



DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.135

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤY MẦM VÀ TĂNG TRƯỞNG CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ CÂY TRÂM ỒI (*Lantana camara* L.)

Võ Ngọc Nguyên¹, Trần Ngọc Quý¹ và Trần Thanh Mến^{2*}

¹Viện nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thanh Mến (email: ttmen@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 19/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 15/06/2022

Ngày duyệt đăng: 16/07/2022

Title:

Research on the allelopathic potential of extract from *Lantana camara* L.

Từ khóa:

Allelopathy, cải củ, hợp chất sinh học, trâm ổi, ức chế thực vật

Keywords:

Allelopathy, bioactive compounds, inhibition, *Lantana camara* L., *Raphanus sativus* L.

ABSTRACT

Lantana camara L. is a wild and invasive plant that inhibits other plants in the same its ecosystem by allelopathic mechanisms. This study was conducted to investigate the plant inhibitory activity of extracts from parts of *Lantana camara* L. The survey results showed that *Lantana camara* L. extracts possessed biological compounds, such as alkaloids, flavonoids, phenolic, saponins and coumarin. Phenolic and flavonoid contents of the flower extract were highest (239.13 mg GAE/g, 114.84 mgQE/g extract, respectively). It was found that the extracts of *Lantana camara* L. inhibited germination and growth of *Raphanus sativus* and the inhibitory activities were proportional to the applied doses. In addition, they inhibited the growth and development of seeds of *Raphanus sativus* L. by affecting cell division during mitosis, increasing cell wall thickness and reducing photosynthetic capacity.

TÓM TẮT

Trâm ổi (*Lantana camara* L.) là loài thực vật hoang dại được cho là có khả năng ức chế các loài thực vật lân cận trong cùng hệ sinh thái bằng cơ chế allelopathy. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng ức chế nảy mầm và tăng trưởng của cao chiết từ các bộ phận của cây trâm ổi trên đối tượng là hạt cải củ (*Raphanus sativus* L). Kết quả khảo sát cho thấy, các cao chiết từ cây trâm ổi có chứa các hợp chất alkaloid, flavonoid, phenolic, saponin và coumarin. Hàm lượng phenolic và flavonoid được xác định có trong cao chiết từ hoa cao hơn các bộ phận khác, lần lượt là 239,13 mg GAE/g và 114,84 mg QE/g cao chiết. Khả năng ức chế nảy mầm và sự tăng trưởng của các cao chiết trâm ổi đối với hạt cải củ tăng dần theo nồng độ khảo sát và bộ phận hoa cho kết quả ức chế cao nhất. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết trâm ổi có tác động đến sự phân chia tế bào trong quá trình nguyên phân, tăng độ dày vách tế bào và làm giảm khả năng quang hợp.

1. GIỚI THIỆU

Cỏ dại luôn là vấn đề thách thức của ngành Nông nghiệp ở Việt Nam và trên toàn thế giới. Chúng gây ra những tổn thất về năng suất của nhiều loại cây

trồng như làm giảm năng suất ở lúa (15-66%), ở bắp (18-65%), ở đậu tương (50-76%) và ở đậu phộng (45-71%) (Gharde et al., 2018). Các số liệu trong nghiên cứu của Thi và ctv. (2015) đã chỉ ra rằng cỏ

dại gây thiệt hại cho cây lúa cao hơn nhiều so với các loại côn trùng và sâu bệnh gây hại. Việc áp dụng thuốc trừ cỏ hóa học đã đóng góp đáng kể vào sự phát triển của nền nông nghiệp toàn cầu, tuy nhiên sử dụng thuốc diệt cỏ hóa học liên tục làm ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và tác động tiêu cực đến các loài thiên địch (Hussain et al., 2021). Nghiêm trọng hơn, tình trạng kháng thuốc diệt cỏ của một số loài cỏ dại đang gia tăng một cách đáng kể. Nghiên cứu của Heap (2015) đã chỉ ra rằng 220 loài cỏ dại được phát hiện có khả năng kháng một hoặc nhiều loại thuốc diệt cỏ hóa học. Vì thế, việc nghiên cứu tìm ra sản phẩm trừ cỏ hiệu quả có nguồn gốc tự nhiên sẽ được con người ưu tiên lựa chọn hơn. Các sản phẩm tự nhiên này ít độc đối với con người, ít gây ra hiện tượng kháng thuốc, ít để lại dư lượng trong nông sản và giảm tác động đến môi trường (Mến và ctv., 2019).

Allelopathy là một hiện tượng thể hiện các tương tác sinh học giữa các sinh vật sống cùng trong hệ sinh thái (Macías et al., 2019). Thực vật có thể tạo ra các hợp chất thứ cấp được gọi là allelochemicals gây ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực đến sự tồn tại và phát triển của các sinh vật khác (Cheng & Cheng, 2015). Nghiên cứu của Kato-Noguchi and Kurniadie (2021) đã chỉ ra rằng các hợp chất hóa học của các loài thực vật này có thể tác động trực tiếp hoặc gián tiếp đến sự nảy mầm, sinh trưởng và phát triển của các loài thực vật khác. Vì thế, các hợp chất allelochemicals gần đây đã được sử dụng như một công cụ thay thế cho việc sử dụng thuốc diệt cỏ thương mại và kỳ vọng hướng đến phát triển nền nông nghiệp bền vững và an toàn trong tương lai (Albuquerque et al., 2011; Spiassi et al., 2015; Li et al., 2021). Cây trâm ôi (*Lantana camara* L.) là một loài thực vật thuộc họ Cỏ roi ngựa (Verbenaceae) được biết đến là một loại cây cảnh và được trồng làm hàng rào khá phổ biến tại nhiều quốc gia trên thế giới nhưng đồng thời cũng là một loài thực vật có khả năng xâm lấn mạnh mẽ. Hiện tượng allelopathy và các hợp chất thứ cấp của cây trâm ôi đóng một vai trò quan trọng trong sự xâm lấn của nó (Peng et al., 2019). Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã đánh giá tiềm năng allelopathic của các chất chiết xuất khác nhau của *L. camara*. Trong nghiên cứu của Saxena (2000) cho thấy dịch trích nước ở nồng độ 3% của trâm ôi có thể gây chết cây lục bình sau 21 ngày. Chiết xuất lá của cây trâm ôi có thể ức chế sự phát triển và nảy mầm của cây đậu xanh (Julio et al., 2019). Ngoài ra, các hợp chất thứ cấp có trong cây trâm ôi còn làm giảm khả năng nảy mầm và tăng trưởng cây con, gây ức chế các quá trình sinh trưởng

và phát triển cũng làm gia tăng tỷ lệ chết của chúng (Kato-Noguchi & Kurniadie, 2021).

Từ những luận cứ trên cho thấy sự cần thiết để tiến hành nghiên cứu này. Việc đánh giá khả năng ức chế thực vật của các cao chiết từ các bộ phận của cây trâm ôi sẽ góp phần tìm ra các hợp chất tự nhiên có khả năng kiểm soát cỏ dại có nguồn gốc từ thực vật.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây trâm ôi có chiều cao từ 0,5 m đến 2 m được thu hái tại các địa điểm của thành phố Cần Thơ và thành phố Vĩnh Long. Mẫu vật được mang về phòng thí nghiệm để xử lý và điều chế cao chiết. Các bộ phận thân, lá và hoa được tách riêng, sau đó được rửa sạch, cắt nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ 50°C và xay thành bột. Bột các bộ phận được trữ trong các túi vải và ngâm trong dung môi ethanol 96%. Sau 7 ngày, dịch chiết được tiến hành cô quay ở áp suất thấp để thu được cao chiết ethanol từ các bộ phận của cây trâm ôi.

Hạt cải củ (*Raphanus sativus* L.) sử dụng trong thí nghiệm là sản phẩm của Công ty TNHH Giống cây trồng Phú Nông.

Củ hành tím (*Allium ascalonicum*) khỏe mạnh, có kích thước đồng đều được chọn để khảo sát trong thí nghiệm phân chia tế bào.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định tính thành phần hóa học trong các cao chiết

Thí nghiệm được tiến hành dựa trên nguyên tắc phản ứng tạo màu theo mô tả của Sofowora (1993) và Tiwari et al. (2011) nhằm xác định một số hợp chất có trong cao chiết ethanol từ các bộ phận của cây trâm ôi như: phenolic, flavonoid, alkaloid, saponin và coumarin.

2.2.2. Xác định hàm lượng phenolic và flavonoid tổng số

Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng được thực hiện theo mô tả của Dewanto et al. (2002) có hiệu chỉnh. Quy trình thử nghiệm như sau: 500 μ L dịch cao chiết có nồng độ 1 mg/mL được cho vào ống nghiệm, thêm 250 μ L thuốc thử Folin-Ciocalteu rồi lắc mạnh và để yên trong 5 phút cho ổn định. Tiếp theo, 250 μ L dung dịch Na_2CO_3 10%, được thêm vào, lắc đều và ủ trong thời gian 30 phút, ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, các dung dịch phản ứng được tiến hành đo ở bước sóng 765 nm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và dựa vào đường chuẩn gallic

acid để tính toán hàm lượng phenolic tổng số có trong mẫu.

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định theo phương pháp của Zhishen et al. (1999). Quy trình cụ thể: 1000 μ L dịch cao chiết có nồng độ 100 μ g/mL được cho vào ống nghiệm, tiếp tục thêm vào 1000 μ L nước cất và 200 μ L dung dịch NaNO_2 5% và để yên trong 5 phút. Tiếp theo, 200 μ L AlCl_3 10% được cho vào hỗn hợp và để yên trong thời gian 6 phút. Sau đó, 2000 μ L NaOH 1 M được cho thêm dung dịch và tiếp tục thêm vào 600 μ L nước cất để thể tích cuối trong ống nghiệm là 5 mL. Dung dịch phản ứng được tiến hành đo ở bước sóng 510 nm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và dựa vào đường chuẩn quercetin để tính toán hàm lượng polyphenol tổng số có trong mẫu.

2.2.3. Khảo sát khả năng ức chế nảy mầm của thực vật thí nghiệm của các cao chiết

Chuẩn bị dung dịch các cao chiết thân, lá, hoa đã được pha loãng với methanol ở 3 mức nồng độ (1; 2,5; 5 và 7,5 mg/mL). Nghiệm thức đối chứng sử dụng là methanol. Giấy lọc Whatman được đặt vào các đĩa Petri (50 mm) đã chuẩn bị sẵn. Tại mỗi đĩa Petri được lần lượt cho vào 4 mL cao chiết với các nồng độ thí nghiệm. Đĩa được đặt trong tủ hút trong 3 đến 4 giờ để methanol bay hơi, cao chiết được giữ lại trên giấy lọc. Cho vào mỗi đĩa 10 hạt cải củ đã nứt nanh sau khi ngâm trong nước ấm 24 giờ. Các đĩa Petri được đặt trong điều kiện đầy đủ ánh sáng và nhiệt độ phòng. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần và thu các chỉ tiêu sau 7 ngày bố trí thí nghiệm.

Công thức để xác định phần trăm ức chế

Phần trăm (%) ức chế nảy mầm = ((trung bình DCA - NT)/ trung bình DCA) * 100

(Trong đó: DCA là đối chứng âm không bổ sung cao chiết, NT là nghiệm thức thí nghiệm).

Tỉ lệ % ức chế thông qua số liệu chiều dài rễ, chiều dài thân, trọng lượng tươi, trọng lượng khô theo công thức

$$\% \text{ ỨC CHẾ } I = (L1 - L2) / L1 \times 100\%$$

$$\% \text{ ỨC CHẾ } I = (M1 - M2) / M1 \times 100\%$$

(Trong đó: I là tỷ lệ % ức chế, L1/M1 là chiều dài/trọng lượng trung bình của cây đối chứng và L2/M2 là chiều dài/trọng lượng trung bình của cây được xử lý).

2.2.4. Định lượng sắc tố quang hợp

Ta cho vào từng ống nghiệm lớn 2 g mẫu và thêm vào 10 mL acetone 80% (v/v), bịt kín và lắc đều. Sau đó, màng bọc thực phẩm được dùng bịt kín ống nghiệm để tránh acetone bay hơi. Sau thời gian

15 phút, 0,5 mL ở phần phía trên của dịch trích thu được được hút cho vào các ống nghiệm nhỏ và tiếp tục cho thêm 4,5 mL acetone 80%, bịt kín các ống nghiệm và lắc đều. Dịch trích được đo độ hấp thụ bằng quang phổ kế ở bước sóng 663,2; 646,8 và 470 nm.

Hàm lượng chlorophyll a, b và carotenoid tổng số được tính theo các công thức của Wellburn (1994):

$$C_a = (12,21 \times A_{663,2} - 2,81 \times A_{646,8}) \times \frac{10 \times 5}{2} \mu\text{g/gFW}$$

$$C_b = (20,13 \times A_{646,8} - 5,03 \times A_{663,2}) \times \frac{10 \times 5}{2} \mu\text{g/gFW}$$

$$C_{a+b} = [(1000 \times A_{470} - 3,27 \times C_a - 104 \times C_b) / 198] \times \frac{10 \times 5}{2} \mu\text{g/gFW}$$

Trong đó:

C_a hàm lượng diệp lục tố a (Chlorophyll a) trong lá (μ g/g lá tươi),

C_b hàm lượng diệp lục tố b (Chlorophyll b) trong lá (μ g/g lá tươi),

C_{a+b} hàm lượng carotenoid (caroten và xanthophyll) trong lá (μ g/g lá tươi),

$A_{663,2}$; $A_{646,8}$; A_{470} là giá trị đo được bằng máy đo quang phổ tương ứng với các bước sóng 663,2; 646,8 và 470 nm.

2.2.5. Khảo sát khả năng ảnh hưởng của cao chiết trầm ôi đến quá trình nguyên phân của tế bào

Xác định sự ảnh hưởng của cao chiết đến quá trình phân chia tế bào theo quy trình nhuộm với aceto-carmin (1%) được thực hiện như sau: rễ cải củ (hoặc rễ hành tím) được chọn lúc 8 – 9 giờ sáng, cho vào ống nghiệm có aceto-carmin, đun nhẹ trên đèn cồn từ 3 đến 5 phút. Mẫu vật sau khi đun được đặt lên kính mang vật, cắt lấy một đoạn phần chóp rễ (0,5 – 1 mm), đặt kính đậy vật, ấn nhẹ lên tiêu bản để các tế bào chóp rễ trải đều. Quan sát mẫu vật ở độ phóng đại 400 lần.

Phương pháp quan sát và đếm tế bào trên tiêu bản được thực hiện dựa theo Rank and Nielsen (1997), có hiệu chỉnh: ở mỗi tiêu bản, dùng vật kính 10X (độ phóng đại 100 lần) để tìm các thị trường có tế bào phân bố đồng đều trên một mặt phẳng, rõ ràng, nguyên vẹn và bắt màu tốt. Những thị trường đó sẽ được chụp hình lại ở vật kính độ phóng đại 400 lần để tiến hành quan sát và đếm tế bào. Các thị trường được tìm từ trái qua phải và trên xuống dưới và không quay trở lại để tránh một thị trường hoặc một phần thị trường bị chụp hai lần trở lên.

Các chỉ số nguyên phân được tính theo công thức:

Chỉ số nguyên phân MI ((Mitotic Index) được tính theo công thức của Nagaonkar et al. (2015) và Njagi and Gopalan (1981). Trong đó:

$$MI (\%) = \frac{\text{(Tổng số tế bào đang phân chia)}}{\text{(Tổng số tế bào quan sát)}} * 100$$

Tỷ lệ giảm MI được tính theo công thức của Nagaonkar et al. (2015):

$$\text{Tỷ lệ giảm MI (\%)} = \frac{\text{(MI đối chứng âm - MI xử lý cao chiết)}}{\text{MI đối chứng âm}} * 100$$

2.2.6. Khảo sát khả năng ức chế sinh trưởng và phát triển thực vật của cao chiết trầm ôi đến cấu trúc, độ dày vách tế bào

Xác định sự ảnh hưởng của cao chiết đến kích thước vách tế bào, theo phương pháp của Hương và ctv. (2016), với phẩm nhuộm là son phen – lục iod: phần thân của củ củ được cắt thành những lát mỏng, sử dụng javel để tẩy các nội chất bên trong tế bào trong thời gian 15 phút. Javel được rửa sạch bằng nước cất, tiếp tục mẫu được rửa bằng acid acetic 10% trong thời gian 5 phút. Acid acetic được rửa sạch bằng nước cất, tiến hành nhuộm mẫu với phẩm nhuộm son phen-lục iod và giữ từ 3 đến 5 phút. Rửa phẩm nhuộm và lưu trữ vi mẫu trong nước cất. Thực hiện quan sát tiêu bản ở độ phóng đại 400 lần.

Phương pháp nhuộm lugol:

Phương pháp nhuộm lugol được thực hiện dựa theo phương pháp của Von Arx et al. (2016). Thân củ củ được cắt mỏng, đặt mẫu lên kính mang vật, nhỏ thuốc nhuộm lugol lên mẫu, trong thời gian 2 phút, quan sát ở độ phóng đại 100 lần và chuyển sang độ phóng đại 400 lần để quan sát độ dày của vách tế bào.

Kích thước vách tế bào được tính theo công thức:

$$\text{Kích thước vách thực tế (mm)} = \frac{\text{Kích thước đo theo trục vi thị kính}}{\text{độ phóng đại của vật kính đang sử dụng (E40)}} * 100.$$

2.2.7. Các phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thô được nhập liệu và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Phần mềm Minitab 16 được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA). Các giá trị trung bình được so sánh bằng phương pháp Tukey với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định tính của một số hợp chất tự nhiên

Các cao chiết ethanol từ các bộ phận của cây trầm ôi có sự hiện diện các nhóm chất hóa học khác

nhau. Kết quả định tính các hợp chất này được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định tính một số nhóm chất tự nhiên trong cao chiết cây trầm ôi

Bộ phận	Thân	Lá	Hoa
Nhóm chất			
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Phenol	+	+	+
Saponin	+	+	+
Coumarin	+	+	+

Dấu (+): có sự hiện diện các hợp chất.

Kết quả định tính cho thấy, các cao chiết từ cây trầm ôi có chứa các nhóm chất như: alkaloid, flavonoid, phenol, saponin, coumarin. Những hợp chất này hiện diện ở nhiều loài thực vật và được chứng minh là có các hoạt tính sinh học khác nhau. Trong đó các nhóm chất flavonoid, phenol, và coumarin được cho là có hoạt tính ức chế thực vật (Sardhara & Gopal, 2013). Nghiên cứu của Mishra (2015) chứng minh coumarin có khả năng ức chế sự tạo ra gibberellin vì thế có thể làm giảm tăng dài và sự phân cắt tế bào của nảy mầm cây. Một số flavonoid có thể ức chế sự hấp thụ khoáng chất. Nhiều hợp chất phenolic có thể làm thay đổi sự cân bằng nội môi, trong một số trường hợp nhất định sẽ dẫn đến ức chế sự phát triển của thực vật.

3.2. Hàm lượng flavonoid, phenolic tổng

Kết quả định lượng phenolic và flavonoid tổng số được trình bày trong Bảng 2. Hai hợp chất này là một trong các hợp chất hóa sinh học “allelochemicals” có khả năng ức chế các quá trình sinh trưởng và phát triển của một số loài thực vật.

Số liệu Bảng 2 cho thấy, cả hai nhóm chất phenolic và flavonoid đều hiện diện trong cao chiết thân, lá và hoa của cây trầm ôi. Hàm lượng phenolic tổng số của các bộ phận lá, thân và hoa lần lượt là 99,63 mg GAE/g cao chiết, 163,95 mg GAE/g cao chiết và 239,13 mg GAE/g cao chiết. Bên cạnh đó, hàm lượng flavonoid tổng số của bộ phận lá 47,325 mg QE/g cao chiết, của bộ phận thân là 60,31 mg QE/g cao chiết và bộ phận hoa 114,841 mg QE/g cao chiết. Cao chiết từ bộ phận hoa có hàm lượng flavonoid và phenolic cao hơn cao chiết từ bộ phận thân và lá. Như vậy, có thể kết luận rằng cao chiết từ các bộ phận của cây trầm ôi có hiện diện các nhóm chất flavonoid, phenolic với các hàm lượng khác nhau. Chúng là các hợp chất hóa sinh có thể gây ức chế khả năng nảy mầm, sinh trưởng và phát triển của các loài thực vật khác.

Bảng 2. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng số

Cao chiết	Hàm lượng phenolic (mg GAE/g cao chiết)	Hàm lượng flavonoid (mg QE/ g cao chiết)
Thân	163,95 ± 5,23 ^b	60,31 ± 0,69 ^b
Lá	99,63 ± 3,46 ^c	47,33 ± 1,34 ^c
Hoa	239,13 ± 0,763 ^a	114,84 ± 2,39 ^a
Phương trình hồi quy	y = 0,0042x + 0,005 (R ² = 0,9971)	y = 0,0653x - 0,0296 (R ² = 0,998)

Ghi chú: Số liệu là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các số có chữ cái theo sau không giống nhau thì khác biệt có ý nghĩa 5% qua kiểm định Tukey.

3.3. Hiệu quả ức chế nảy mầm hạt các cao chiết từ cây trám ôi

Khả năng ức chế nảy mầm hạt củ của các cao chiết từ cây trám ôi được khảo sát ở các nồng độ 1; 2,5; 5 và 7,5 mg/mL. Kết quả cho thấy các cao chiết đều có khả năng ức chế sự nảy mầm của hạt củ. Mức độ ức chế nảy mầm tỷ lệ thuận với các nồng độ thử nghiệm, nồng độ càng cao thì hiệu quả ức chế sự nảy mầm càng tăng. Phần trăm tỷ lệ ức chế nảy mầm của ba loại cao chiết thân, lá và hoa được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Phần trăm ức chế nảy mầm hạt củ của các cao chiết từ cây trám ôi

Nghiệm thức	Phần trăm ức chế (%)
Đối chứng	0 ^{ef}
T1	2,22 ± 11,10 ^{ef}
T2,5	27,33 ± 2,52 ^{bcd}
T5	23,56 ± 3,86 ^{cdef}
T7,5	43,11 ± 5,24 ^{bc}
L1	-1,11 ± 10,60 ^f
L2,5	14,44 ± 7,78 ^{def}
L5	24,89 ± 4,15 ^{bcd}
L7,5	40,22 ± 2,12 ^{bcd}
H1	20,22 ± 2,12 ^{cdef}
H2,5	33,11 ± 1,74 ^{bcd}
H5	51,78 ± 2,89 ^{ab}
H7,5	72,67 ± 7,73 ^a

Ghi chú: Nghiệm thức đối chứng là nghiệm thức không sử dụng cao chiết. Các chữ cái T, L, H thể hiện các nghiệm thức của cao chiết thân, lá và hoa cây trám ôi được khảo sát ở nồng độ 1; 2,5; 5 và 7,5 mg/mL. Các số có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% qua kiểm định Tukey. Giá trị âm thể hiện tác động kích thích tăng trưởng.

Từ các số liệu ở Bảng 3 cho thấy, nồng độ 7,5 mg/mL ở ba bộ phận thân, lá và hoa của cao chiết từ cây trám ôi cho hiệu quả ức chế nảy mầm hạt củ cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Chính vì thế, có thể nhận định các cao chiết từ cây trám ôi có khả năng ức chế nảy mầm thực vật và chúng là một loài cây tiềm năng trong các nghiên cứu về hiện tượng allelopathy đối với các loài thực vật khác.

3.4. Hiệu quả ức chế sự tăng trưởng thực vật của các cao chiết từ cây trám ôi

Các cao chiết từ cây trám ôi có tác động ức chế đáng kể đến sự tăng trưởng chiều dài rễ, chiều dài thân, trọng lượng tươi và trọng lượng khô của củ củ. Hiệu quả ức chế sự tăng trưởng thực vật các cao chiết từ cây trám ôi được trình bày ở Bảng 4.

Ở nồng độ 7,5 mg/mL, hiệu quả ức chế chiều dài rễ của cao chiết bộ phận hoa lên đến 91,91%. Hiệu quả ức chế chiều dài thân của các cao chiết lá, thân và hoa lần lượt là 41,17%; 43,50% và 55,71%. Tương tự, hiệu quả ức chế trọng lượng tươi của các cao chiết lá, thân và hoa là 62,99%; 73,39% và 95,14%. Bên cạnh đó, cao chiết hoa cũng cho hiệu quả ức chế trọng lượng khô cao nhất là 51,60%. Theo nghiên cứu của Zhang et al. (2015) thì các chỉ tiêu về chiều dài rễ, chiều dài thân, trọng lượng tươi và trọng lượng khô phản ánh sự tăng trưởng và phát triển của thực vật. Do đó, có thể nói các cao chiết từ cây trám ôi đặc biệt cao chiết từ bộ phận hoa có khả năng ức chế sự tăng trưởng và phát triển của hạt củ củ.

Bảng 4. Hiệu quả ức chế sự tăng trưởng thực vật của các cao chiết từ cây trâm ôi

Nghiệm thức	Hiệu quả ức chế (%)			
	Chiều dài rễ	Chiều dài thân	Trọng lượng tươi	Trọng lượng khô
Đối chứng	0 ^f	0 ^e	0 ^h	0 ^{gh}
T1	28,48±0,88 ^e	9,32±5,66 ^{de}	28,93±0,55 ^f	2,62 ±7,72 ^{fgh}
T2,5	50,47±3,61 ^{cd}	23,29±5,32 ^{cd}	40,95±1,44 ^e	18,66±2,94 ^{de}
T5	75,36±2,06 ^{ab}	32,12±3,15 ^{bc}	58,51±0,71 ^{cd}	33,68±0,73 ^{bcd}
T7,5	82,07±4,13 ^{ab}	43,50±0,87 ^{ab}	73,39±0,45 ^b	43,12±1,62 ^{ab}
T1	28,10±0,19 ^e	4,21±7,48 ^e	19,26±0,26 ^g	-2,92±6,98 ^h
T2,5	48,92±1,20 ^{cd}	26,74±6,60 ^{bcd}	26,23±0,31 ^{fg}	13,14±2,13 ^{efg}
T5	68,33±3,17 ^{bc}	29,61±2,56 ^{bc}	38,68±0,53 ^e	24,03± 1,21 ^{cde}
T7,5	71,81 ±1,80 ^b	41,17±1,02 ^{abc}	62,99±2,77 ^c	35,11±1,18 ^{bc}
T1	43,32±4,04 ^{de}	28,76±0,66 ^{bc}	37,66±3,12 ^e	18,31±1,02 ^{def}
T2,5	71,13±9,95 ^b	36,93±0,99 ^{bc}	52,03±1,30 ^d	32,56±2,95 ^{bcd}
T5	83,57±4,83 ^{ab}	37,61±0,08 ^{abc}	75,96±1,36 ^b	47,76±0,30 ^{ab}
T7,5	91,91±5,58 ^a	55,71±1,79 ^a	95,14±1,99 ^a	51,60±1,66 ^a

Ghi chú: Nghiệm thức đối chứng là nghiệm thức không sử dụng cao chiết. Các chữ cái T, L, H thể hiện các nghiệm thức của cao chiết thân, lá và hoa của cây trâm ôi được khảo sát ở nồng độ 1; 2,5; 5 và 7,5 mg/mL. Các số có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% qua kiểm định Tukey. Giá trị âm thể hiện tác động kích thích tăng trưởng.

3.5. Các cao chiết từ cây trâm ôi ảnh hưởng đến sự phân chia tế bào trong quá trình nguyên phân

Hiệu quả ức chế của các cao chiết từ cây trâm ôi ảnh hưởng đến sự phân chia của tế bào trong quá trình nguyên phân, được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Thống kê tỉ lệ MI và tỷ lệ giảm MI của các cao chiết từ cây trâm ôi

Nghiệm thức	Hiệu quả ức chế (%)	
	Tỷ lệ MI	Tỷ lệ giảm MI
ĐC	46,00±3,21 ^a	0 ^b
T5	33,33±1,45 ^b	27,13±3,81 ^{ab}
L5	36,67±3,18 ^{ab}	19,35±9,33 ^b
H5	20,67±2,19 ^c	54,16±7,63 ^a

Ghi chú: Số liệu là các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại ± sai số chuẩn. Các chữ cái T, L, H thể hiện các nghiệm thức của cao chiết thân, lá và hoa của cây trâm ôi được khảo sát ở nồng độ 5 mg/mL. Các số có chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% qua kiểm định Tukey.

Chỉ số nguyên phân MI (Mitotic Index) được Champy (1922) đề xuất để chỉ tỷ lệ các tế bào đang ở các giai đoạn của quá trình nguyên phân trên tổng tất cả các tế bào trong đơn vị quan sát. Đây là một tiêu chuẩn quan trọng của sự sinh trưởng và còn được xem là một tham số để thiết lập tần số phân chia nguyên nhiễm của tế bào (Asita & Mokhobo, 2013).

Trong thí nghiệm này, các cao chiết từ cây trâm ôi cho tỷ lệ MI giảm so với đối chứng. Cao chiết ở

bộ phận hoa có chỉ số nguyên phân thấp nhất là 20,67%, tiếp theo là cao chiết ở thân 33,33% và lá 46,00%. Ngược lại, tỷ lệ giảm MI thì cao chiết hoa có tỷ lệ phần trăm cao nhất là 54,13%, sau đó là thân với 27,13% và cuối cùng là cao chiết từ bộ phận lá 19,35%. Qua tỷ lệ giảm MI cho thấy các cao chiết từ cây trâm ôi có hiệu quả ức chế sự phân chia tế bào ở quá trình nguyên phân. Do đó, có thể cho rằng các cao chiết từ cây trâm ôi có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển bình thường của hạt cải củ.

Trong khảo sát này ghi nhận sự hiện diện của các kỳ đang trong giai đoạn phân chia, tuy nhiên do kích thước tế bào nguyên phân ở rễ cải củ rất nhỏ và khó nhận diện để phân biệt các kỳ phân chia. Chính vì thế, để quan sát rõ sự hiện diện của các giai đoạn nguyên phân cũng như quan sát các sai lệch NST, ở quá trình này được thực hiện trên đối tượng là hành tím, với phương pháp tương tự như ở đối tượng cải củ. Kết quả cho thấy, ở nồng độ 5 mg/mL các cao chiết từ cây trâm ôi có thể gây ảnh hưởng đến quá trình nguyên phân của rễ hành tím (*Allium ascalonicum*) và làm xuất hiện các sai lệch trên nhiễm sắc thể (NST). Các sai lệch NST được xác định dựa trên nghiên cứu Thảo và Anh (2018). Theo đó, các sai lệch NST được ghi nhận là tế bào lệch cực, rối loạn NST, rối loạn kì giữa và kì sau NST và đứt gãy NST. Nghiên cứu của Mushtaq et al. (2019) nhận định rằng cùng với tỉ lệ giảm MI thì allelopathy cũng có thể dẫn đến sai lệch NST do các hợp chất hóa sinh gây độc tế bào có thể ảnh hưởng đến cơ chế phân chia của chu kì tế bào. Cụ thể, trong nghiên cứu của Gulzar and Siddiqui (2014) và Gulzar et al.

(2016), đã xác nhận tác dụng của các chất hóa sinh phenolics đối với siêu cấu trúc và biến đổi tế bào học trên *Allium cepa* L. Trong số 10 hợp chất chính được chuyển đổi từ nghiên cứu thì 4-*tert*-butylcalix [4] arene được tìm thấy với thành phần cao nhất (19,89%). Các dẫn xuất khác nhau của calix [4] arene được biết là tạo ra các sai lệch nhiễm sắc thể trong tế bào mô phân sinh rễ của *Allium cepa*.

3.6. Khả năng ức chế thực vật của các cao chiết từ cây trâm ôi đến độ dày, cấu trúc vách tế bào

Các tế bào được nhuộm với thuốc thử lugol được quan sát nhận thấy sự xuất hiện của các hạt vật chất khác nhau. Các tế bào có xử lý cao chiết thì các hạt vật chất hiện diện nhiều và dày đặc hơn ở tế bào đối chứng. Thông qua sự hiện diện của các hạt vật chất này bước đầu xác định các cao chiết từ cây trâm ôi có tác động đến cấu trúc tế bào. Các hạt vật chất bắt màu đen với lugol có thể là các chất dinh dưỡng như tinh bột hay carbohydrate và các phân tử giọt dầu có màu gần như trong suốt.

Độ dày của vách tế bào ở nghiệm thức đối chứng mỏng hơn vách tế bào ở nghiệm thức có sử dụng các cao chiết từ cây trâm ôi. Điều này chứng minh các cao chiết từ cây trâm ôi có khả năng tác động đến độ dày vách tế bào. Kết quả phân tích độ dày vách tế bào được trình bày ở Bảng 6 cho thấy sự khác biệt giữa các tế bào các nghiệm thức cao chiết so với đối chứng. Trong đó, vách tế bào ở cao chiết của bộ phận hoa có độ dày lớn hơn các nghiệm thức còn lại, lên đến 109,58 µm.

Bảng 6. Kích thước vách tế bào của các tế bào có sử dụng cao chiết và đối chứng

Nghiệm thức	Độ dày vách tế bào (µm)
Đối chứng	44,17 ± 2,64 ^d
T5	94,17 ± 4,22 ^b
L5	79,17 ± 2,93 ^c
H5	109,58 ± 3,50 ^a

Ghi chú: Số liệu là các giá trị trung bình của 5 lần lặp lại ± sai số chuẩn. Các chữ cái T, L, H thể hiện các nghiệm thức của cao chiết thân, lá và hoa của cây trâm ôi được khảo sát ở nồng 5 mg/mL. Các số có chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 5 % qua kiểm định Tukey.

Từ kết quả thí nghiệm trên cho thấy được các cao chiết từ cây trâm ôi có khả năng làm tăng độ dày vách tế bào. Chiết xuất từ lá của trâm ôi cũng có khả năng thay đổi tính thấm màng tế bào và làm tăng hoạt động của các dạng phản ứng oxy hóa trên xà lách (*Lactuca sativa* L.) (Kato-Noguchi & Kurniadie, 2021). Zang et al. (2015) chỉ ra rằng,

allelochemicals có thể ức chế hoạt động của các enzyme kháng oxy hóa và tăng mức độ gốc tự do, dẫn đến quá trình peroxy hóa lipid màng lớn hơn và thay đổi điện thế màng, gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển bình thường của thực vật.

3.7. Ảnh hưởng của cao chiết từ các bộ phận của cây trâm ôi đến khả năng quang hợp của thực vật

Các cao chiết từ cây trâm ôi có khả năng ức chế quá trình quang hợp của thực vật bằng việc làm giảm hàm lượng các sắc tố quang hợp như chlorophyll a, b và carotenoid. Kết quả định lượng các sắc tố quang hợp của cải củ được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Hàm lượng sắc tố quang hợp trung bình của cải củ sau 7 ngày xử lý bằng cao chiết từ cây trâm ôi

Nghiệm thức	Các sắc tố quang hợp (µg/g lá tươi)		
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotenoid
Đối chứng	20,24± 0,61 ^a	24,45±1,01 ^a	6,24±0,22 ^a
T5	17,24±0,97 ^c	21,75±0,77 ^b	2,55±0,38 ^b
L5	18,75±0,34 ^b	21,89±0,40 ^b	2,35±0,48 ^b
H5	16,74±0,36 ^c	21,90±0,67 ^b	0,53±0,29 ^c

Ghi chú: Số liệu là các giá trị trung bình của 5 lần lặp lại ± sai số chuẩn. Các chữ cái T, L, H thể hiện các nghiệm thức của cao chiết thân, lá và hoa của cây trâm ôi được khảo sát ở nồng 5 mg/mL. Các số có chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 5 % qua kiểm định Tukey.

Từ Bảng 7 cho thấy, hàm lượng sắc tố chlorophyll a tại các nghiệm thức được xử lý bằng cao chiết thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Cao chiết của hoa và thân làm giảm hàm lượng chlorophyll a khoảng 1,2 lần so với đối chứng. Tương tự đối với hàm lượng chlorophyll b, các nghiệm thức có xử lý cao chiết cũng thấp hơn nghiệm thức đối chứng. Sắc tố carotenoid từ nghiệm thức được xử lý bằng cao chiết lá và thân thấp hơn khoảng 2,4 lần và từ nghiệm thức hoa thấp hơn khoảng 11,8 lần so với nghiệm thức đối chứng. Việc làm giảm hàm lượng các sắc tố trên sẽ ức chế sự sinh trưởng và phát triển thực vật (Batish et al., 2006).

Có thể kết luận rằng, các cao chiết từ cây trâm ôi gây ức chế quá trình quang hợp và ảnh hưởng đến việc tạo ra sản phẩm quang hợp là những nguyên liệu cơ bản hợp chất hữu cơ cần thiết, để cung cấp cho các quá trình biến dưỡng của tế bào. Chính những thay đổi này, đã tác động trực tiếp đến quá trình sinh trưởng và phát triển ở thực vật.

4. KẾT LUẬN

Cao chiết ở cả ba bộ phận thân, lá và hoa của cây trâm ôi đều có chứa các hợp chất như: flavonoid, alkaloid, phenolic, saponin, coumarin và hàm lượng flavonoid và phenolic cũng cao nhất ở bộ phận hoa. Các cao chiết từ trâm ôi có khả năng ức chế nảy mầm hạt cải củ và thể hiện hiệu quả ức chế chiều dài

rễ, chiều dài thân, trọng lượng tươi và trọng lượng khô, trong đó cao chiết hoa cho khả năng ức chế cao nhất. Bên cạnh đó, các cao chiết còn gây ra các tác động tiêu cực đến sự sinh trưởng và phát triển thực vật bằng việc ức chế sự phân chia tế bào trong quá trình nguyên phân, tăng độ dày vách tế bào và làm giảm hàm lượng các sắc tố quang hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Albuquerque, M. B., Dos Santos, R. C., Lima, L. M., Melo Filho, P. D. A., Nogueira, R. J. M. C., Da Camara, C. A. G., & Ramos, A. D. R. (2011). Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agronomy Sustainable Development*, 31(2), 379–395. <https://doi.org/10.1051/agro/2010031>
- Asita, A. O., & Mokhobo, M. M. (2013). Clastogenic and cytotoxic effects of four pesticides used to control insect pests of stored products on root meristems of *Allium cepa*. *Environment and Natural Resources Research*, 3(2), 133. <https://doi.org/10.5539/enrr.v3n2p133>
- Batish, D. R., Singh, H. P., Rana, N., & Kohli, R. K. (2006). Assessment of allelopathic interference of *Chenopodium album* through its leachates, debris extracts, rhizosphere and amended soil. *Arch. Agron. Soil Sci.* 52, 705–715. <https://doi.org/10.1080/03650340601037119>
- Champy, C. (1922). *L'action de l'extrait thyroïdien sur la multiplication cellulaire: caractère électif de cette action* (Vol. 4). Libr. O. Doin.
- Cheng, F., & Cheng, Z. (2015). Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01020>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010-3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Gharde, Y., Singh, P. K., Dubey, R. P., & Gupta, P. K. (2018). Assessment of yield and economic losses in agriculture due to weeds in India. *Crop Protection*, 107, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.01.007>
- Gulzar, A., & Siddiqui, M. B. (2014). Evaluation of allelopathic effect of *Eclipta alba* (L.) Hassk on biochemical activity of *Amaranthus spinosus* L., *Cassia tora* L. and *Cassia sophera* L. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8(1), 1-5. <https://doi.org/10.5897/AJEST2013.1617>
- Gulzar, A., Siddiqui, M. B., & Bi, S. (2016). Phenolic acid allelochemicals induced morphological, ultrastructural, and cytological modification on *Cassia sophera* L. and *Allium cepa* L. *Protoplasma*, 253(5), 1211-1221. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0862-x>
- Heap, I. (2014). Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Management Science*, 70(9), 1306-1315.
- Hương, N. T. N., Hùng, T., & Đẹp, T. T. (2016). Tìm hiểu các biến đổi hình thái trong sự phát sinh rễ Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* HT Tsai et KM Feng) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu định tính oleanolic acid trong rễ tạo thành. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14(1), 49-54.
- Hussain, A., Ding, X., Alariqi, M., Manghwar, H., Hui, F., Li, Y., Cheng, J., Wu, C., Cao, J., & Jin, S. (2021). Herbicide resistance: another hot agronomic trait for plant genome editing. *Plants*, 10(4), 621. <https://doi.org/10.3390/plants10040621>
- Julio, A., Tandoc, W. C., Tipace, H. D., Vendivil, Y. F., Yanesa Z., Tare M. V. R., Lactaoen, E. J., & Clemente, K. J (2019). Allelopathic effect of *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* leaf extracts on plant germination. *Asian J. Agric. Biol.* 7, 190–196.
- Kato-Noguchi, H., & Kurniadie, D. (2021). Allelopathy of *Lantana camara* as an Invasive plant. *Plants*, 10(5), 1028. <https://doi.org/10.3390/plants10051028>
- Li, J., Chen, L., Chen, Q., Miao, Y., Peng, Z., Huang, B., Guo, L., Liu, L., & Du, H. (2021). Allelopathic effect of *Artemisia argyi* on the germination and growth of various weeds. *Scientific Reports*, 11(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83752-6>
- Macías, F. A., Mejías, F. J., & Molinillo, J. M. (2019). Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications. *Pest Management Science*, 75(9), 2413-2436. <https://doi.org/10.1002/ps.5355>
- Mến, T. T., Cường, N. Q., Thu, N. T. A., Quỳn, P. L. T., Phuong, P. C., Lê, T. N. C., Yên, N. Đ. H., & Khang, Đ. T. (2019). Nghiên cứu khả năng ức chế nảy mầm hạt của cao chiết xuất từ cây sài đất ba thùy (*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(Đ)

- Công nghệ Sinh học), 85-90.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jsci.2019.011>
- Mishra, A. (2015). Allelopathic properties of *Lantana camara*. *International Research Journal of Basic and Clinical Studies*, 3(1), 13-28.
- Mushtaq, W., Ain, Q., Siddiqui, M. B., & Hakeem, K. R. (2019). Cytotoxic allelochemicals induce ultrastructural modifications in *Cassia tora* L. and mitotic changes in *Allium cepa* L.: a weed versus weed allelopathy approach. *Protoplasma*, 256(3), 857-871.
<https://doi.org/10.1007/s00709-018-01343-1>
- Nagaonkar, D., Shende, S., & Rai, M. (2015). Biosynthesis of copper nanoparticles and its effect on actively dividing cells of mitosis in *Allium cepa*. *Biotechnology Progress*, 31(2), 557-565. <https://doi.org/10.1002/btpr.2040>
- Peng, Z., Bhattarai, K., Parajuli, S., Cao, Z., & Deng, Z. (2019). Transcriptome analysis of young ovaries reveals candidate genes involved in gamete formation in *Lantana camara*. *Plants*, 8(8), 263. <https://doi.org/10.3390/plants8080263>
- Rank, J., & Nielsen, M. H. (1997). *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390(1-2), 121-127.
[https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00008-6](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00008-6)
- Sardhara, R. A., & Gopal, S. (2013). Qualitative phytochemical screening of different solvent extracts of *Tinospora cordifolia* stem and *Lantana camara* flower. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 3(5), 210-213.
- Saxena, M. K. (2000). Aqueous leachate of *Lantana camara* kills water hyacinth. *J. Chem. Ecol.* 26:2435–2447.
<https://doi.org/10.1023/A:1005539230307>
- Sofowora, A. (1993). Screening plants for bioactive agents. *Medicinal Plants and Traditional Medicinal in Africa. 2nd Ed. Spectrum Books Ltd, Sunshine House, Ibadan, Nigeria*, 134-156.
- Spiassi, A., Nóbrega, L. H. P., Rosa, D. M., Pacheco, F. P., Senem, J., Piccolo De Lima, G. (2015). Allelopathic effects of pathogenic fungi on weed plants of soybean and corn crops. *Bioscience Journal*, 31(4), 1037–1048.
<https://doi.org/10.14393/BJ-v31n4a2015-26142>
- Thảo, N. T., & Anh, N. T. N. (2018). Ảnh hưởng của chế phẩm Regent 800WG đến hoạt động phân chia và nhiễm sắc thể trong quá trình nguyên phân ở tế bào rễ hành lá-*Allium fistulosum* L. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(3), 94-101.
- Thi, H. L., Lin, C. H., Smeda, R. J., Leigh, N. D., Wycoff, W. G., & Fritsch, F. B. (2015). Kết quả chiết xuất và định danh chất đối kháng cỏ dại *Ntrans-cinnamoyltyramine* từ giống lúa OM5930. *Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia về Khoa học Cây trồng lần thứ hai*, 1151-1156.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-106.
- Von Arx, G., Crivellaro, A., Prendin, A. L., Čufar, K., & Carrer, M. (2016). Quantitative wood anatomy—practical guidelines. *Frontiers in Plant Science*, 7, 781.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00781>
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Zhang, G. Y., Liu, R. R., Zhang, C. Q., Tang, K. X., Sun, M. F., Yan, G. H., & Liu, Q. Q. (2015). Manipulation of the rice L-galactose pathway: evaluation of the effects of transgene overexpression on ascorbate accumulation and abiotic stress tolerance. *PLoS One*, 10(5), e0125870.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125870>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S03088146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S03088146(98)00102-2)