

Phát sinh hình thái *in vitro*, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa và tích lũy hợp chất thứ cấp của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*) dưới điều kiện Clinostat 2D

Lê Thế Biên^{1,2}, Hoàng Thanh Tùng^{1,2*}, Nguyễn Thị Như Mai¹, Hoàng Đắc Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Trương Hoài Phong¹, Vũ Quốc Luận¹, Bùi Văn Thế Vinh³, Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, 475A Điện Biên Phủ, phường 25, quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/3/2023; ngày chuyển phản biện 10/3/2023; ngày nhận phản biện 13/3/2023; ngày chấp nhận đăng 28/3/2023

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, mẫu lông thân của cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*) *in vitro* 4 tuần tuổi có chiều dài 1 cm được cắt đôi theo chiều dọc và nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D (điều kiện mô phỏng không trọng lực) và đối chứng nhằm đánh giá quá trình phát sinh hình thái *in vitro*, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa và sự tích lũy hợp chất thứ cấp. Kết quả cho thấy, 34,33% mẫu cấy cảm ứng mô sẹo và 65,67% mẫu cấy hình thành rễ bất định dưới điều kiện Clinostat 2D so với 100% mẫu cấy cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện đối chứng sau 4 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, khối lượng tươi và khô của cụm mô sẹo (tương ứng là 792,00 và 79,17 mg) dưới điều kiện Clinostat 2D cao hơn so với khối lượng tươi và khô của cụm mô sẹo (tương ứng là 313,33 và 30,07 mg) ở điều kiện đối chứng. Hoạt tính superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và phenolic ở điều kiện Clinostat 2D cao hơn so với điều kiện đối chứng. Đối với hypophyllanthin và phyllanthin, hàm lượng trong mô sẹo ở điều kiện Clinostat 2D đều cao hơn đối chứng. Ở điều kiện Clinostat 2D, hàm lượng hypophyllanthin trong mô sẹo (29,06 µg/g chất tươi) cao hơn trong rễ bất định (9,03 µg/g chất tươi), trong khi hoạt chất phyllanthin chỉ xuất hiện ở mô sẹo mà không có ở rễ bất định.

Từ khóa: Clinostat 2D, diệp hạ châu đắng, hoạt tính kháng oxy hóa, hợp chất thứ cấp, mô sẹo, rễ bất định.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Trọng lực đóng vai trò như một nguồn tín hiệu ổn định và bền vững nhất trên Trái đất trong hàng triệu năm tiến hóa của các sinh vật sống. Nghiên cứu sự thay đổi và sai khác của cơ thể sinh vật trong điều kiện không trọng lực mang lại nhiều hiểu biết cho con người về sự tương tác giữa trọng lực và sinh vật. Một số nghiên cứu liên quan đến lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật như sự thay đổi ở cấp độ tế bào và phân tử của cây *Arabidopsis* [1], sự thay đổi tốc độ sinh trưởng của tế bào đơn cây Thuốc lá [2, 3] được ghi nhận dưới điều kiện không trọng lực. Ngoài ra, thực vật bậc cao đã sử dụng trọng lực như một nguồn tín hiệu đáng tin cậy nhất cho mục đích phát sinh hình thái [4]; tuy nhiên, sự phát sinh hình thái thực vật trong điều kiện trọng lực thay đổi vẫn là vấn đề chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều. Mặt khác, nghiên cứu sự thay đổi các yếu tố hóa học hoặc vật lý là yêu cầu cần thiết [5]; một trong những yếu tố vật lý muốn được đề cập ở đây là trọng lực - một lực vật lý cơ bản tác động lên

mọi sinh vật sống trên Trái đất [6], nhưng điều này thường bị bỏ qua trong các nghiên cứu về khía cạnh ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái của thực vật. Do đó, nghiên cứu sự phát sinh hình thái của thực vật dưới điều kiện không trọng lực là một phương pháp tiếp cận nhằm tìm hiểu vai trò của trọng lực lên thực vật. Mặc dù bước đầu đã có một số nghiên cứu về chủ đề này [7, 8], tuy nhiên, nguồn mẫu thực vật được sử dụng cho các nghiên cứu phát sinh hình thái dưới điều kiện không trọng lực trước đây đều là phối hợp từ đã trưởng thành (hạt giống), dẫn đến việc khó có thể đánh giá giai đoạn sớm của quá trình phát sinh hình thái trong điều kiện không trọng lực.

Cho đến nay, có một số nghiên cứu về sự phát sinh hình thái của thực vật dưới điều kiện không trọng lực mà vật liệu là hạt của cây Lúa [4], Đậu đỏ [7], Cải dầu [8], Dưa chuột [9]. Một số nghiên cứu 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 cây Bông nước, Dưa

*Tác giả liên hệ: Email: duongtannhut@gmail.com; tunght.stn@gmail.com

***In vitro* morphogenesis, antioxidant enzyme activity and secondary compound accumulation of stem internode sample of *Phyllanthus amarus* under 2D clinostat condition**

The Bien Le^{1,2}, Thanh Tung Hoang^{1,2*}, Thi Nhu Mai Nguyen¹,
Dac Khai Hoang¹, Manh Cuong Do¹, Hoai Phong Truong¹,
Quoc Luan Vu¹, Van The Vinh Bui³, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Central Highlands Scientific Research Institute, Vietnam Academy of Science and Technology,
116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Ho Chi Minh City University of Technology,

475A Dien Bien Phu Street, Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 2 March 2023; revised 13 March 2023; accepted 28 March 2023

Abstract:

In this study, 4-week-old internodes of *in vitro* *Phyllanthus amarus* with 1 cm in length were cut in a half longitudinal section and cultured under 2D clinostat and control conditions to evaluate *in vitro* morphogenesis, antioxidant enzyme activity and secondary compound accumulation. The results showed that 34.33% of explants induced callus and 65.67% of explants formed adventitious root under 2D clinostat compared with 100% explants induced callus under control after 4 weeks of culture. In addition, the fresh and dry weights of callus clusters (792.00 and 79.17 mg, respectively) under 2D clinostat were higher than those under control (313.33 and 30.07 mg, respectively). Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and phenolic under 2D clinostat were higher than those of control. For hypophyllanthin and phyllanthin, the concentrations in the callus under 2D clinostat condition were higher than the control. The hypophyllanthin content in the callus (29.06 µg/g fresh weight) was higher than in the adventitious root (9.03 µg/g fresh weight) under 2D clinostat, while the phyllanthin only obtained in the callus that was absent in the adventitious root.

Keywords: adventitious root, antioxidant activity, callus, *Phyllanthus amarus*, secondary compounds, 2D clinostat.

Classification number: 4.6

cạn và Diệp hạ châu đắng [10], chuyển hóa năng lượng và hormone nội sinh ở cây Thu hải đường [11], sự tăng cường các hợp chất kháng oxy hóa trong Đậu xanh [12], quá trình chuyển hóa chất kháng oxy hóa ở cây *Antehmis* trong họ Cúc [13]. Gần đây, sự kết hợp giữa nuôi cấy *in vitro* và điều kiện Clinostat 2D được sử dụng để nghiên cứu phát sinh hình thái *in vitro* cây Đậu tây, sự biến động hormone nội sinh, hoạt tính của enzyme kháng oxy hóa và sự sinh trưởng tiếp theo của cây con có nguồn gốc từ điều kiện Clinostat 2D [14]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về quá trình phát sinh hình thái của cây trồng dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp nuôi cấy *in vitro* với điều kiện Clinostat 2D được tiến hành trên cây Diệp hạ châu đắng nhằm đánh giá quá trình phát sinh hình thái *in vitro* của mẫu lông thân, sự biến động các enzyme kháng oxy hóa (Superoxide dismutase - SOD, Catalase - CAT, Ascorbate peroxidase - APX, Phenolic) cũng như sự tích lũy hợp chất thứ cấp (flavonoid và lignan) của mẫu cây có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D so với mẫu cây *in vitro* ở điều kiện tĩnh (đối chứng).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguồn mẫu thực vật

Mẫu lông của cây Diệp hạ châu đắng *in vitro* 4 tuần tuổi sinh trưởng và phát triển tốt đã được ổn định qua nhiều lần cấy chuyển trên môi trường MS [15] tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (Lâm Đồng, Việt Nam) được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu.

2.2. Thiết bị Clinostat 2D và điều kiện nuôi cấy

Thiết bị Clinostat 2D (Advanced Engineering Services Co. Ltd., Nhật Bản) được sử dụng cho mục đích mô phỏng điều kiện không trọng lực. Clinostat 2D có trục quay nằm ngang vuông góc với vectơ trọng lực và bộ khuếch đại điều chỉnh tốc độ quay. Một mẫu cây được đặt ở vị trí trung tâm của đĩa petri (đường kính 60 mm, chiều cao 15 mm, Sigma -Aldrich, Darmstadt, Đức), tương ứng với gia tốc tác dụng lên mẫu luôn nhỏ hơn $2,8 \times 10^{-3} g$ [16]. Mẫu cây được cố định trên bộ phận quay của Clinostat 2D với tốc độ quay 2 vòng/phút, trong khi đó, mẫu cây được đặt dưới điều kiện tĩnh có trọng lực được xem như điều kiện đối chứng.

Mẫu cây được đặt trong phòng nuôi cấy ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, độ ẩm tương đối 50-60% dưới ánh sáng đèn huỳnh quang (36 W, chiều dài 1,2 m) với cường độ ánh sáng $45 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ và quang chu kỳ là 8 giờ sáng và 16 giờ chiều.

2.3. Phát sinh hình thái cây Diệp hạ châu dưới điều kiện Clinostat 2D

Mẫu lỏng thân (chiều dài 10 mm, đường kính 1 mm) được cắt đôi theo chiều dọc và đặt trên đĩa petri chứa 5 ml môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [17] được dán kín bởi màng parafilm M (Bemis, Mỹ) nhằm nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái *in vitro* dưới điều kiện Clinostat 2D. Đối chứng là mẫu cây được nuôi cấy *in vitro* trong điều kiện tĩnh. Tỷ lệ cắm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ hình thành rễ bất định (%), khối lượng tươi và khối lượng khô của mẫu cây được ghi nhận sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

2.4. Hoạt tính enzyme kháng oxy hóa

Các mẫu tươi (300 mg) có nguồn gốc nuôi cấy ở điều kiện Clinostat 2D và đối chứng được thu nhận và đặt trong cối sứ; sau đó, được nghiền trong nitor lỏng thành bột mịn và đồng nhất mẫu trong 2 ml dung dịch đệm phosphate 0,1 M (pH 7,4) chứa 0,1 mM ethylene diamine-tetracetic acid. Hỗn hợp chứa mẫu được ly tâm ở tốc độ 15.000 vòng/phút khoảng 20 phút ở 4°C. Phần nổi phía trên sau đó được thu nhận và bảo quản ở 4°C trong khoảng 24 giờ để xác định hoạt tính của các enzyme kháng oxy hóa, bao gồm SOD, CAT, APX và Phenolic.

Hoạt độ 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 thụ bước sóng 320 nm. SOD trong mẫu xúc tác phản ứng phân hủy các gốc peroxide, 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 [18].

Hoạt độ CAT trong mẫu thử được xác định bằng cách cho mẫu phản ứng với 100 μ l 65 mM H₂O₂ trong 2 phút, H₂O₂ còn lại sau khi phản ứng sẽ được kết hợp với 100 μ l ammonium molybdate (NH₄Mo₇O₂₄) tạo phức hợp màu vàng và hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Đơn vị hoạt độ CAT (U/g) tương đương với 1 μ mol H₂O₂ thủy phân trong 1 phút [19].

Hoạt độ APX được kiểm tra theo phương pháp của Y. Nakano và cs (1981) [20]. Enzyme APX trong mẫu sẽ oxy hóa và làm giảm sự hấp thụ tối đa của ascorbate ở bước sóng 290 nm. Trong đó, đơn vị hoạt độ APX (U/g) được tính bằng cách ghi lại độ hấp thụ tối đa của ascorbate (290 nm) với sự hiện diện của 0,5 mM H₂O₂ trong 3 phút. Lượng ascorbate oxy hóa được tính trực tiếp với hệ số hấp thụ là 2,8 mM/cm. Một đơn vị hoạt độ enzyme (U/g) là lượng APX cần thiết để oxy hóa 1 μ mol ascorbate trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

Hàm lượng Phenolic tổng được xác định theo phương pháp của V.L. Singleton và cs (1999) [21]. Dịch chiết (0,2 ml) đã pha loãng ở nồng độ thích hợp trộn với 0,8 ml nước cất trong ống nghiệm, sau đó thêm 1 ml thuốc thử Folin-ciocalteu 10%. Hỗn hợp được trộn đều, sau 3-8 phút, thêm 2,5 ml Na₂CO₃ 7,5%. Lắc đều, hỗn hợp phản ứng được giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi đi đo ở bước sóng 760 nm sử dụng máy quang phổ kế (UV-VIS Shimadzu V630, Nhật Bản). Kết quả được thể hiện bởi miligam acid Gallic tương đương (mg GAE)/g nguyên liệu khô. Cách tiến hành mẫu chuẩn và các mẫu thử là tương tự nhau, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần để tính giá trị trung bình. Sử dụng acid Gallic làm chất chuẩn để xây dựng đường tuyến tính.

2.5. Hàm lượng hợp chất thứ cấp

Quá trình phân tách các hợp chất thứ cấp dựa vào phương pháp của V. Murugaiyah và cs (2007) [22] với một số điều chỉnh cho phù hợp. Cụ thể, cân chính xác 10 mg khối lượng tươi mỗi mẫu phân tích và 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, cần 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 10 ml. Dung dịch mẫu được lọc qua màng lọc 0,45 μ m, 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 μ m) để phân tách các hợp chất. Dung môi pha động gồm MeOH (A) và H₂O chứa 0,1% H₃PO₄ (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 bước sóng 265 nm, nhiệt độ cột 30°C, quá trình tiêm mẫu bằng hệ thống tự động với thể tích mẫu tiêm là 5 μ l. 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) mua từ Hãng Sigma-Aldrich® (Mỹ).

2.6. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 50 đĩa petri/nghiệm thức (mỗi mẫu cây trên một đĩa petri). 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 phép thử Tukey với mức ý nghĩa p \leq 0,05. Các bảng số liệu được tạo bởi phần mềm MicroSoft Excel 2016.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phát sinh hình thái của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu đấng dưới điều kiện Clinostat 2D

Kết quả ghi nhận được cho thấy, thời gian cảm ứng mô sẹo của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu đấng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng 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 1). Sau 2 tuần nuôi cấy, mẫu lông thân nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D ghi nhận 93,33% cảm ứng mô sẹo và 6,67% hình thành rễ bất định, trong khi đó, tất cả mẫu lông thân đều cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện đối chứng. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo giảm và tỷ lệ hình thành rễ bất định gia tăng ở điều kiện Clinostat 2D sau 3 và 4 tuần nuôi cấy (bảng 1). Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện Clinostat 2D chỉ còn 34,33% và tỷ lệ hình thành rễ bất định tăng lên 65,67%. Dưới điều kiện đối chứng, không ghi nhận hình thành rễ bất định sau 4 tuần nuôi cấy (hình 1 và bảng 1).

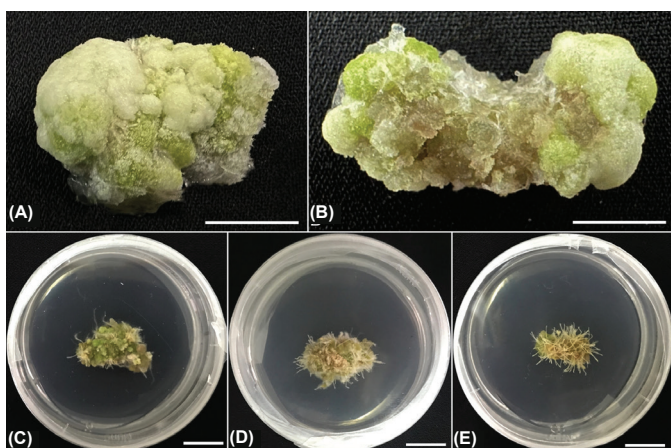
Sự thay đổi trọng lực ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và tăng sinh không chỉ ở cấp độ tế bào mà còn ở cấp độ toàn bộ cơ thể sinh vật [23]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, khối lượng tươi của mẫu cấy cũng có sự khác biệt giữa 2 điều kiện nuôi cấy sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy (bảng 1). Khối lượng tươi của cụm mô sẹo (792,00 mg) tăng 1,46 lần dưới điều kiện Clinostat 2D cao hơn khối lượng tươi cụm mô sẹo (313,33 mg) nuôi cấy dưới điều kiện đối chứng chỉ tăng 1,19 lần. Sự thay đổi về khối lượng khô của cụm mô sẹo cũng tương tự như khối lượng tươi (hình 1).

Dưới điều kiện Clinostat 2D, khối lượng khô cụm mô sẹo (79,17 mg) cao hơn so với khối lượng khô mẫu cấy dưới điều kiện đối chứng (30,07 mg). Kết quả gia tăng khối lượng tươi và khô của cụm mô sẹo dưới điều kiện Clinostat 2D tương tự kết quả thu được trên cây Thuốc lá [2, 3] và Lúa [4]. Những kết quả về sự tăng sinh của tế bào thực vật này có thể được giải thích bởi điều kiện không trọng lực duy trì nới lỏng thành tế bào thực vật [2, 23] hoặc tiết kiệm năng lượng dành cho các quá trình khác như sinh tổng hợp

Bảng 1. Sự phát sinh hình thái của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu đấng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

Thời gian nuôi cấy (tuần)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)		Tỷ lệ hình thành rễ bất định (%)		Khối lượng tươi cụm mô sẹo (mg)		Khối lượng khô cụm mô sẹo (mg)	
	Clinostat 2D	Đối chứng	Clinostat 2D	Đối chứng	Clinostat 2D	Đối chứng	Clinostat 2D	Đối chứng
2	93,33 ^a		6,67 ^c		541,00 ^c	263,00 ^c	53,83 ^c	24,67 ^c
3	62,67 ^b	100,00 ^a	37,33 ^b	0,00 ^a	598,67 ^b	291,00 ^b	59,89 ^b	29,00 ^b
4	34,33 ^c		65,67 ^a		792,00 ^a	313,33 ^a	79,17 ^a	30,07 ^a

Các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Tukey's test).



Hình 1. Phát sinh hình thái mẫu lông thân cây Diệp hạ châu đấng nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng. (A) Mô sẹo ở điều kiện đối chứng sau 4 tuần nuôi cấy; (B) Mẫu mô sẹo ở điều kiện Clinostat 2D sau 4 tuần nuôi cấy; (C-E) Rễ bất định ở điều kiện Clinostat 2D sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy. Thước đo A, B: 0,5 cm; C-E: 1 cm.

các chất chuyển hóa có lợi cho sự tăng trưởng của thực vật [3]. Ngoài ra, hình thái bên ngoài cụm mô sẹo nuôi cấy dưới Clinostat 2D và đối chứng sau 4 tuần khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi không có sự khác biệt. Trong nghiên cứu này, mẫu cấy lông thân nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D ghi nhận hình thành rễ bất định sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ hình thành rễ bất định tăng từ 6,67% sau 2 tuần nuôi cấy lên 65,67% sau 4 tuần nuôi cấy (bảng 1). 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 [24]. Trong nghiên cứu này, sự hình thành rễ bất định ở cây Diệp hạ châu đấng đã được thúc đẩy có thể do điều kiện Clinostat 2D đã ảnh hưởng sớm lên sự thay đổi hàm lượng auxin [11].

3.2. Hàm lượng enzyme kháng oxy hóa của mô sẹ và rễ bất định cây Diệp hạ châu đấng dưới điều kiện Clinostat 2D

Hàm lượng hoạt tính của các enzyme kháng oxy hóa như SOD, APX, CAT và Phenolic ghi nhận có sự khác biệt ở điều kiện Clinostat 2D và đối chứng sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy (bảng 2). Các hoạt tính enzyme kháng oxy hóa này đều tăng theo tỷ lệ từ 2 đến 4 tuần ở cả hai điều kiện nuôi cấy. Các hoạt tính SOD, CAT, APX và phenolic ở điều kiện Clinostat 2D cao hơn đối chứng. Tuy nhiên, hoạt tính APX của mẫu mô sẹ ở điều kiện đối chứng và Clinostat 2D sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy là tương đương (bảng 1). Trong cùng điều kiện Clinostat 2D, các hoạt tính kháng oxy hóa này ở rễ luôn cao hơn ở mô sẹ tại tất cả thời gian ghi nhận.

Để khắc phục tổn thương do stress oxy hóa, thực vật có cơ chế kiểm soát và điều chỉnh mức ROS (Reactive oxygen species) một cách thích hợp, bao gồm tăng hoạt độ enzyme chống oxy hóa như APX, CAT và SOD [25]. M. Soleimani và cs (2019b) [3] cho thấy mối quan hệ tích cực giữa chất kháng oxy hóa và các thông số tăng trưởng trong tế bào cây Thuộc lá trong điều kiện Clinostat 2D. Trong nghiên cứu này, mẫu lỏng thân cảm ứng mô sẹ dưới điều kiện Clinostat 2D có khối lượng tươi và khô cao hơn đối chứng (bảng 1). Điều kiện nuôi cấy Clinostat 2D làm gia tăng hoạt tính của SOD, CAT và hàm lượng phenolic đã làm gia tăng tỷ lệ cảm ứng mô sẹ, khối lượng tươi và khô của mẫu cây [2]. Một nghiên cứu gần đây của H. Halimeh (2022) [13] trên cây Cúc La Mã cho thấy, hoạt tính của enzyme kháng oxy hóa tăng tỷ lệ thuận với thời gian nuôi cấy dưới điều kiện không trọng lực so với điều kiện đối chứng. Sự thay đổi này giúp tế bào có cơ chế thích nghi và tăng trưởng tốt hơn, cũng như tăng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Bảng 2. Hoạt tính enzyme kháng oxy hóa của mô sẹ và rễ cây Diệp hạ châu đấng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

Thời gian nuôi cấy (tuần)	SOD (U/g)		CAT (U/g)		APX (U/g)		Phenolic (mg/100 g chất khô)					
	Clinostat 2D		Đối chứng		Clinostat 2D		Đối chứng		Clinostat 2D	Đối chứng		
	Mô sẹ	Rễ	Mô sẹ	Rễ	Mô sẹ	Rễ	Mô sẹ	Mô sẹ	Rễ	Mô sẹ		
2	51,23 ^c	75,79 ^c	23,28 ^c	181,05 ^c	227,70 ^c	174,95 ^c	0,24 ^c	0,63 ^b	0,28 ^b	56,47 ^c	81,4 ^c	50,91 ^c
3	60,90 ^b	90,42 ^b	31,18 ^b	222,80 ^b	303,70 ^b	215,81 ^b	0,32 ^b	0,67 ^b	0,35 ^b	77,19 ^b	97,3 ^b	71,56 ^b
4	71,37 ^a	121,29 ^a	44,72 ^a	243,29 ^a	334,79 ^a	236,46 ^a	0,44 ^a	0,95 ^a	0,43 ^a	99,24 ^a	126,24 ^a	92,31 ^a

Các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Tukey's test).

Bảng 3. Hợp chất thứ cấp của mô sẹ và rễ cây Diệp hạ châu đấng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng sau 4 tuần nuôi cấy.

Điều kiện nuôi cấy	Mẫu cây	Flavonoid (µg/g chất tươi)		Lignan (µg/g chất tươi)	
		Rutin	Quercetin	Hypophyllanthin	Phyllanthin
Clinostat 2D	Mô sẹ	1,79 ^a	3,25 ^b	29,06 ^a	16,01 ^a
	Rễ	1,19 ^b	9,54 ^a	9,03 ^c	-**
Đối chứng	Mô sẹ	-**	9,61 ^a	17,29 ^b	11,53 ^b

Các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Tukey's test); **: không ghi nhận số liệu.

3.3. Tích lũy hợp chất thứ cấp của mô sẹ và rễ cây Diệp hạ châu đấng dưới điều kiện Clinostat 2D

Kết quả phân tích HPLC cho thấy, hàm lượng flavonoid (rutin và quercetin), lignan (hypophyllanthin và phyllanthin) có sự khác biệt ở điều kiện Clinostat 2D và đối chứng (bảng 3). Hợp chất rutin xuất hiện trong cả mô sẹ và rễ ở điều kiện Clinostat 2D với hàm lượng ở mô sẹ cao hơn ở rễ; trong khi đó, hợp chất này không xuất hiện trong mô sẹ ở điều kiện đối chứng. Với hợp chất quercetin được phát hiện ở cả hai điều kiện nuôi cấy, hàm lượng hợp chất này cao nhất trong mô sẹ ở điều kiện đối chứng (9,61 µg/1 g chất tươi) và thấp nhất trong mô sẹ (3,25 µg/1 g chất tươi) ở điều kiện Clinostat 2D (bảng 3).

Đối với hoạt chất hypophyllanthin và phyllanthin, hàm lượng của chúng trong mô sẹ ở điều kiện Clinostat 2D đều cao hơn đối chứng. Ở điều kiện Clinostat 2D, hàm lượng hypophyllanthin trong mô sẹ (29,06 µg/1 g chất tươi) cao hơn trong rễ (9,03 µg/1 g chất tươi), trong khi hoạt chất phyllanthin chỉ xuất hiện ở mô sẹ mà không có ở rễ (bảng 3). Các hợp chất thứ cấp quyết định được tính của cây Diệp hạ châu đấng là rutin, quercetin, đây là các flavonoid với vai trò ngăn ngừa tế bào ung thư và hypophyllanthin, phyllanthin là các lignan có chức năng bảo vệ gan. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, hàm lượng hypophyllanthin, phyllanthin ở điều kiện Clinostat 2D đều cao hơn đối chứng. Điều này tương tự với nghiên cứu của D.T. Nhat và cs (2022) [10] khi đã chứng minh ở điều kiện Clinostat 2D, sự tích lũy hàm lượng coumarin, saponin ở cây Sâm bố chính và phyllanthin ở cây Diệp hạ châu đấng được tăng cường. Ngoài ra, nghiên cứu của H. Halimeh (2022) [13] trên cây Cúc La Mã cho thấy điều kiện mô phỏng không trọng lực đã làm tăng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học.

4. Kết luận

Mẫu cây lóng thân đã cảm ứng mô sẹo (34,33%) và rễ bất định (65,67%) dưới điều kiện Clinostat 2D và mô sẹo (100%) dưới điều kiện đối chứng. Sinh khối của cụm mô sẹo (khối lượng tươi và khối lượng khô lần lượt là 792,00 và 79,17 mg) dưới điều kiện Clinostat 2D cao hơn so với điều kiện đối chứng (tương ứng là 313,33 và 30,07 mg). Ngoài ra, hoạt tính SOD, CAT và Phenolic ở mô sẹo và rễ bất định dưới điều kiện Clinostat 2D cao hơn so với điều kiện đối chứng, trong khi đó, hoạt tính APX không có sự khác biệt về thống kê ở mô sẹo dưới cả 2 điều kiện sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy. Bên cạnh đó, hàm lượng các hợp chất thứ cấp như rutin, quercetin, hypophyllanthin và phyllanthin trong mô sẹo và rễ bất định cũng có sự biến động ở cả 2 điều kiện nuôi cấy.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) trong Dự án mã số VINIF.2023.DA075. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.I. Manzano, I. Matía, F.G. Camacho, et al. (2009), "Germination of *Arabidopsis* seed in space and in simulated microgravity: Alterations in root cell growth and proliferation", *Microgravity Science and Technology*, **21(4)**, pp.293-297, DOI: 10.1007/s12217-008-9099-z.

[2] M. Soleimani, F. Ghanati, Z. Hajebrahimi (2019a) "The role of phenolic compounds in growth improvement of cultured tobacco cells after exposure to 2-D clinorotation", *Plant Physiology*, **9(4)**, pp.2921-2929, DOI: 10.30495/IJPP.2019.668858.

[3] M. Soleimani, F. Ghanati, Z. Hajebrahimi, et al. (2019b), "Energy saving and improvement of metabolism of cultured tobacco cells upon exposure to 2-D clinorotation", *Journal of Plant Physiology*, **234-235**, pp.36-43, DOI: 10.1016/j.jplph.2019.01.002.

[4] T. Hoson, K. Soga, R. Mori, et al. (1999) "Morphogenesis of rice and *Arabidopsis* seedlings in space", *Journal of Plant Research*, **112(4)**, pp.477-486, DOI: 10.1007/PL00013903.

[5] C.M. Ramage, R.R. Williams (2002) "Mineral nutrition and plant morphogenesis", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **38(2)**, pp.116-124, DOI: 10.1079/IVP2001269.

[6] M. Nakamura, T. Nishimura, M.T. Morita (2019) "Gravity sensing and signal conversion in plant gravitropism", *Journal of Experimental Botany*, **70(14)**, pp.3495-3506, DOI: 10.1093/jxb/erz158.

[7] K. Soga, A. Kurita, S. Yano, et al. (2014) "Growth and morphogenesis of Azuki bean seedlings in space during SSAF2013 program", *Biological Sciences in Space*, **28**, pp.6-11, DOI: 10.2187/bss.28.6.

[8] A. Frolov, A. Didio, C. Ihling, et al. (2018) "The effect of simulated microgravity on the *Brassica napus* seedling proteome", *Functional Plant Biology*, **45(4)**, pp.440-452, DOI: 10.1071/FP16378.

[9] H. Takahashi, M. Kamada, Y. Yamazaki, et al. (2000) "Morphogenesis in cucumber seedlings is negatively controlled by gravity", *Planta*, **210**, pp.515-518, DOI: 10.1007/s004250050039.

[10] D.T. Nhut, H.D. Khai, N.X. Tuan, et al. (2022) "In vitro growth and development of plant under stimulated microgravity condition", *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*, Springer, pp.343-382, DOI: 10.1007/978-981-16-6498-417.

[11] H.D. Khai, L.T. Bien, N.Q. Vinh, et al. (2021), "Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of *Begonia* somatic embryos under clinorotation", *Plant Science*, **312**, DOI: 10.1016/j.plantsci.2021.111045.

[12] S. Nakajima, Y. Ogawa, T. Suzuki, et al. (2019) "Enhanced antioxidant activity in mung bean seedlings grown under slow clinorotation", *Microgravity Science and Technology*, **31**, pp.395-401, DOI: 10.1007/s12217-019-9699-9.

[13] H. Halimeh (2022) "Antioxidant metabolism and oxidative damage in *Anthemis gilanica* cell line under fast clinorotation", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **150(1)**, pp.710-719, DOI: 10.1007/s11240-022-02324-2.

[14] L.T. Bien, H.T. Tung, N.T.N. Mai, et al. (2023) "Morphogenesis of *in vitro* strawberry leaf cultured under clinostat 2D condition", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **152(1)**, pp.1-12, DOI: 10.1007/s11240-023-02484-9.

[15] T. Murashige, F. Skoog (1962) "A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures", *Plant Physiology*, **1(3)**, pp.473-497.

[16] H. Wang, H.Q. Zheng, W. Sha, et al. (2006) "A proteomic approach to analysing responses of *Arabidopsis thaliana* callus cells to clinostat rotation", *Journal of Experimental Botany*, **57(4)**, pp.827-835, DOI: 10.1093/jxb/erj066.

[17] K.M. Nitnaware, D.G. Naik, T.D. Nikam (2011), "Thidiazuron-induced shoot organogenesis and production of hepatoprotective lignan phyllanthin and hypophyllanthin in *Phyllanthus amarus*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **104**, pp.101-110, DOI: 10.1007/s11240-010-9796-3.

[18] S. Marklund, G. Marklund (1974) "Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase", *European Journal of Biochemistry*, **47(3)**, pp.469-474.

[19] L. Goth (1991) "A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range", *Clinica Chimica Acta*, **196(2-3)**, pp.143-151, DOI: 10.1016/0009-8981(91)90067-M.

[20] Y. Nakano, K. Asada (1981) "Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts", *Plant and Cell Physiology*, **22(5)**, pp.867-880, DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.

[21] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-raventos (1999), "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent", *Methods in Enzymology*, **299**, pp.152-178.

[22] V. Murugaiyah, K.L. Chan (2007), "Determination of four lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, **1154**, pp.198-204, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.03.079.

[23] J. Xie, H. Zheng (2020), "*Arabidopsis* flowering induced by photoperiod under 3-D clinostat rotational simulated microgravity", *Acta Astronautica*, **166**, pp.567-572, DOI: 10.1016/j.actaastro.2018.11.014.

[24] L. Taiz, E. Zeiger (2002), *Plant Physiology (3rd Ed.)*, Sinauer Associates, Sunderland, USA, 675pp.

[25] H.T.M. Ngan, D.M. Cuong, H.T. Tung, et al. (2020) "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*, **145**, pp.1-13, DOI: 10.1007/s11240-020-01796-4.