponin toàn phần.

Xác định hàm lượng chlorophyll

Hàm lượng chlorophyll a và b được đánh giá bằng phương pháp phân tích quang phổ hấp phụ của dịch chiết lá trong dung dịch acetone bằng máy đo quang phổ UV-2900 Hitachi, Nhật Bản). Độ hấp phụ (OD) được đo ở bước sóng 662 và 645 nm (Lichtentaler, Wellburn, 1985).

Giải phẫu hình thái thực vật

Hình thái rễ được quan sát bằng cách cắt mỏng dọc theo chiều dài của rễ và tiến hành nhuộm với thuốc nhuộm 2 màu Iodine-carmin (Merk KGA-Germany) như sau: mẫu sau khi giải phẫu được ngâm trong Javel 10% khoảng 15 phút. Mẫu được tiếp tục rửa sạch bằng nước cất vô trùng và ngâm khoảng 15 phút trong dung dịch acid acetic 45% để cố định mẫu. Sau đó, lấy mẫu ra và rửa sạch bằng nước cất cho đến khi mất mùi acid và ngâm vào thuốc nhuộm 5 phút. Cuối cùng, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng, đặt mẫu lên lamên, đặt lam kính và tiến hành quan sát, chụp ảnh dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại ×10.

Bố trí thí nghiệm

Khảo sát khả năng nảy mầm, sinh trưởng phát triển, tích lũy hợp chất thứ cấp của hạt cây sâm Bồ chính in vitro dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực

Các hạt sâm Bồ chính sau khi được khử trùng, được đặt trong các đĩa petri chứa 25 ml môi trường MS bổ sung 10 g/l agar, 30 g sucrose với 9 hạt/đĩa, các hạt được đặt trên các điểm cách đều nhau trên mặt thạch (1,5 cm) và cùng hướng với nhau, sau đó được đặt trong máy clinostat với tốc độ quay 2 rpm. Sau 1, 2, 3 tuần tiến hành quan sát hình thái rễ và ghi nhận các chỉ tiêu: tỷ lệ nảy mầm (%), chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg). Hàm lượng coumarin và saponin toàn phần (mg) được tách chiết sau 3 tuần.

Khảo sát ảnh hưởng của cytokinin (BA, KIN, TDZ) tới khả năng nhân chồi từ đốt thân cây sâm Bồ chính in vitro

Các đốt thân sâm Bồ chính *in vitro* khoảng 0,5 cm được cấy vào môi trường MS bổ sung 10 g/l agar, 30 g

sucrose với pH = 5,8. BA (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l), KIN (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l) và TDZ (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l) được bổ sung riêng biệt vào môi trường nhằm tìm ra môi trường nhân chồi tốt nhất cho nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực lên khả năng nhân chồi từ đốt thân cây sâm Bồ chính *in vitro*. Sau 4 tuần nuôi cấy ghi nhận các chỉ tiêu: Số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số đốt/mẫu, khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg).

Khảo sát sự khả năng nhân chồi của đốt thân sâm Bồ chính *in vitro* dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực

Các đốt thân sâm Bồ chính *in vitro* khoảng 0,5 cm được cấy vào các ống nghiệm (12 x 120 mm) có chứa 5 ml môi trường tốt nhất sau khi khảo sát ảnh hưởng của cytokinin tới khả năng nhân chồi từ đốt thân cây sâm Bồ chính *in vitro*. Sau đó được quay trên clinostat với tốc độ quay 2 rpm. Sau 4 tuần nuôi cấy ghi nhận các chỉ tiêu: chiều cao chồi (cm), số đốt, số chồi, khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg).

Khảo sát ảnh hưởng của auxin (NAA, IBA, IAA) tới khả năng sinh trưởng của chồi cây sâm Bồ chính *in vitro*

Các chồi sâm Bồ chính *in vitro* khoảng 1 cm được cấy vào môi trường MS bổ sung 10 g/l agar, 30 g sucrose với pH = 5,8. NAA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l), IBA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) và IAA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) được bổ sung riêng biệt vào môi trường nhằm tìm ra môi trường thích hợp nhất cho nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực lên khả năng sinh trưởng phát triển của chồi cây sâm Bồ chính. Sau 4 tuần nuôi cấy ghi nhận các chỉ tiêu: Chiều cao cây (cm), số lá, số rễ, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg).

Khảo sát khả năng sinh trưởng của chồi sâm Bồ chính *in vitro* dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực

Các chồi sâm Bồ chính *in vitro* khoảng 1 cm được cấy vào các ống nghiệm (12 x 120 mm) có chứa 5 ml môi trường tốt nhất sau khi khảo sát ảnh hưởng của auxin tới khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi sâm Bồ chính *in vitro*. Sau đó được quay trên clinostat với tốc độ quay 2 rpm. Tiến hành theo dõi và thu số liệu sau 4 tuần với các chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây (cm), số lá, số rễ, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), hàm lượng chlorophyll a, b ($\mu\text{g/g}$) và hàm lượng chlorophyll tổng (a + b) ($\mu\text{g/g}$) trong lá.

Điều kiện thí nghiệm

Mẫu được nuôi cấy dưới đèn huỳnh quang với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 40 - 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 55 - 60%.

Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0 theo phép thử Duncan và phương pháp LSD ($\alpha=0,05$) (Duncan, 1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực tới khả năng nảy mầm, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hợp chất thứ cấp của hạt cây sâm Bồ chính *in vitro*

Sau 3 tuần gieo hạt, khả năng nảy mầm của các hạt sâm Bồ chính trong điều kiện mô phỏng không trọng lực và điều kiện đối chứng (trọng lực thực) có sự khác biệt đáng kể, thể hiện rõ qua các chỉ tiêu theo dõi về tỷ lệ nảy mầm, chiều dài rễ mầm, sự tăng trưởng của rễ và hình thái rễ (Hình 1).

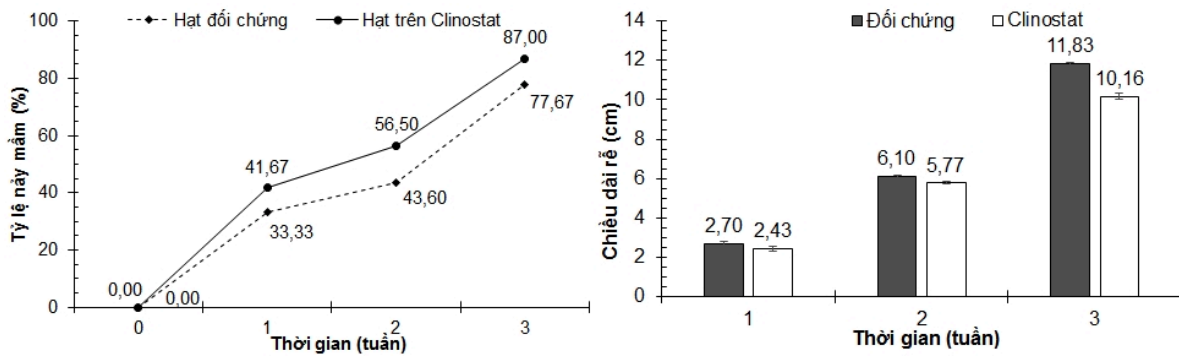
Kết quả cho thấy hạt bắt đầu phá vỡ miền trạng sau 3 ngày gieo hạt. Sau 1 tuần gieo hạt, tỷ lệ nảy mầm của hạt trên điều kiện mô phỏng không trọng lực đạt 41,67% cao hơn so với đối chứng (33,33%). Sự chênh lệch về khả năng nảy mầm tiếp tục gia tăng sau 2 tuần gieo hạt, hạt nảy mầm trên Clinostat cao hơn gấp 1,3 lần so với đối chứng (56,5%; 43,6%). Sau 3 tuần, các hạt sâm Bồ chính ở cả hai nghiệm thức đều nảy mầm với tỷ lệ nảy mầm của hạt trên Clinostat (87,00%) cao hơn đối chứng (77,67%).

Không những vậy, điều kiện mô phỏng cũng ảnh hưởng mạnh tới khả năng phát triển rễ mầm sâm Bồ chính (Hình 1). Sau tuần nuôi cấy đầu tiên, trên Clinostat chiều dài trung bình rễ thấp hơn so với đối chứng ($2,43 \pm 0,12$ cm và $2,70 \pm 0,10$ cm, tương ứng). Sự chênh lệch tỷ lệ nảy mầm thể hiện rõ hơn sau 2 tuần gieo hạt với chiều dài rễ trên nghiệm thức đối chứng ($6,10 \pm 0,10$ cm) và trên Clinostat ($5,77 \pm 0,06$ cm). Sau 3 tuần nuôi cấy, chiều dài rễ trên cả hai nghiệm thức Clinostat và đối chứng đều tăng gấp 4,1 và 4,4 lần. Sự chênh lệch về chiều dài rễ của nghiệm thức đối chứng và trên Clinostat rõ ràng hơn đạt $11,83 \pm 0,06$ cm và $10,16 \pm 0,15$ cm.

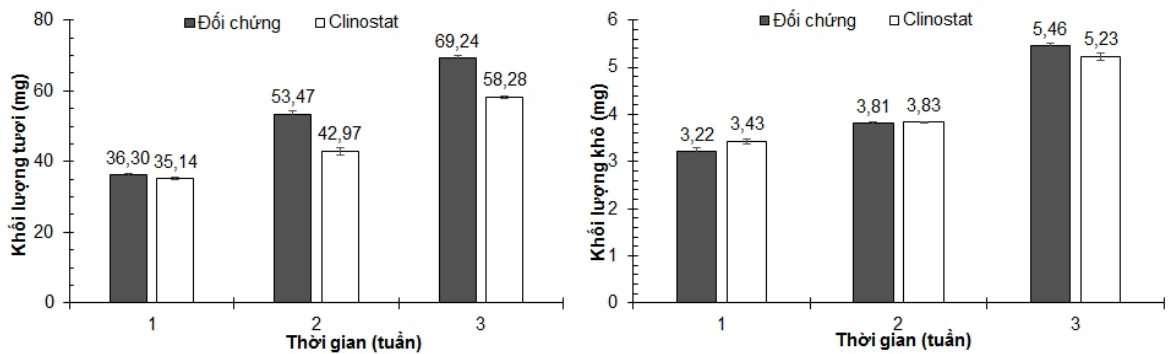
Sự thay đổi về khả năng tăng trưởng của rễ mầm sâm Bồ chính trong điều kiện mô phỏng không trọng lực cũng được ghi nhận (Hình 2). Ở nghiệm thức trên Clinostat, khối lượng tươi ở tuần thứ 2

(42,97±1,10 mg) và ở tuần 3 (58,28±0,36 mg) cao hơn gấp 1,22 lần và cao hơn 1,66 lần so với tuần thứ nhất (35,14±0,28 mg). Trong khi trên thí nghiệm đối chứng, khối lượng tươi ở tuần thứ 2 (53,47±0,87 mg) cao hơn 1,47 lần và tuần 3 (69,24±0,77 mg) cao hơn 1,91 lần so với khối lượng tươi ở tuần thứ nhất (36,30±0,41 mg). Khối lượng khô thu được ở rễ mầm sâm Bồ chính trên Clinostat tăng 1,11 lần và 1,52 lần ở tuần thứ 2 (3,83±0,01 mg) và ở tuần thứ 3

(5,23±0,08 mg) lần lượt so với tuần thứ nhất (3,43±0,06 mg). Tương tự, ở thí nghiệm đối chứng, khối lượng khô tăng 1,19 lần ở tuần thứ 2 (3,81±0,02 mg) và 1,66 lần ở tuần thứ 3 (5,46±0,05 mg) so với tuần thứ nhất (3,22±0,07 mg). Như vậy, điều kiện mô phỏng không trọng lực làm gia tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt, tuy nhiên lại làm giảm khả năng sinh trưởng và phát triển (chiều dài, khối lượng tươi, khối lượng khô) của rễ mầm sâm Bồ chính.



Hình 1. Tỷ lệ nảy mầm và chiều dài rễ mầm sâm Bồ chính *in vitro* dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực và đối chứng qua 3 tuần gieo hạt. TB±SE, n=3.



Hình 2. Ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực lên sự tăng trưởng của rễ mầm sâm Bồ chính *in vitro*. TB±SE, n=3.

Các hình thái rễ được ghi nhận (Hình 3c₁, c₂) cũng thể hiện sự khác biệt về hình thái rễ bất thường sau 1 tuần gieo hạt. Giải phẫu hình thái rễ cũng cho thấy vùng mô phân sinh và chóp rễ ở nghiệm thức đối chứng bắt màu hồng tím đậm sau khi nhuộm bằng carmin chứng tỏ đây là vùng chứa nhiều tế bào mô phân sinh, bắt màu thuốc nhuộm ít hơn màu nhạt hơn khi quan sát trên rễ phát triển trên Clinostat. Kết quả giải phẫu hình thái rễ sau 3 tuần nuôi cấy đã cho thấy một vài sự khác biệt (Hình 3d₂) rễ phát triển theo nhiều hướng thay vì phát triển theo hướng trọng lực (Hình 3d₁, Hình 3e₂) xuất hiện nhiều rễ thứ cấp

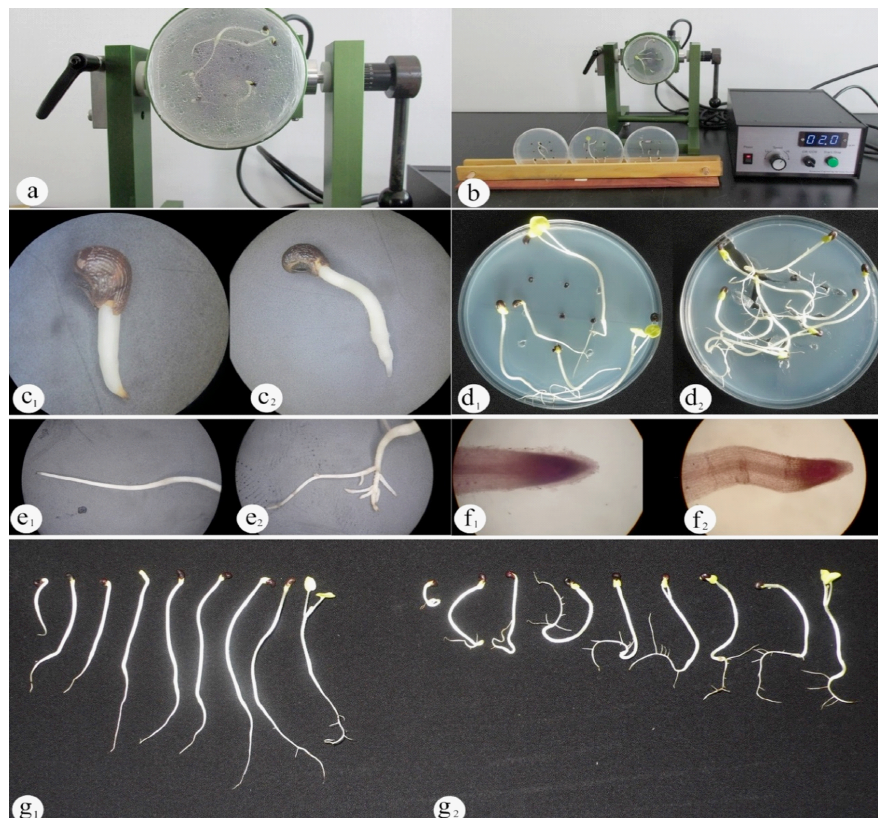
trong khi rễ thứ cấp không xuất hiện hoặc xuất hiện ít ở thí nghiệm đối chứng (Hình 4e₁). Hình 4g₁, g₂ thể hiện rõ sự khác biệt này rễ bị uốn cong xuất hiện nhiều rễ thứ cấp khi nảy mầm trên Clinostat khác biệt với đối chứng.

Saponin và coumarin là 2 hợp chất thứ cấp chính quyết định dược lý của loài dược liệu này (Hương *et al.*, 2005; Vui *et al.*, 2006). Kết quả định tính bằng phương pháp TLC cho thấy có sự hiện diện vết màu hồng của saponin tổng (Hình 4a) và vết phát quang dưới đèn UV₃₆₅ sau khi bản sắc ký được hấp thụ hơi

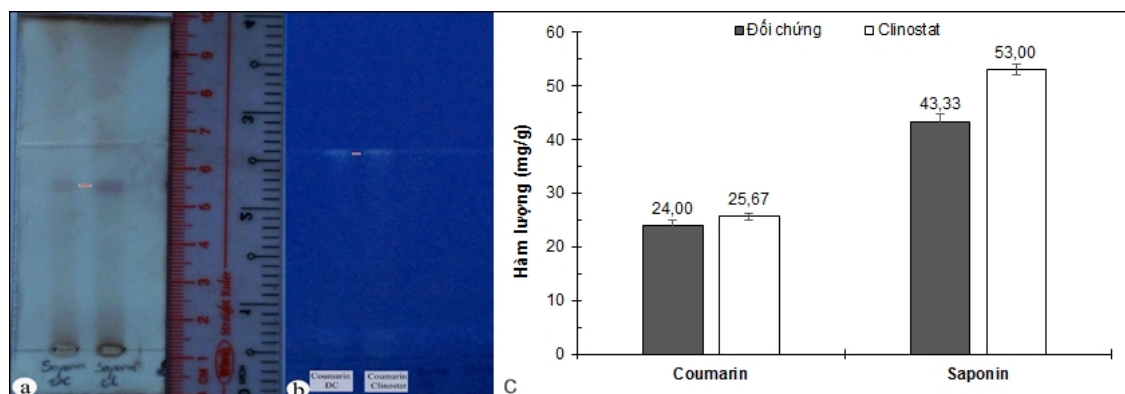
ammoniac của coumarin (Hình 4b) trên cả 2 điều kiện đối chứng và Clinostat.

Sau khi ly trích, cấn coumarin và saponin được cân để xác định khối lượng (Hình 4). Khối lượng saponin tổng trong rễ mầm sâm Bồ chính phát triển

trên Clinostat ($53,00 \pm 1,00$ mg/g) cao hơn trên đối chứng ($43,33 \pm 1,53$ mg/g). Tương tự, khối lượng coumarin ($25,67 \pm 0,58$ mg/g) trên rễ sâm Bồ chính trên Clinostat cũng cao hơn trên đối chứng ($24,00 \pm 1,00$ mg/g) (Hình 4c).



Hình 3. Hình thái trên rễ mầm sâm Bồ chính *in vitro* quan sát ở thí nghiệm mô phỏng không trọng lực trên Clinostat và đối chứng (1g). a, b. Thí nghiệm trên Clinostat; c₁, c₂. Rễ sau 1 tuần gieo; d₁, d₂, e₁, e₂, g₁, g₂. Rễ 3 tuần gieo; f₁, f₂. Hình thái giải phẫu rễ sau 3 tuần. Ở các hình c₁, c₂, d₁, d₂, e₁, e₂, f₁, f₂, g₁, g₂ bên phải: thí nghiệm mô phỏng không trọng lực, bên trái: đối chứng.



Hình 4. Định tính và định lượng saponin, coumarin trên rễ mầm sâm Bồ chính *in vitro* đặt trong điều kiện trọng lực trái đất và mô phỏng không trọng lực trên Clinostat: a. định tính saponin; b. định tính coumarin; c. định lượng saponin và coumarin

Điều kiện mô phỏng không trọng lực có tác động ức chế sự sinh trưởng, phát triển của rễ qua các tuần gieo hạt, các chỉ tiêu về khối lượng và chiều dài rễ đều thấp hơn so với điều kiện đối chứng; kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Howard và William (2005) trên hạt Đậu nành và nghiên cứu của Hensel và Sievers (1980) trên cây *Lepidium sativum* trong hai điều kiện tương tự. Khối lượng của cây thấp hơn là do hệ quả của 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 hiệu khí, ion hấp thu có thể giảm nồng độ ion xung quanh rễ (Porterfield, 2002). Bên cạnh đó, quá trình bốc hơi nước trên bề mặt đĩa petri do sự tăng nhiệt độ diễn ra trong lá cây cũng có ảnh hưởng đáng kể đến sự sinh trưởng của cây. Theo Kitaya và cộng sự (2003) khi lực hút trái đất giảm 1g đến 0,01g trong 20 giây nhiệt độ của lá khoai lang và lúa mạch tăng 1°C, nhiệt độ của lá tăng là do sự thoát hơi nước giảm mà bản chất là do sự giảm nhiệt độ đối lưu được gây ra bởi sự giảm trọng lực. Mặt khác, nghiên cứu của Veronica (2006) khi quan sát hình thái nảy mầm của rễ phát triển từ hạt đậu nành cũng nhận thấy sự khác biệt đáng kể ở rễ sinh trưởng trong điều kiện mô phỏng không trọng lực so với điều kiện đối chứng. Rễ và chồi bị mất phương hướng do ảnh hưởng của không trọng lực (Hensel, Sievers, 1980; Legué *et al.*, 1992). Các rễ được uốn cong tự nhiên khi phát triển trên điều kiện mô phỏng không trọng lực, các hình thái này không thể hiện hoặc thể hiện ít khi rễ phát triển ở điều kiện trọng lực trái đất (Hensel, Sievers, 1980; Legué *et al.*, 1992; Aarouf *et al.*, 1999; Perbal *et al.*, 1987).

Ảnh hưởng của cytokinin (BA, KIN, TDZ) lên khả năng nhân chồi từ đốt thân cây sâm Bồ chính *in vitro*

Cytokinin là chất điều hòa sinh trưởng thực vật tác động đến sự phân chia tế bào, gây ảnh hưởng đến đỉnh sinh trưởng, sự phân chia chồi nách, lá và sự già hóa (Kieber, 2002). Trong thí nghiệm này, khả năng nhân nhanh chồi từ đốt thân cây sâm Bồ chính được thực hiện trên môi trường MS bổ sung các cytokinin thông dụng như BA, KIN và TDZ ở các nồng độ khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 1.

Ở nghiệm thức bổ sung BA ở nồng độ 0,6 mg/l cho hiệu quả tăng sinh chồi tốt nhất (11,00 chồi/mẫu) và số đốt/mẫu cũng đạt cao nhất (17,67 đốt/mẫu). Số đốt/mẫu tăng khi nồng độ BA tăng từ 0 - 0,4 mg/l và giảm dần ở nồng độ 0,8 - 1 mg/l, cụm

chồi trên môi trường bổ sung 0,6 mg/l BA có khối lượng tươi 995,33 mg và khối lượng khô 67,33 mg thấp hơn so với nghiệm thức chứa 1 mg/l BA tương ứng là 1410,40 mg và 115,33 mg, tuy nhiên điều này là do mẫu cây trên môi trường có 1 mg/l BA phát sinh nhiều mô sẹo xốp. Về chỉ tiêu chiều cao cây và chiều dài đốt đạt cao nhất ở nghiệm thức chứa 0,2 mg/l BA. Ở nghiệm thức này các chỉ tiêu về số đốt/mẫu, số chồi/mẫu, khối lượng tươi và khối lượng khô là thấp hơn so với các nghiệm thức khác có bổ sung BA.

BA là cytokinin được sử dụng nhiều nhất trong quá trình nhân nhanh chồi ở các loài thực vật nuôi cấy mô. Posada và cộng sự (1999) cho rằng nồng độ BA từ 0,1 - 3,0 mg/l đáp ứng nhân nhanh chồi tốt nhất ở các cây vi nhân giống. Số lượng chồi và số đốt là chỉ tiêu quan trọng trong vi nhân giống. Số chồi cao có ý nghĩa quan trọng trong việc cung cấp lượng lớn chồi cho nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh. Nếu hệ số nhân chồi cao thì số lượng cây giống tạo ra trong một lần cấy chuyên cao sẽ nâng cao hiệu quả nhân giống. Trên môi trường bổ sung KIN (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/l) và TDZ (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l), hầu hết các mẫu không gia tăng số lượng chồi (Bảng 1). Ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung cytokinin) nhận thấy có sự ra rễ trên chồi sâm Bồ chính.

Nồng độ 0,6 mg/l BA trong thí nghiệm này cho chỉ tiêu số đốt/mẫu, số chồi/mẫu đạt cao nhất. Do đó, đây là nồng độ thích hợp nhất cho hệ số vi nhân giống cao trên cây sâm Bồ chính hoa đỏ.

Trên đối tượng sâm Bồ chính, Hiệp và đồng tác giả (2014) đã khảo sát ảnh hưởng của BA, nước dừa, GA₃ lên khả năng nhân chồi ở 3 giống sâm Bồ chính có hoa màu vàng, đỏ và hồng, kết quả cho thấy môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA, 10% nước dừa, 0,2 mg/l GA₃ cho hiệu quả nhân chồi cao nhất với 4,5 chồi/mẫu thấp hơn trong thí nghiệm này môi trường MS bổ sung 0,6 BA đạt 11,00 chồi/mẫu. Kết quả này trái ngược với kết quả nghiên cứu của Renu và Anwar (2008) trên cây *Abelmoschus moschatus* cho rằng 0,01 mg/l TDZ là thích hợp cho cảm ứng phát sinh chồi và sự kết hợp 0,25 mg/l BA và 0,5 KIN là thích hợp nhất cho sự nhân chồi. Tuy nhiên, nghiên cứu của Peng và cộng sự (2010) trên cây *Hibiscus cannabinus* cũng ghi nhận BA là cytokinin thích hợp cho sự nhân nhanh chồi. Như vậy, trong số các nồng độ được khảo sát, BA ở nồng độ 0,6 mg/l là thích hợp nhất cho quá trình nhân nhanh chồi ở loài cây này.

Bảng 1. Ảnh hưởng của cytokinin (BA, KIN, TDZ) lên khả năng nhân chồi từ đốt thân cây sâm Bồ chính *in vitro*. *Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Cytokinin (mg/l)			Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/mẫu	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
BA	KIN	TDZ					
0	-	-	1,00e	4,67c*	6,33d	275,67de	22,00fgh
0,2	-	-	1,00e	8,67a	9,33c	463,00c	36,33cd
0,4	-	-	8,00b	5,17c	11,00b	400,00c	28,33def
0,6	-	-	11,00a	6,17b	17,67a	995,33b	67,33b
0,8	-	-	6,00c	3,00de	7,33d	459,00c	41,00c
1	-	-	1,67e	2,6def	2,00f	1410,40a	115,33a
-	0,2	-	2,67d	2,00fg	2,33f	449,67c	30,67de
-	0,4	-	1,33e	1,77fg	1,67f	269,33de	19,67ghi
-	0,6	-	1,00e	1,70fg	1,33f	249,33de	17,67ghi
-	0,8	-	1,00e	1,77fg	1,33f	199,00e	15,67ghi
-	1	-	1,00e	1,40g	1,33f	155,00e	12,67i
-	-	0,1	1,67e	3,50d	3,67e	403,33c	24,00efg
-	-	0,2	1,33e	2,17efg	1,33f	268,00de	18,67ghi
-	-	0,3	1,00e	2,50ef	2,00f	342,00cd	20,00ghi
-	-	0,4	1,00e	1,67fg	1,33f	170,00e	14,00hi
-	-	0,5	1,00e	1,40g	1,00f	170,00e	15,67ghi

Khả năng nhân chồi của đốt thân sâm Bồ chính *in vitro* trong điều kiện không trọng lực

Sau 4 tuần nuôi cấy, đốt thân sâm Bồ chính trên môi trường nhân chồi được đặt ở 2 nghiệm thức đối chứng và Clinostat. Kết quả thu nhận được thể hiện ở hình 5 và hình 6.

Kết quả cho thấy, các đốt thân sâm Bồ chính nuôi cấy ở điều kiện mô phỏng không trọng lực trên Clinostat có chiều cao chồi ($3,07 \pm 0,21$ cm), số đốt ($6,33 \pm 0,58$), số chồi ($3,33 \pm 0,58$), khối lượng tươi ($401,33 \pm 53,27$ mg/mẫu), khối lượng khô ($37,00 \pm 5,20$ mg/mẫu) cao hơn trên nghiệm thức đối chứng. Điều này chứng tỏ môi trường mô phỏng không trọng lực tác động tích cực lên khả năng sinh trưởng nhân chồi trên cây sâm Bồ chính. Sự gia tăng chiều cao cây cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu Aarrouf và cộng sự (1999), Driss-École và cộng sự (1994) trên cây *Veronica arvensis*. Trong thí nghiệm này, cũng ghi nhận sự xuất hiện của hơi nước trên nắp ống nghiệm, điều này có thể là do sự giảm lực hút trái

đất dẫn đến nhiệt độ lá tăng lên để giảm nhiệt độ đối lưu (Kitaya *et al.*, 2003).

Ảnh hưởng của auxin (NAA, IAA, IBA) lên khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi cây sâm Bồ chính *in vitro*

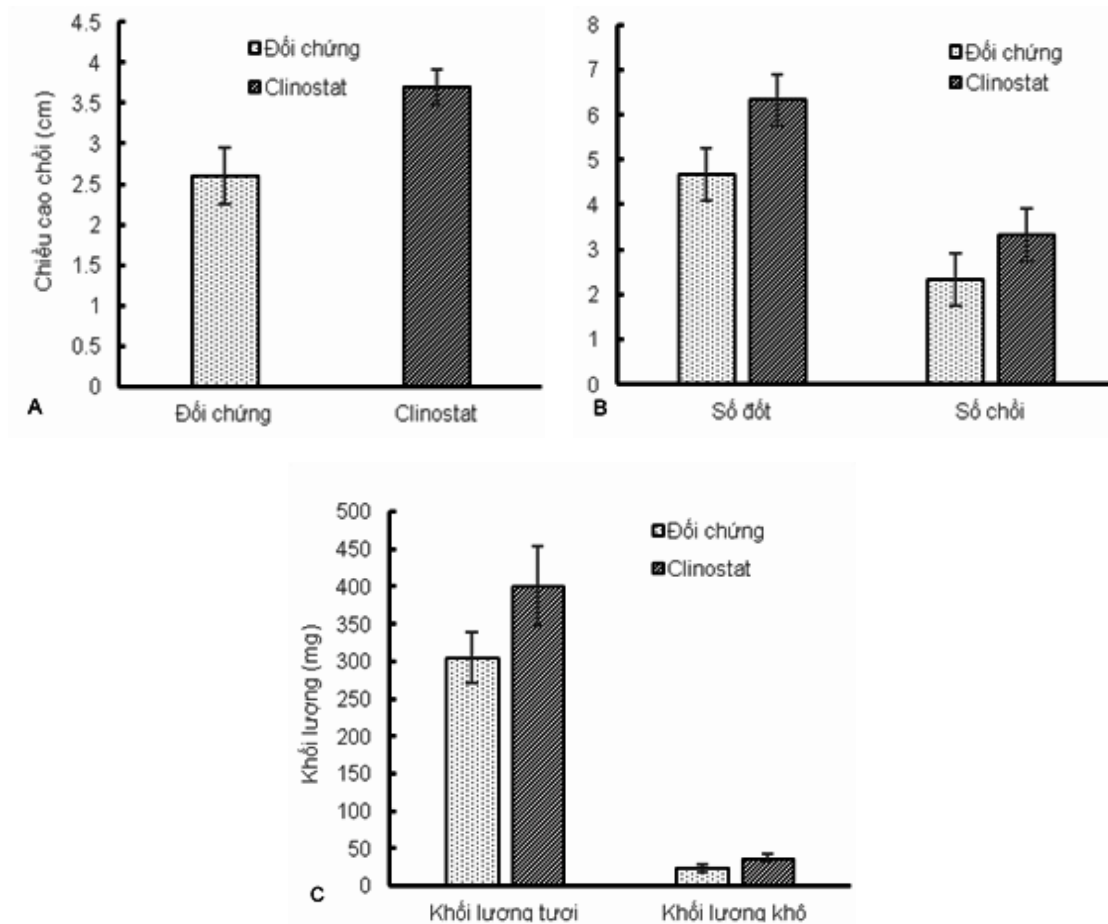
Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu đánh giá ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin lên khả năng ra rễ của chồi sâm Bồ chính *in vitro* được trình bày ở bảng 2. Kết quả thu được cho thấy, các auxin khác nhau, ở nồng độ khác nhau có ảnh hưởng khác nhau lên sự sinh trưởng phát triển của chồi sâm Bồ chính *in vitro* (Bảng 2). Tất cả các loại auxin được sử dụng đều có khả năng kích thích ra rễ từ chồi sâm Bồ chính. Rễ hình thành nhiều nhất ở nghiệm thức bổ sung 1 mg/l NAA (7,33 rễ) cao hơn 3,1 lần so với nghiệm thức đối chứng (2,33 rễ) không bổ sung auxin. Ở nồng độ này, khối lượng tươi và khối lượng khô cũng cao hơn hẳn so với các nghiệm thức còn lại tương ứng đạt 637,67 và 53,67 mg. Số lá cao nhất ở nồng độ 1 mg/l IAA (đạt 7,67) song chiều cao cây lại cao nhất ở nghiệm thức 1 mg/l IBA (12,67cm). Tuy chiều dài rễ ở

thực nghiệm bổ sung 2 mg/l IAA là dài nhất nhưng các chỉ tiêu sinh trưởng khác ở nghiệm thức này không cao, cây kém phát triển (Bảng 2).

Khi đánh giá hiệu quả của NAA lên khả năng sinh trưởng và phát triển có thể thấy rằng, nồng độ 1 mg/l NAA cho các chỉ tiêu theo dõi gồm chiều cao cây, số lượng rễ, khối lượng tươi và khối lượng khô đạt cao nhất. Kết quả nghiên cứu cho thấy, NAA có hiệu quả hơn IAA và IBA trong việc kích thích khả năng sinh trưởng và phát triển trên chồi sâm Bồ chính. Hiện nay, nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của từng loại auxin riêng biệt lên các đối tượng thực vật đã được khảo sát. Trên đối tượng sâm Bồ chính, Hiệp và đồng tác giả (2014) đã khảo sát ảnh hưởng của IBA kết hợp với NAA lên khả

năng sinh trưởng và phát triển của chồi sâm Bồ chính và cho thấy rằng 0,5 mg/l IBA kết hợp với 0,5 mg/l NAA cho khả năng sinh trưởng phát triển tốt nhất, tuy nhiên, các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển đều thấp hơn trong nghiên cứu này khi bổ sung 1,0 mg/l NAA. Theo Renu và Anwar (2008) trên *Abelmoschus moschatus* cho rằng môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/l IBA là thích hợp nhất cho quá trình cảm ứng rễ, tuy nhiên tỷ lệ hình thành rễ chỉ đạt 70%. IAA lại được cho là hiệu quả hơn NAA trong cảm ứng ra rễ ở cây *Hibiscus cannabinus* (Peng *et al.*, 2010).

Như vậy, trong thí nghiệm này 1,0 mg/l NAA là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng phát triển của chồi sâm Bồ chính.



Hình 5. Khả năng nhân chồi của đốt thân sâm Bồ chính *in vitro* trên Clinostat và đối chứng. a. Chiều cao chồi; b. Số rễ, số chồi; c. Khối lượng tươi, khối lượng khô; d. TB±SE, n=3.

Bảng 2. Ảnh hưởng của auxin (NAA, IAA, IBA) lên khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi sâm Bồ chính *in vitro*. *Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Auxin			Chiều cao cây (cm)	Số lá	Số rễ	Chiều dài rễ	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
NAA	IAA	IBA						
0	-	-	7,00de*	5,67bc	2,33e	1,77bc	207,00e	17,67cd
0,5	-	-	11,33abc	6,00bc	4,67bcd	1,90ab	405,33cd	30,67bc
1,0	-	-	12,17a	6,33ab	7,33a	1,53cdef	637,67a	53,67a
1,5	-	-	13,00a	4,67bc	3,67de	1,90ab	477,33ab	38,67b
2,0	-	-	4,17f	4,33c	2,33e	1,50cdef	261,33de	20,33cd
-	0,5	-	10,17bc	6,33ab	4,33cd	1,37f	300,67cde	25,33bcd
-	1,0	-	9,83c	7,67a	4,67bcd	1,00g	314,67cde	27,00bcd
-	1,5	-	11,67ab	6,00bc	6,00b	1,57cdef	408,67cd	30,00bc
-	2,0	-	3,50f	5,33bc	2,67e	2,00a	142,33e	11,67d
-	-	0,5	10,00bc	6,33ab	4,33cd	1,63cde	420,00cd	34,00cd
-	-	1,0	12,67a	5,67bc	5,66bc	1,73bcd	443,00cd	32,67bc
-	-	1,5	8,00d	5,67bc	3,67de	1,47ef	298,00cde	25,67bcd
-	-	2,0	6,17e	5,33bc	4,33cd	1,47ef	267,00de	22,00bcd

Ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực tới khả năng sinh trưởng, phát triển của chồi sâm Bồ chính *in vitro*

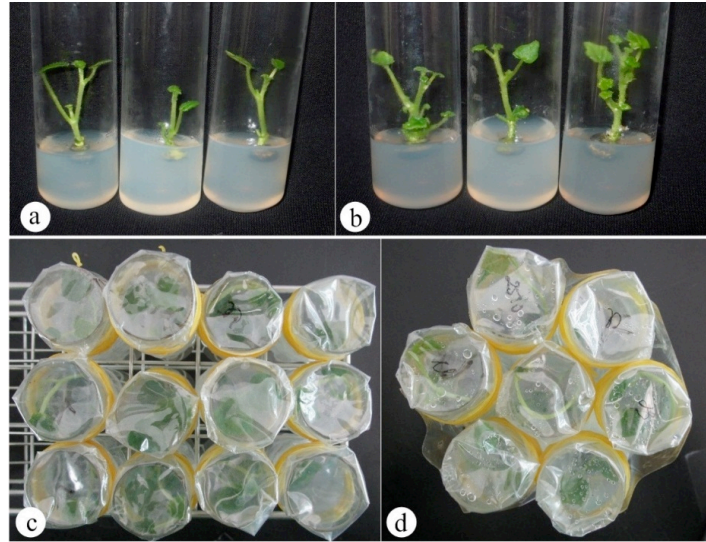
Sau 4 tuần nuôi cấy chồi sâm Bồ chính trên môi trường cho hiệu quả sinh trưởng phát triển kết quả được thể hiện ở hình 7 và hình 8.

Kết quả cho thấy, các chồi sâm Bồ chính nuôi cấy ở điều kiện mô phỏng không trọng lực trên Clinostat có chiều cao cây (12,17±1,04 cm), số lá (5,67±0,58), chiều dài rễ (1,77±0,25 cm), khối lượng tươi (419,00±15,87 mg/mẫu), khối lượng khô (36,00±2,00 mg/mẫu) đều cao hơn trên thí nghiệm đối chứng và không có sự khác biệt đáng kể về số rễ (9,00±2,00), hàm lượng chlorophyll, 82±6,66 µg/g), hàm lượng chlorophyll b (8,37±1,76 µg/g), hàm lượng chlorophyll a + b (30,19±8,41 µg/g) so với thí nghiệm đối chứng. Kết quả này tương tự với kết quả thu được trong các nghiên cứu của Aarouf và cộng sự (1999) trên cây *Brassica napus*, Driss-École và cộng sự (1994) trên cây *Veronica arvensis*. Trong điều

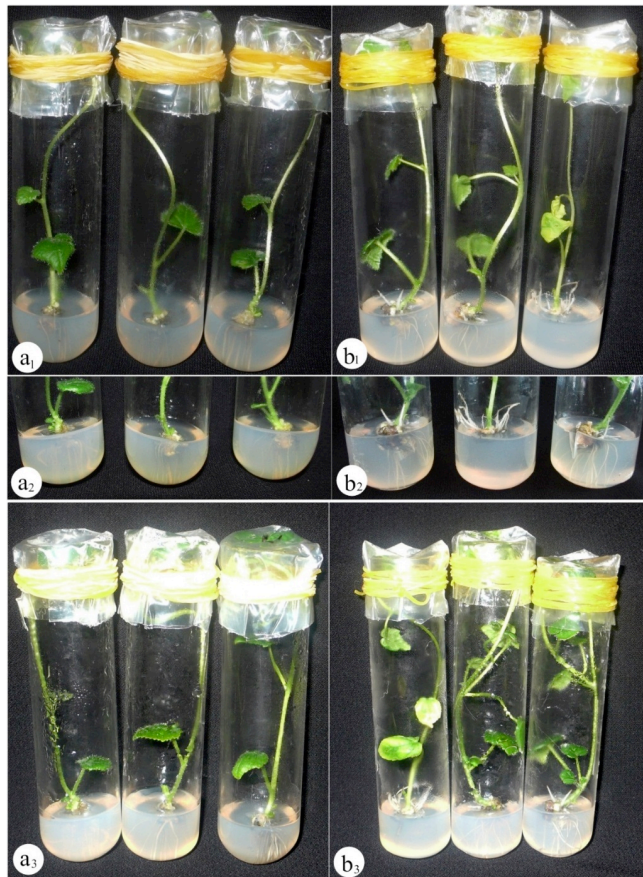
kiện mô phỏng không trọng lực, sự sinh trưởng của cây được gia tăng đáng kể.

Bên cạnh đó, khi quan sát trong quá trình hình thành rễ (Hình 7b₁, b₂) có thể nhận thấy rễ phát triển không theo hướng xác định. Sau 4 tuần nuôi cấy, cây sâm Bồ chính trên Clinostat còn xuất hiện sự hình thành chồi nách (Hình 6b) và hiện tượng vàng lá do tích sự tích lũy ethylene trong bình nuôi cấy (Leather *et al.*, 1972).

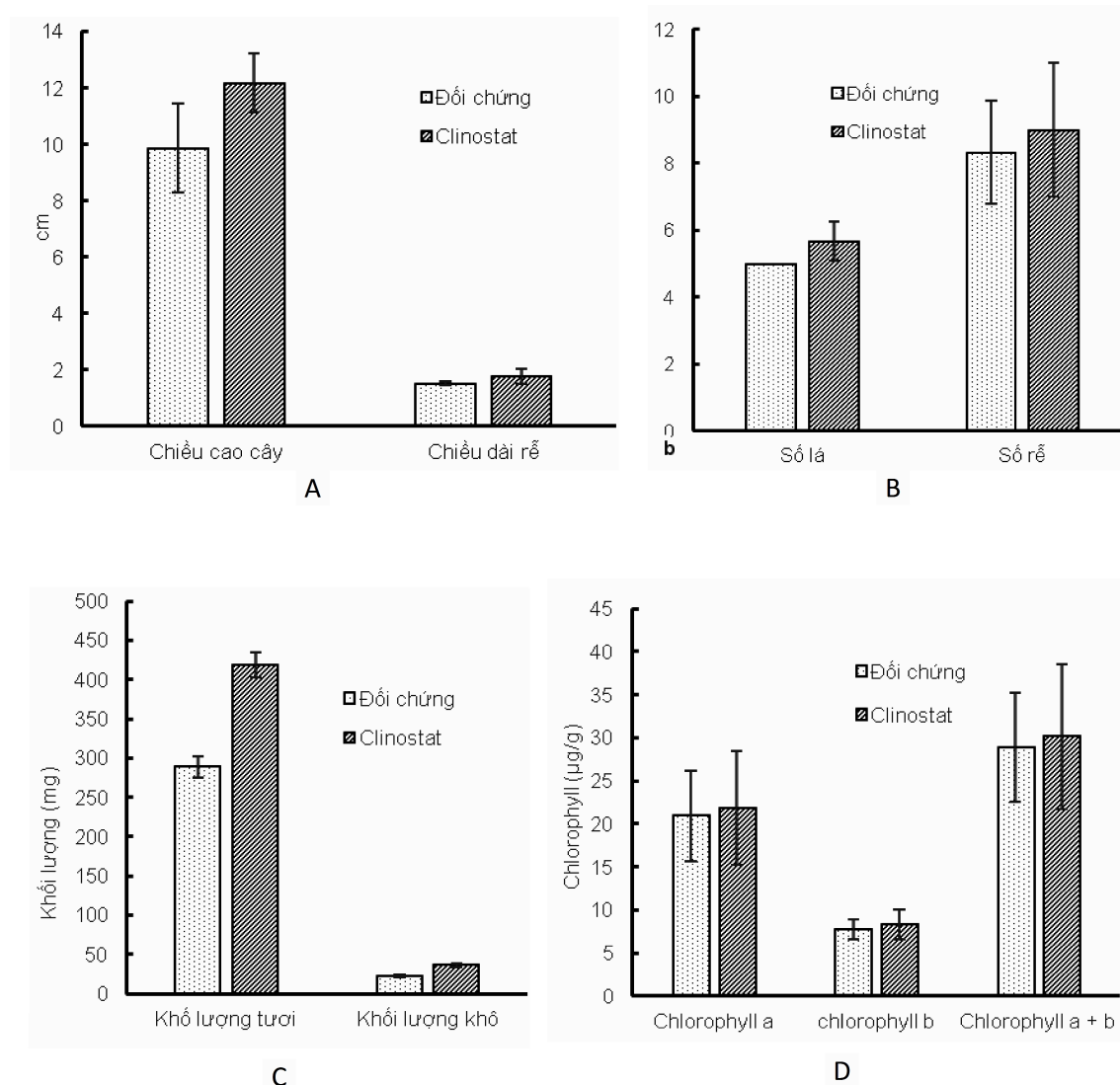
Kết quả tương tự như nghiên cứu Aarouf và cộng sự (1999) trên cây *Brassica napus* nuôi cấy dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực trên clinostat quan sát về hình thái cho thấy sự gia tăng về chiều dài thân so với đối chứng. Driss-École và cộng sự (1994) khi nghiên cứu sự thay đổi trọng lực trong Clinostat trên cây *Veronica arvensis* cũng nhận thấy có những thay đổi về sinh lý của cây điều này là do sự thay đổi trọng lực làm tăng tốc độ tăng trưởng và biệt hóa của các tế bào và sự già hóa của cây gây ra bởi sự tích lũy ethylene trong bình nuôi cấy (Kordyum, 1994; Leather *et al.*, 1972).



Hình 6. Khả năng nhân chồi của đốt thân sâm Bô chính *in vitro*. **a.** Chồi sâm Bô chính (đối chứng); **b.** Chồi sâm Bô chính trên thí nghiệm Clinostat; **c.** Không hơi nước (đối chứng); **d.** Hơi nước trên thí nghiệm Clinostat.



Hình 7. Ảnh hưởng của Auxin lên sự hình thành cây sâm Bô chính *in vitro* ở điều kiện mô phỏng không trọng lực. **a₁, a₂, b₁, b₂**. Cây sâm Bô chính sau 1 tháng; **a₃, b₃**. Cây sâm Bô chính sau 1,5 tháng. **a₁, a₂, a₃**. Cây sâm Bô chính đối chứng; **b₁, b₂**. Cây sâm Bô chính trên Clinostat.



Hình 8. Ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực tới khả năng sinh trưởng của chồi sâm Bó chính *in vitro*. TB \pm SE, n=3. **a.** Chiều cao cây, chiều dài rễ; **b.** Số lá, số rễ, **c.** Khối lượng; **d.** Chlorophyll.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, hệ thống mô phỏng điều kiện không trọng lực trên máy Clinostat 2D tỏ ra hiệu quả trong việc nâng cao năng nảy mầm của hạt và tích lũy hợp chất thứ cấp của rễ mầm sâm Bó chính. Không những vậy, điều kiện này còn làm tăng khả năng nhân chồi của đốt thân và sinh trưởng, phát triển của chồi sâm Bó chính nuôi cấy *in vitro*. Với những hiệu quả trên, điều kiện mô phỏng không trọng lực

hứa hẹn sẽ là hướng đi mới trong việc nghiên cứu nâng cao khả năng nhân giống và tích lũy hợp chất ở một số cây trồng có giá trị dược liệu và kinh tế cao.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên; Chương trình Khoa học và Công nghệ độc lập cấp nhà nước về Công nghệ vũ trụ năm 2014 – 2015, văn phòng chuyển giao công nghệ không gian Liên hợp quốc đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aarouf J, Schoëvaert D, Maldiney R, Perbal G (1999) Changes in hormonal balance and meristematic activity in primary root tips on the slowly rotating clinostat and their effect on the development of the rapeseed root system. *Physiol Plant* 105: 708-718.
- Briarty LG, Maher EP, Iversen TH (1995) *Growth, differentiation and development of Arabidopsis thaliana under microgravity conditions*. In Mattok C, ed. *Biorack on Spacelab IML-1*. European Space Agency, Noordwijk, The Netherlands.
- Cowles JR, Scheld HW, Lemay R, Peterson C (1984) Growth and lignification in seedlings exposed to eight of microgravity. *Ann Bot* 54: 33-48.
- Đào Thị Vui, Nguyễn Thượng Dong, Nguyễn Trọng Thông, Đặng Vũ Lương (2007) Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ rễ củ cây sâm Báo Thanh Hóa *Abelmoschus sagittifolius* Kurz. họ bông Malvaceae. *Tạp chí Dược học* 10(5): 135-138.
- Driss-École D, Cottignies A, Jeune B, Corbineau F, Rbal G (1994) Increased mass production of *Veronica arvensis* grown on a slowly rotating clinostat. *Environ Exp Bot* 34: 303-310.
- Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.
- Hensel W, Sievers A (1980) Effects of prolonged omnilateral gravistimulation on the ultrastructure of statocytes and on the graviresponse of roots. *Planta* 150: 338-346.
- Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M, Buchen B (1997) Evaluation of three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta* 203: 187-197.
- Howard GL, William CP (2005) Growth patterns for etiolated soybeans germinated under spaceflight conditions. *Adv Space Res* 36(7): 1237-1243.
- Jagtap SS, Rupali B, Awhad B, Vidyasagar SPB (2011) Effects of clinorotation on growth and chlorophyll content of rice seeds. *Microgravity Sci Technol* 23: 41-48.
- Kasahara H, Takeuchi Y, Yamashita M, Yamada M (1994) Effects of simulated microgravity on the germination and elongation of protonema of *Adiantum capillus-venersis*. *Physiol Plant* 90: 205-209.
- Kieber JJ (2002). Tribute to Folke Skoog: Recent advances in our understanding of cytokinin biology. *J Plant Growth Reg* 21(1): 1-2.
- Kiss JZ, Katembe WJ, Edelman RE (1998) Gravitropism and development of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis* during spaceflight. *Physiol Plant* 102: 493-502.
- Kitaya Y, Kawai M, Tsuruyama J, Takahashi H, Tani A, Goto E, Saito T, Kiyota M (2003) The effect of gravity on surface temperatures of plant leaves. *Plant Cell Environ* 26(4): 497-503.
- Kordyum EL (1994) Effects of altered gravity on plant cell processes: Results of recent space and clinostatic experiments. *Adv Space Res* 14: 77-85.
- Krikorian AD, Steward FC (1978) Morphogenetic responses of cultured totipotent cells of carrot (*Daucus carota* var. *carota*) at zero gravity. *Science* 200: 67-68
- Leather GR, Forrence LE, Abeles FB (1972) Increased ethylene production during clinostat experiments may cause leaf epinasty. *Plant physiol* 49: 183-186.
- Legué V, Driss-Ecole D (1992) Cell cycle and cell differentiation in lentil roots grown on a slowly rotating clinostat. *Physiol Planta* 84: 386-392.
- Lichtentaler HK, Wellburn AR (1985) Determination of total carotenoids, chlorophyll a và b of leaf in different solvents. *Biolchem Soc Trans* 11: 591-592.
- Merkys AI, Laurinavicius RS (1983) Complete cycle of individual development of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh plants on Board the Salyut-7 Orbital Station. *Proceedings of the Russian Academy of Sciences* 271: 509-512.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 473-497.
- Musgrave ME, Kuang A, Xiao Y, Stout SC, Bingham GE, Briarty LG, Levinskikh MA, Sychev VN, Podolski IG (2000) Gravity independence of seed-to-seed cycling in *Brassica rapa*. *Planta* 210: 400-406.
- Namba T, Yoshizaki M, Tomitori T, Kobashi K, Mitsui K, Hase J (1974) Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs (I). *Planta Medica* 25: 28-38.
- Nguyễn Thị Thu Hương, Lương Kim Bích, Trần Công Luận, Trần Đình Hợp (2001-2005) Một số tác dụng của sâm Bồ Chính và thập tử Harmand thu hái ở Lộc Ninh (Bình Phước). *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học và công nghệ*, NXB. Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội: 90-91.
- Nguyễn Thượng Dong (2006) *Nghiên cứu phát triển dược liệu và đông dược ở Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội: 224-230.
- Pedroso MC, Durzan DJ (2000) Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoë* leaves. *Ann Bot* 86: 983-994.
- Peng C, Ru L, Ruiyang Z, Yang Z (2010) Direct shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledonary node of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Afri J Biotech* 9(50): 8693-8697.

- Perbal G, Driss-Ecole D, Rutin J, Sallé G (1987) Gravitoperception of lentil seedling roots grown in space (Spacelab D1 Mission). *Physiol Planta* 70: 119-126.
- Phan Duy Hiệp, Nguyễn Trí Minh, Phan Xuân Huyền, Cao Đình Hùng, Đinh Văn Khiêm, Nguyễn Thị Thanh Hằng (2014) Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của một số giống sâm Bô chính (*Hibiscus sagittifolius kurz*) trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Sinh học* 36(1): 266-271.
- Porterfield DM (2002) The biophysical limitations in physiological transport and exchange in plants grown in microgravity. *J Plant Grow Reg* 21(2): 177-190.
- Porterfield DM, Matthews SW, Daugherty CJ, Musgrave ME (1997) Spaceflight exposure effects on transcription, activity and localization of alcohol dehydrogenase in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 113: 685-693.
- Posada M, Ballesteros N, Obando W, Angarita A (1999) Micropropagation of Gerbera from floral buds. *Acta Hort* 482: 329-332.
- Renu S, Anwar S (2008) Thidiazuran (TDZ) Induced regeneration from cotyledonary node explant of *Abelmoschus moschatus Medik. L.* *World J Agri Sci* 4(4): 449-452.
- Sachs VFGJR (1879) Ueber Ausschliessung der geotropischen und heliotropischen Krümmungen während des Wachstums. *Würzburger Arbeiten* 2: 209-225.
- Veronica DM (2006) Effect of simulated microgravity on seedling development and vascular differentiation of soy. *Acta Astro* 58(3): 139-148.
- Yu F, Driss-École D, Rembur J, Legué V, Perbal G (1999) Effect of microgravity on the cell cycle in the lentil root. *Physiol Plant* 105: 171-178.

EFFECTS OF SIMULATED MICROGRAVITY ON SEED GERMINATION, GROWTH, DEVELOPMENT AND ACCUMULATED SECONDARY COMPOUNDS OF *HIBISCUS SAGITTIFOLIUS KURZ.* CULTURED *IN VITRO*

Duong Tan Nhat¹, Nguyen Xuan Tuan¹, Nguyen Thi Thuy Anh¹, Nguyen Ba Nam¹, Nguyen Phuc Huy¹, Hoang Thanh Tung¹, Vu Thi Hien¹, Vu Quoc Luan¹, Bui The Vinh², Tran Cong Luan²

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Center of Ginseng and Medicinal Materials in Ho Chi Minh City

SUMMARY

In the present study, *Hibiscus sagittifolius* Kurz. seeds were used as the plant materials for studying on the effects of simulated microgravity (on a 2D clinostat) on seed germination, shoot multiplication, growth, development and secondary metabolite accumulation. After surface sterilization, seeds were cultured on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose and 9 g/l agar in Petri dishes (9 seeds per dish, the seed to seed distance of 1.5 cm and kept in the same direction), and maintained in a Clinostat (2 rpm). The results showed that simulated microgravity inhibited the growth and development of *Hibiscus sagittifolius* roots with root length of 11.83 cm, fresh and dry weight of 58.28 and 5.23 mg, respectively but it made an increase in germination rate (87%) and accumulation of secondary metabolites (the total saponins content of 53.00 mg/g and the total coumarin content of 25.67 mg/g) after 3 weeks of culture. In addition, the simulated microgravity also resulted in positive shoot multiplication (shoot height of 3.07 cm, 6.33 nodes per shoot, 3.33 shoots per explant, and the fresh and dry weight of 401.33 and 37.00 mg, respectively), and growth and development of *Hibiscus sagittifolius* shoots (plant height of 12.17 cm with 5.67 leaves per shoot together with the average root length of 1.77 cm, and the fresh and dry weight of 419.00 and 36.00 mg) after 4 weeks of culture. The results from this study could be attributed to future perspectives in research on plant breeding and accumulation of secondary metabolites in medicinal plants.

Keywords: Clinostat, development, germination, growth, simulated microgravity