

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG BIỂU HIỆN TẠM THỜI GIAN *GUS* TRÊN BÈO TẮM *SPIRODELA POLYRRHIZA*

Phùng Thị Thu Hà¹, Nguyễn Thị Khánh Vân¹, Lê Huy Hàm¹

TÓM TẮT

Bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* thuộc họ Lemnaceae là một trong số các loài thực vật được quan tâm nghiên cứu sử dụng làm cây chủ để sản xuất các hoạt chất sinh học. Các kết quả nghiên cứu này đã chỉ ra rằng có thể chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* vào bèo tấm nguyên cây. Hàng loạt các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen đã được nghiên cứu. Chúng vi khuẩn AGL-1 được xác định cho hiệu quả chuyển gen cao nhất (đạt 15,88%). Các yếu tố như mật độ tế bào vi khuẩn, chất dẫn dụ acetosyringon, thời gian ly tâm chân không, thời gian đồng nuôi cấy cũng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả chuyển gen. Các yếu tố này đang được tối ưu nhằm nâng cao hiệu quả chuyển gen.

Từ khóa: *Agrobacterium*, bèo tấm, chuyển gen, Lemnaceae, *Spirodela polyrrhiza*.

I. DẶT VẤN ĐỀ

Trong số các loài thực vật được nghiên cứu để sử dụng làm hệ thống sản xuất protein, các loài bèo tấm thuộc họ *Lemnaceae* đang được đặc biệt chú ý bởi các ưu điểm sau: rất dễ nuôi trồng, không phụ thuộc vào thời vụ, chúng phân bố rộng rãi trên toàn thế giới, ở nhiều vùng khí hậu khác nhau. Bèo tấm có hàm lượng protein trong một đơn vị trọng lượng khá cao, đạt từ 6,8 - 45% với thành phần axit amin và các vitamin phong phú, thời gian nhân đôi ngắn, từ 24 - 72h tùy thuộc từng loài (Landolt, 1986). Do đó, bèo tấm có thể sản xuất được một lượng lớn protein trong một thời gian ngắn với chi phí thấp (Landolt & Kandeler, 1987). Vì vậy sử dụng bèo tấm làm đối tượng chuyển gen để sản xuất các loại protein tái tổ hợp có giá trị cao với giá thành thấp là một hướng nghiên cứu triển vọng (Edelman *et al*, 1999).

Thông thường, các thí nghiệm chuyển gen vào thực vật được thực hiện sau khi đã xây dựng thành công hệ thống tái sinh trên đối tượng loài đó. Vật liệu sử dụng trong chuyển gen là các mảnh cắt lá, thân hoặc mô sẹo. Tuy nhiên, việc xây dựng hệ thống tái sinh ở một số loài cây còn gặp nhiều khó khăn.

Dưới đây là kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng biểu hiện tạm thời gen *gus* trên bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* nhằm xây dựng hệ thống chuyển gen nguyên cây cho mục đích sử dụng chúng làm cây chủ để sản xuất một số dược chất dùng trong nông nghiệp và y tế.

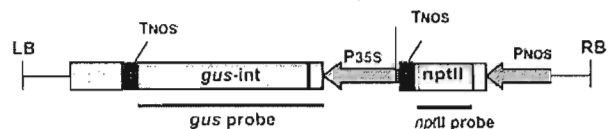
II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

a. *Nguyên liệu thực vật*: Dòng bèo *Spirodela polyrrhiza* (SP) thu thập ở địa bàn Hà Nội và được gửi đi phân loại, định danh ở Viện Địa thực vật, Học viện Liên bang Thụy Sĩ. Vật liệu vô trùng thu được khi khử trùng bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% trong thời gian 2 phút. Bèo tấm này được nhân trong môi trường đ khoáng Hutner (Hutner, 1953) bổ sung 10 g sucroza, có thạch hoặc môi trường lỏng, không có thạch, pH = 6.

b. *Vật liệu vi khuẩn*: Để đánh giá tính đặc hiệu của các chủng vi khuẩn lên khả năng lây nhiễm, đã sử dụng 5 chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* là: AA6, EHA105, AGL-1, LBA4404, GV3101.

Chủng AA6 mang vector nhị thể pBINGUSINTsbAvirG726pm (hình 1). Nằm trong vùng giới hạn bởi bờ trái (LB) và bờ phải (RB) là các gen chỉ thị sàng lọc (*gus-int*) và gen chỉ thị chọn lọc (*nptII*-gen kháng kanamycine). Gen *gus-int* được điều khiển bởi promoter (chất hoạt hóa) P35S còn gen *nptII* được điều khiển bởi promoter Pnos, cả hai đều có đoạn mã kết thúc là Tnos.

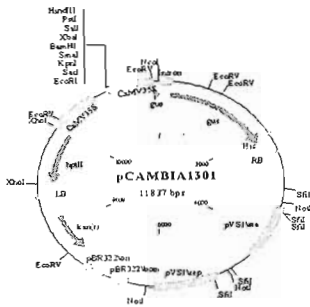


Hình 1. Cấu trúc của đoạn T-ADN trong vector nhị thể BINGUSINTsbAvirG726pm

Chủng EHA105, AGL-1, LBA4404, GV3101 mang vector nhị thể (hình 2). Trong vùng T-ADN có gen chỉ thị sàng lọc là gen *gus*, gen này được chia thành

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp.

2 exon là *gus first exon* và *gusA second exon* phân cách nhau bởi đoạn intron catalaza. Promoter của gen *gus* là CaMV35S, đoạn kết thúc là chuỗi NOS polyA. Chỉ thị chọn lọc thực vật là gen *hptII* (gen kháng hygromycine) được điều khiển bởi CaMV35S, kết thúc bởi chuỗi polyadenine. Ngoài ra, trên vector còn có gen chỉ thị chọn lọc vi khuẩn *kanamycine(r)*, đoạn khởi đầu phiên mã vector pBR322 ori.



Hình 2. Cấu trúc của đoạn T-ADN trong vector nhệ thể pCambia1301

2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn: Cây trái *Agrobacterium* cất giữ trong glycerin (-20°C) trên đĩa môi trường LB hoặc YEB đặc, pH = 7, có bổ sung kháng sinh thích hợp, nuôi ở 28°C trong 2-3 ngày. Sau đó lấy 1 khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trong 5 ml môi trường LB hoặc YEB lỏng có bổ sung kháng sinh thích hợp, nuôi lắc 200 vòng/ phút, 28°C, nuôi qua đêm. Ly tâm dịch huyền phù vi khuẩn nuôi cấy (5000 vòng/phút, ở 4°C, 5 phút). Loại bỏ dịch nổi và hoà tan cặn vi khuẩn trong môi trường LB hoặc YEB và điều chỉnh mật độ vi khuẩn đạt tới OD₆₀₀ ≈ 0,5-1,0.

Lây nhiễm vi khuẩn với bèo và nuôi cộng sinh: Các cánh bèo từ đĩa nuôi cấy được nhiễm vào dịch vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã chuẩn bị.

Đồng nuôi cấy: rửa lại mẫu bèo sau lây nhiễm bằng nước cất khử trùng, sau đó chuyển mẫu bèo sang 50 ml môi trường đ khoáng Hutner (H/2) bổ sung 200 μM AS, không có đường.

Tái sinh bèo đã chuyển gen: Cấy chuyển bèo đã chuyển gen sang một trường H/2 lỏng bổ sung 10 g/l đường và 250 μM cefotaxim, nuôi sáng ở 25°C, cấy chuyển 2 – 3 lần.

Chọn lọc bèo chuyển gen: cấy chuyển bèo sang môi trường H/2 bổ sung 10 g/l đường. Nhân và cấy chuyển 4 – 5 ngày /chu kỳ. Cấy chuyển bèo sang môi trường H/2 đặc bổ sung 5 mg/ l gieneticin.

Bèo tấm là loài thực vật có hoa nhỏ nhất trong giới thực vật, có cấu trúc cơ thể thuyền giảm so với các loài thực vật bậc cao khác: chỉ có rễ và cánh bèo. Bèo tấm sinh sản chủ yếu bằng phương pháp mọc cánh con rồi tách ra khỏi cánh mẹ. Trên cơ sở đặc điểm này đã sử dụng nguyên cây bèo là nguyên liệu để biến nạp.

Quan sát biểu hiện tạm thời của gen GUS

Mẫu bèo đồng nuôi cấy trên môi trường H/2 + 10 g/l sucroza, pH = 6 trong 3 ngày, sau đó được nhuộm X-GLUC để quan sát biểu hiện của gen *gus* theo phương pháp của Jefferson và cộng sự (1987). Mẫu được tính là có biểu hiện tạm thời khi có ít nhất một điểm màu xanh chàm đặc trưng của gen *gus*.

Tỉ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* được tính như sau :

$$TEE = \frac{TEF}{TDF} \times 100 (\%)$$

Trong đó: TEE (transient expression efficiency – hiệu lực biểu hiện tạm thời), TTF (total of expression fronds – Tổng cánh biểu hiện), TDF (total of dying fronds – tổng cánh nhuộm).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Chọn lọc chủng vi khuẩn thích hợp cho chuyển gen vào bèo tấm SP nguyên cây

Để đánh giá ảnh hưởng của các chủng *Agrobacterium tumefaciens* khác nhau đến tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm SP trong nghiên cứu này đã sử dụng 5 chủng vi khuẩn: EHA105, LBA4404, GV3101, AGL-1 và AA6. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1 và hình 3.

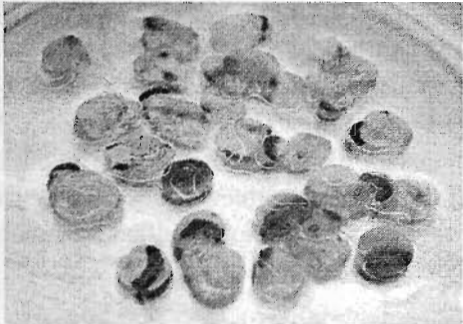
Bảng 1. Xác định chủng vi khuẩn thích hợp cho chuyển gen vào bèo tấm SP nguyên cây

CT	Chủng vi khuẩn	Tỷ lệ biểu hiện tạm thời (%)	Mức độ biểu hiện
1	LBA 4404	7,50	Đậm vừa
2	GV 3101	8,28	Đậm vừa
3	EHA105	2,54	Hơi đậm
4	AA6	5,49	Hơi đậm
5	AGL-1	15,88	Đậm vừa
Đ/C	Môi trường YEB	0	-

Trong số 5 chủng vi khuẩn sử dụng trong thí nghiệm thì chủng AGL-1 cho tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở SP nguyên cây đạt cao nhất là 15,88%, mức độ biểu hiện màu xanh chàm đậm vừa. Tỷ lệ

biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở hai chủng LBA4404 và GV3101 sai khác không nhiều (lần lượt là 7,50% và 8,28%). Chủng EHA105 cho tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* thấp nhất 2,54%, mức độ biểu hiện nhạt hơn so với các chủng vi khuẩn còn lại. Sự khác biệt rõ rệt về tỷ lệ và mức độ biểu hiện tạm thời giữa các chủng vi khuẩn cho phép kết luận rằng chủng *Agrobacterium* có tính đặc hiệu đối với mỗi phương thức lây nhiễm nhất định.

Do đó đã lựa chọn chủng AGL-1 để sử dụng cho biến nạp vào bèo tấm loài *SP*.



Hình 3. Biểu hiện tạm thời gen *gus* trên cánh bèo

2. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn tới tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm *SP* nguyên cây

Mật độ vi khuẩn trong môi trường lây nhiễm ảnh hưởng tới lượng vi khuẩn tiếp xúc với tế bào thực vật. Số lần và lượng vi khuẩn tiếp xúc với tế bào thực vật càng lớn thì xác suất chuyển gen càng cao. Tuy nhiên khi mật độ vi khuẩn càng lớn thì tương tác giữa chúng với nhau sẽ ảnh hưởng tới hiệu quả chuyển gen. Do vậy việc xác định mật độ vi khuẩn phù hợp cho hiệu quả chuyển gen cao có ý nghĩa quan trọng. Các dịch vi khuẩn có mật độ vi khuẩn ở OD₆₀₀: 0, 0,5, 0,8, 1,0, 1,2 và 1,5 đã được sử dụng trong thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn tới tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm *SP* nguyên cây

CT	Mật độ vi khuẩn (OD ₆₀₀)	Tỷ lệ biểu hiện tạm thời ở bèo tấm <i>SP</i> nguyên cây (%)
Đ/C	0	0
1	0,5	12,31
2	0,8	19,15
3	1,0	15,65
4	1,2	14,50
5	1,5	10,70

Kết quả thí nghiệm cho thấy: Với bèo *SP* nguyên cây, mật độ vi khuẩn ảnh hưởng rõ rệt tới sự biểu

hiện tạm thời của gen *gus*. Với mật độ vi khuẩn thay đổi từ 0,5 đến 1,5, giá trị mật độ vi khuẩn OD₆₀₀ = 0,8 cho tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* cao nhất so với các công thức khác (19,15%). Ngoài ra, ở giá trị mật độ vi khuẩn OD₆₀₀ = 0,8 mức độ biểu hiện đậm vừa, vùng biểu hiện rộng. Giá trị mật độ vi khuẩn cao hơn (1,0, 1,2, 1,5) tỷ lệ biểu hiện tạm thời giảm, mức độ biểu hiện trên cánh chỉ là những đốm xanh nhỏ, không có cánh bèo nào có biểu hiện cả cánh. Do vậy giá trị OD = 0,8 đã được lựa chọn cho các thí nghiệm chuyển gen nguyên cây tiếp theo.

3. Ảnh hưởng của thời gian ly tâm chân không tới tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm *SP* nguyên cây

Thời gian lây nhiễm có ảnh hưởng lớn đến kết quả của quá trình biến nạp. Ly tâm tạo ra các tổn thương ở cánh bèo *SP* tạo điều kiện cho vi khuẩn *A. tumefaciens* xâm nhiễm vào bèo. Ngoài ra trong điều kiện chân không sẽ tăng cường sự tiếp xúc giữa bèo với vi khuẩn để quá trình chuyển gen được tiến hành thuận lợi hơn. Nhằm xác định thời gian ly tâm và hút chân không phù hợp cho hiệu quả của quá trình biến nạp cao các khoảng thời gian ly tâm và hút chân không sau được nghiên cứu: 0, 5, 10, 15 và 20 phút. Trong thí nghiệm này, chủng vi khuẩn được sử dụng là AGL-1 với OD₆₀₀ = 0,8. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian ly tâm chân không tới tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm *SP* nguyên cây

CT	Thời gian ly tâm (phút)	Tỷ lệ biểu hiện tạm thời ở bèo tấm <i>SP</i> nguyên cây (%)
Đ/c	0	8,65
1	5	12,71
2	10	19,42
3	15	22,27
4	20	20,96

Kết quả thí nghiệm ở bảng 3 cho thấy: Có sự khác biệt lớn ở các công thức ly tâm chân không so với công thức đối chứng không ly tâm. Ở công thức đối chứng, tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* chỉ đạt 6,11%, trong khi đó ở các công thức có ly tâm chân không tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* dao động từ 12,71 đến 22,27%. Tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở các thời gian ly tâm chân không 15 và 20 phút sai khác không nhiều nhưng ở công thức ly tâm chân không trong thời gian 15 phút cho mức độ

biểu hiện tốt hơn hai công thức còn lại. Vùng biểu hiện rộng, thời gian ly tâm 20 phút gây tổn thương cho cánh bèo nhiều hơn cả do đó ảnh hưởng tới khả năng phục hồi sau này. Như vậy, huyền phù bèo tấm nguyên cây và vi khuẩn được ly tâm trong thời gian 15 phút là thích hợp cho chuyển gen nguyên cây vào bèo tấm *SP*, tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* đạt 22,27%.

4. Ảnh hưởng của hàm lượng *Acetosyringon* tới tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm *SP* nguyên cây

Acetosyringon (AS) là một hợp chất của phenol được tiết ra tại vùng bị thương của cây. AS đóng vai trò dẫn dụ vi khuẩn *Agrobacterium* tới mô lây nhiễm và kích hoạt các gen vùng VIR hoạt động để hoạt hóa cơ chế chuyển T-ADN vào tế bào thực vật.

Trong thí nghiệm này, bèo *SP* nguyên cây được biến nạp nhờ vi khuẩn AGL-1, có OD₆₀₀=0,8, thời gian ly tâm chân không 15 phút với *SP* nguyên cây. AS được bổ sung vào dịch vi khuẩn 1-2 h trước khi biến nạp với nồng độ lần lượt là: 0, 100, 200, 300 và 400 μ M. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng AS tới tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm *SP*

Công thức	Nồng độ AS (μ M)	Tỷ lệ biểu hiện tạm thời (%)
Đ/c	0	17,71
1	100	22,06
2	200	35,85
3	300	32,88
4	400	30,11

Kết quả thí nghiệm cho thấy, AS có ảnh hưởng rõ rệt tới tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở *SP* nguyên cây. Tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* tăng ở các công thức có bổ sung AS so với công thức đối chứng không bổ sung AS. Tỷ lệ biểu hiện tạm thời đạt cao nhất là 35,85% khi bổ sung 200 μ M AS vào dịch khuẩn. Khi bổ sung nồng độ AS cao (300, 400 μ M) lại làm giảm tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* (lần lượt là 32,88% và 30,11%).

Nồng độ 200 μ M AS bổ sung vào dịch vi khuẩn từ 1 - 2h trước khi biến nạp được lựa chọn cho giai đoạn chuyển gen vào bèo tấm *SP* nguyên cây.

5. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm *SP*

Nhằm khảo sát và xác định thời gian đồng nuôi cấy thích hợp trong chuyển gen ở bèo tấm *SP* các

khoảng thời gian 0, 1, 2, 3, 4 ngày đã được nghiên cứu. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở bèo tấm *SP*

Công thức	Thời gian đồng nuôi cấy (ngày)	Tỷ lệ biểu hiện tạm thời (%)
Đ/c	0	19,24
1	1	20,18
2	2	31,34
3	3	35,16
4	4	28,32

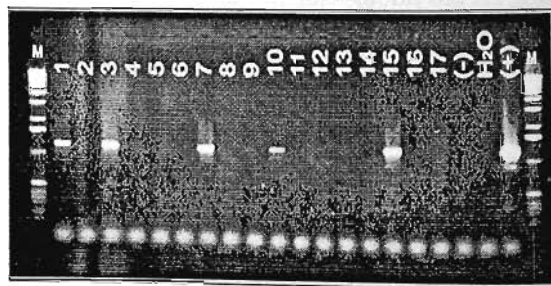
Từ kết quả thu được, ta thấy thời gian đồng nuôi cấy tăng thì tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* cũng tăng và cao nhất là ở thời gian 3 ngày (35,16%). Đến ngày thứ tư tỷ lệ biểu hiện tạm thời giảm. Mức độ biểu hiện của cánh bèo ở thời gian nuôi cấy 3 ngày cũng đậm hơn, có nhiều cánh biểu hiện toàn cánh. Vậy thời gian đồng nuôi cấy thích hợp nhất cho dòng bèo *SP* là 3 ngày.

V. KẾT LUẬN

Có thể thực hiện biến nạp di truyền trên bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* bằng *Agrobacterium* sử dụng vật liệu thực vật là nguyên cây bèo tấm.

Các chủng vi khuẩn có tính đặc hiệu đối với phương thức biến nạp sử dụng nguyên cây. Trong 5 chủng vi khuẩn nghiên cứu, chỉ có chủng AGL-1 có khả năng lây nhiễm, cho tỷ lệ và mức độ biểu hiện tốt. Có thể sử dụng chủng này cho chuyển gen vào bèo tấm.

Tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *gus* ở các công thức thí nghiệm dao động từ 2,54 đến 35,85%. Các yếu tố ảnh hưởng như mật độ tế bào vi khuẩn, hàm lượng chất bổ sung acetosyringon, phương thức tăng cường tiếp xúc giữa bèo tấm, vi khuẩn, ly tâm chân không, thời gian đồng nuôi cấy đã được nghiên cứu. Các yếu tố khác cần được tiếp tục nghiên cứu và tối ưu.



Hình 4. Kết quả phân tích PCR các dòng bèo được chuyển gen *gus*

Cột M: Thang ADN chuẩn 1kb. Cột 1, 3, 7, 10, 15: Cây chuyển gen với sự có mặt của gen *gus*. Cột 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11-14, 16, 17: Cây không được chuyển

gien. Cột (-): Cây bình thường (không chuyển gien).
Cột H₂O: Mẫu đối chứng H₂O (không có ADN); Cột
(+): ADN plasmid pCAMBIA 1301 (mang gien *gus*)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aziz, M. A., Singh, S., Kumar P. A., Bhatnagar R. (2002). Expression of protective antigen in transgenic plants: a step toward edible vaccine against anthrax. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299, 345- 351.
2. Edelman M. (1999). Transgenic *Lemnaceae*. International application published under the patent cooperation treaty (PTC), WO 99/19498.
3. Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Mol. Biol., 19, pp. 15-38.
4. James C., 2009. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. ISAAA Brief No. 39. ISAAA: Ithaca, NY.
5. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987). GUS fusion: β -glucosidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant. EMBO journal, 6(13), pp. 3901-3907.
6. Landolt E. (1986). The family of *Lemnaceae* – a monographic study. Vol. 1. ETH. Stiftung Rybel, Zurich, Switzerland.
7. Yamamoto Y. T., Rajbhandari N., Lin X., Bergmann B. A., Nishimura Y. and Stomp A. M. (2001). "Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 37, pp. 349-353.
8. Rival S., Wisniewski J. P., Langlais A., Kaplan H., Freysshinet G., Vancannet G., Vunsh R., Perl A., Edelman M. (2007). *Spirodela* (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin. Transgenic Res. (Original paper). DOI 10.1007/s 11248-007-9123.

INVESTIGATION OF SOME FACTORS EFFECTED ON TRANSIENT EXPRESSION OF *GUS* GENE IN *SPYRODELA POLYRRHIZA*

Phung Thi Thu Ha, Nguyen Thi Khanh Van, Le Huy Ham

Summary

Spirodela polyrrhiza belongs to family Lemnaceae which consist more than 40 species. Representatives of this family have great potential to be host plant for production of biologically active substances. The studies have showed that it is possible to transform *Spirodela polyrrhiza* using whole plant. A number factors effecting transient expression have been investigated. *Agrobacterium* strain AGL-1 has been founded that sensitive to whole plant infection among five strains investigated, transient expression ranged from 2.54 to 15.88%. Among different factors, bacteria density, acetosyringone concentration, time and speed of centrifure have significant influence on transient expression. These factors and others are to be optimized for development of efficient trans formation system in this plant.

Keywords: *Agrobacterium*, duckweed, transformation, Lemnaceae, *Spirodela polyrrhiza*.

Người phản biện: TS. Chu Hoàng Hà.