

XÂY DỰNG HỆ THỐNG TÁI SINH CỦA BÈO TẮM *SPIRODELA POLYRRHIZA*

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

TÓM TẮT

Spirodela polyrrhiza là cây một lá mầm, thuộc họ *Lemnaceae*. Với khả năng tăng sinh khối nhanh, điều kiện nuôi trồng đơn giản, phân bố rộng rãi trên toàn thế giới... nên loài thực vật này có nhiều tiềm năng để được lựa chọn làm hệ thống sản xuất các chất có hoạt tính sinh học phục vụ cho các mục đích đa dạng của con người. Các nghiên cứu cho thấy có thể xây dựng hệ thống tái sinh ở loài bèo tấm *Spirodela polyrrhiza*. Một số giai đoạn cần thiết của hệ thống tái sinh đã được nghiên cứu, bao gồm tạo callus (thể chai), nhân callus và tái sinh cây trực tiếp từ callus. Các yếu tố khác nhau như: môi trường khoáng, nồng độ chất kích thích sinh trưởng và các chất bổ sung khác có ảnh hưởng rõ rệt tới hiệu quả của hệ thống tái sinh của loài bèo tấm. Tỷ lệ tạo callus đạt 31,28% và tỷ lệ tái sinh bước đầu đạt 23,61%.

Từ khoá: Bèo tấm, *Spirodela polyrrhiza*, hệ thống tái sinh, thể chai.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bèo tấm (*Spirodela polyrrhiza*), loài cây một lá mầm thuộc họ *Lemnaceae* (Landolt, 1986), là thực vật sống dưới nước, có thể sinh trưởng tốt ở hầu như mọi nơi, chỉ cần có nước và ánh sáng. *Spirodela polyrrhiza* là một trong những loài bèo tấm có kích thước lớn nhất (dài 1,5 – 10 mm, rộng 1,5 – 8,0 mm), sinh sản nhanh và cho trọng lượng khô cao nhất trong họ bèo tấm (Landolt & Kandeler, 1987). Với thời gian nhân đôi cánh từ 24 – 72h (Landolt, 1986), bèo tấm lập kỉ lục về khả năng nhân sinh khối so với các loài thực vật bậc cao khác (Landolt, 1998).

Bèo tấm có hàm lượng protein trong một đơn vị trọng lượng khô khá cao, đạt từ 15 – 45% với thành phần axit amin phong phú. Chúng còn có nhiều loại vitamin như: A, B1, B2, C... và các amino axit không thay thế, trừ methionin, cho nên bèo tấm được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng cho người và động vật. Bèo tấm còn có khả năng loại bỏ các chất dinh dưỡng và một số chất độc hại trong môi trường nước bị ô nhiễm (Chang, 1977; Landolt & Kandeler, 1987; Poral, 1979). Đã có nhiều nghiên cứu chuyển gen ở bèo tấm để sản xuất hoạt chất. Các nhà khoa học Mỹ, Pháp đã sử dụng các loài bèo tấm để chuyển các gen có giá trị kinh tế nhằm sản xuất các hoạt chất khác nhau, trong đó có vắc xin (Fischer et al., 2004).

Hệ thống tái sinh đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu chuyển gen ở thực vật. Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh trên đối tượng bèo tấm *Spirodela polyrrhiza*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bèo tấm thu thập trên một số đồng ruộng ngoại thành Hà Nội được gửi đi phân loại, định danh và được các nhà khoa học tại Viện Địa Thực vật - Học viện Liên bang Thụy Sĩ xác định là loài *Spirodela polyrrhiza* (viết tắt là SP). Đây là một trong những loài phân bố rộng rãi tại Việt Nam và khu vực châu Á (Hoàng Thị Sáu, Trần Văn Ba, 1998).

2. Phương pháp nghiên cứu

Tạo nguồn vật liệu vô trùng: Bèo tấm SP thu về được khử trùng bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% trong thời gian 2 phút. Bèo được nuôi trên môi trường khoáng H (Hutner, 1953) chứa 1,5% sucroza (đường mía).

Cánh bèo SP trưởng thành sau 5 ngày nuôi cấy được sử dụng làm vật liệu cho các thí nghiệm tạo thể chai (callus).

Tạo callus: Môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường khoáng H (Hutner, 1953), WP (Mc Cown & Lloyd, 1980), MS (Murashige & Skoog, 1962), N6 (Chu & cs., 1975), B5 (Gamborg, 1968) (theo Edwin, 1993/1996) bổ sung các chất kích thích sinh trưởng (KTST) như: 2,4-D, BAP, NAA, kinetin và đường sucroza, casein hydrolysat (CH) với hàm lượng khác nhau.

Tái sinh: Callus được chuyển sang môi trường tái sinh cây với thành phần khoáng H/2 bổ sung 1,0% sucroza.

Bèo thí nghiệm được cấy trên đĩa petri (6,5 x 1,5 cm) với 12,5 ml môi trường. Trên mỗi đĩa thí nghiệm cấy 7 cánh bèo đã nuôi cấy 5 ngày tuổi. Mỗi công thức thí nghiệm cấy 8 đĩa, lặp lại 3 lần.

Điều kiện nuôi cấy: bèo được nuôi ở điều kiện $27 \pm 1^\circ\text{C}$; chiếu sáng 10 h/ngày ở cường độ ánh sáng 2000 – 2500 lux hoặc không chiếu sáng trong tủ nuôi SANYO có điều khiển nhiệt độ và ánh sáng.

¹Viện Di truyền Nông nghiệp.

Các số liệu thu được được xử lý thống kê, sử dụng chương trình Excel 5.0 và biện luận kết quả theo Nguyễn Đình Hiền, 1998.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thu thập và xử lý mẫu

Mẫu bèo *SP* sau khi thu thập về được nuôi cách ly trong các chậu vại. Để tạo vật liệu nuôi cấy vô trùng, sử dụng hoá chất $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ở các nồng độ 3, 5 và 7% với thời gian khử trùng lần lượt là: 2, 4 và 6 phút. Chế độ khử trùng bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% trong thời gian 2 phút cho tỷ lệ mẫu sống và sạch cao nhất đạt 54% (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian và nồng độ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ tới tỷ lệ tạo mẫu vô trùng

Hóa chất	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sống, vô trùng (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$	3	2	28	55	17
		4	32	44	24
		6	46	29	25
	5	2	54	24	22
		4	41	20	39
		6	35	17	48
	7	2	32	20	48
		4	22	14	64
		6	15	11	74

2. Tạo callus

a. Ảnh hưởng của môi trường tới khả năng tạo callus

Nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng cũng như chất kích thích sinh trưởng đến

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng 2,4-D và BAP tới hiệu quả tạo callus (%)

2,4D \ BAP	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,00	0,00	0,00	0,00	4,55	3,70
1,0	0,00	3,73	2,83	2,14	10,61	10,77
2,0	0,00	10,08	11,40	14,49	16,50	7,11
3,0	0,00	17,96	19,83	6,60	2,04	7,59
4,0	0,00	6,47	2,27	2,22	1,09	0,48
P < 0,05		P = 0,0079	P = 0,009	P = 0,01	P = 3,58E	P = 0,0065

Đơn vị: 2,4D và BAP là mg/l

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở môi trường bổ sung 2,4D hàm lượng thấp (0 - 2 mg/l) kết hợp với BAP (0 - 0,5 mg/l) cho tỷ lệ tạo callus đạt thấp (0 - 3,73%). Tỷ lệ tạo callus tăng dần và đạt cao nhất là

khả năng tạo callus từ các cánh bèo, đã sử dụng 5 loại môi trường khoáng là H, WP, B5, MS và N6 có bổ sung các tổ hợp kích thích sinh trưởng (KTST) với nồng độ 2,4 D là 2 mg/l, BAP: 2 mg/l, kinetin: 0,5 mg/l và NAA: 0,5 mg/l. Kết quả thí nghiệm qua quan sát định tính về khả năng tạo callus trên các công thức môi trường được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nền khoáng tới khả năng tạo callus ở *SP*

Nền	2,4-D + BAP	2,4-D + kinetin	BAP + NAA	Kinetin + NAA
H	+	-	-	-
N6	-	-	-	-
MS	+	-	-	-
WP	++	-	-	-
B5	+	-	-	-

Dấu "+": tạo được callus; "-": không tạo được callus

Kết quả thí nghiệm cho thấy, mẫu bèo tằm *SP* cho phản ứng tạo callus tốt hơn cả trên nền khoáng WP có bổ sung 2 mg/l 2,4D và 2 mg/l BAP so với các công thức thí nghiệm khác. Callus hình thành từ vùng mô phân sinh gọi là điểm nút (node) nằm sâu trong hai túi bên của cánh bèo. Như vậy môi trường khoáng WP bổ sung KTST 2,4-D và BAP sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

b. Ảnh hưởng của hàm lượng 2,4-D và BAP tới sự hình thành callus

Thí nghiệm với các nồng độ khác nhau của 2,4-D và BAP nhằm tìm ra tổ hợp chất điều hoà sinh trưởng 2,4D + BAP phù hợp cho sự hình thành callus ở *SP*. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.

19,83% ở môi trường bổ sung kết hợp 4,0 mg/l 2,4D + 3,0 mg/l BAP. Đây là công thức cho callus đồng đều về kích thước và màu sắc nhất so với các công thức còn lại sau 2,5 tháng nuôi cấy. Qua bảng 3 cũng cho thấy ở các công thức có hàm lượng BAP cao thì tỷ lệ

tạo callus thấp. Môi trường khoáng WP bổ sung 4 mg/l 2,4D kết hợp 3,0 mg/l BAP được chọn làm môi trường tạo callus.

c. Ảnh hưởng của hàm lượng đường (sucroza) đến hiệu quả tạo callus

Trong nuôi cấy mô tế bào, sucroza được sử dụng như một nguồn cung cấp năng lượng không thể thiếu. Để tìm nồng độ sucroza tối ưu cho quá trình hình thành callus, các nồng độ sucroza 1, 2, 3, 4% được bổ sung vào môi trường khoáng WP, 4 mg/l 2,4D, 3,0 mg/l BAP.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng đường (g/l) tới tỷ lệ tạo callus (%) ở bèo tấm *SP*

Công thức	Hàm lượng đường (g/l)	Tỷ lệ tạo callus (%)
Đ/C	0	4,12
1	10	10,69
2	20	19,18
3	30	26,26
4	40	13,66
	P < 0,05	P = 0,0089

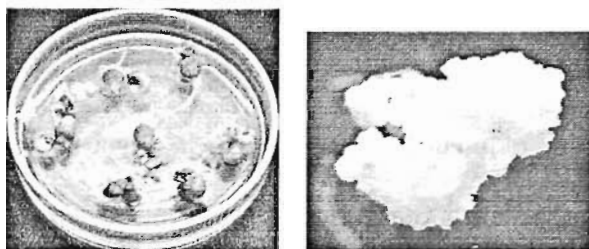
Kết quả ở bảng 4 cho thấy: Đường có ảnh hưởng rõ rệt tới sự hình thành callus ở *SP*. Trên môi trường không bổ sung sucroza, tỷ lệ tạo callus đạt thấp 4,12%. Tỷ lệ này tăng dần và đạt cao nhất là 26,26% ở hàm lượng 30 g/l sucroza (gấp hơn 6 lần so với môi trường không bổ sung đường). Tuy nhiên, khi hàm lượng sucroza bổ sung quá nhiều (>30 g/l) lại làm giảm tỷ lệ tạo callus. Kết quả thí nghiệm khẳng định vai trò quan trọng của đường trong quá trình tạo callus ở bèo tấm. Hàm lượng đường 30 g/l bổ sung vào môi trường tạo callus ở *SP* đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

d. Ảnh hưởng của dịch chiết thủy phân casein hydrolysate (CH) tới hiệu quả tạo callus

Dịch chiết thủy phân casein là một chất phụ gia rất giàu các amino axit tự do. Việc bổ sung CH vào môi trường nuôi cấy tạo callus đã được nhiều tác giả sử dụng như là chất không thể thiếu trong việc tạo callus và tái sinh một số loài cây (Đỗ Năng Vịnh, 2005). Vai trò của CH đối với quá trình tạo callus ở bèo tấm *SP* đã được xác định ở thí nghiệm này. Kết quả thí nghiệm cho thấy: CH cũng đóng một vai trò quan trọng trong giai đoạn khởi tạo callus như kết quả chỉ ra ở bảng 5. Trên môi trường không bổ sung CH tỷ lệ tạo callus đạt thấp (9,1%), tỷ lệ tạo callus cao nhất khi bổ sung 1500 g/l CH vào môi trường tạo callus, đạt 31,28%.

Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng Cazein hydrolysate (CH) tới tỷ lệ tạo callus ở *SP*

Công thức	Hàm lượng CH (mg/l)	Tỷ lệ tạo callus (%)
Đ/C	0	9,10
1	500	17,27
2	1000	25,82
3	1500	31,28
4	2000	27,17
	P < 0,05	P = 0,039



Hình 1. Callus bèo tấm *SP*

Như vậy, môi trường phù hợp cho tạo callus là : Môi trường khoáng WP bổ sung 4 mg/l 2,4D, 3,0 mg/l BAP, 30 g/l đường, 1500 mg/l CH.

3. Tái sinh cây bèo từ callus

Callus thu được sau giai đoạn khởi tạo đã được nhân lên trên môi trường nhân callus nhằm duy trì để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Callus nhân được lựa chọn cho tái sinh là dạng callus trắng ngà, xốp. Trước khi đưa vào các môi trường tái sinh, callus được chuyển lên môi trường không có chất KTST nhằm giải phóng dư lượng các chất KTST từ môi trường nhân còn lại trong callus.

*a. Ảnh hưởng của môi trường khoáng tới hiệu quả tái sinh cây ở *SP**

Để xác định nền khoáng thích hợp cho giai đoạn tái sinh cây ở *SP*, đã tiến hành thí nghiệm trên 5 loại môi trường khoáng khác nhau. Kết quả được thu được ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nền khoáng tới tỷ lệ (%) tái sinh ở *SP*

Công thức	Nền khoáng	Tỷ lệ tái sinh (%)
1	H/2	0
2	B5/2	0
3	MS/2	6,94
4	N6/2	7,64
5	WP/2	0
	P < 0,05	0,0018

Trên 5 loại môi trường khoáng được khảo sát thì môi trường khoáng N6/2 thích hợp hơn cả cho giai đoạn tái sinh ở *SP* với tỷ lệ tái sinh đạt 7,64%. Môi trường khoáng MS/2 cho tỷ lệ tái sinh 6,49% thấp hơn

so với công thức môi trường khoáng N6/2. Trên các môi trường khoáng H/2, B5/2 và WP/2, không thấy xuất hiện cánh bèo tái sinh. Callus trên môi trường H/2 bị chết có màu nâu, còn callus trên môi trường khoáng B5/2 và WP/2 có màu vàng nhạt, nhô lên ít và có một vài đốm xanh nhưng không xuất hiện cánh bèo, sau một thời gian thì chết có màu nâu.

b. Ảnh hưởng của kinetin đến hiệu quả tái sinh cây ở SP

Để cải thiện hiệu quả tái sinh cánh bèo từ callus, môi trường khoáng N6/2 bổ sung kinetin ở các nồng độ khác nhau được sử dụng. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của kinetin tới hiệu quả tái sinh ở SP

Công thức	Kinetin (mg/l)	Tỷ lệ tái sinh (%)
Đ/C	0	7,64
1	0,5	11,81
2	1,0	19,44
3	1,5	15,35
4	2,0	9,03
	P < 0,05	P = 0,034

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Kinetin có vai trò quan trọng trong cải thiện hiệu quả tái sinh cánh từ callus. Trên các môi trường bổ sung kinetin, tỷ lệ tái sinh cao hơn hẳn (lần lượt là 11,81%, 19,44%, 15,35% và 9,03% tương ứng với các nồng độ kinetin 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg/l) so với công thức đối chứng không bổ sung kinetin (7,64%). Công thức môi trường bổ sung 1,0 mg/l kinetin cho tỷ lệ tái sinh cao nhất ở SP, đạt 19,44%. Số cánh tái sinh thu được từ 2 - 4 cánh trên mỗi cụm callus tái sinh. Hàm lượng kinetin 1,0 mg/l được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo trong giai đoạn tái sinh ở bèo tấm SP.

c. Ảnh hưởng của hàm lượng sucroza tới hiệu quả tái sinh ở SP

Để xác định ảnh hưởng của hàm lượng sucroza tới khả năng tái sinh ở bèo tấm SP, đã bố trí 5 công thức thí nghiệm với hàm lượng sucroza lần lượt là: 0, 5, 10, 20 và 30 g/l. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Ảnh hưởng của sucroza tới tỷ lệ (%) tái sinh ở SP

Công thức	Hàm lượng sucroza (g/l)	Tỷ lệ tái sinh (%)
Đ/C	0	0
1	5	19,44
2	10	23,61
3	20	15,97
4	30	11,75
	P < 0,05	0,0023

Kết quả ở bảng 8 cho thấy: Sucroza có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả tái sinh ở SP. Trên công thức môi trường không bổ sung sucroza, không quan sát thấy cánh bèo tái sinh, callus hoá có màu xanh sau một thời gian thì chết có màu nâu. Tỷ lệ tái sinh cây tăng khi bổ sung sucroza vào môi trường tái sinh và đạt cao nhất là 23,61% khi bổ sung 10 g/l sucroza.

Từ các kết quả đã đạt được, đã sử dụng môi trường khoáng N6/2 bổ sung 1,0 mg/l kinetin, 10 g/l sucroza, 7 g/l aga (thạch) làm môi trường tái sinh.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Có thể xây dựng được hệ thống tái sinh trên đối tượng bèo tấm *Spirodela polyrrhiza*. Hiệu quả tạo callus bước đầu đạt 31,28% và hiệu quả tái sinh đạt 23,61%. Bên cạnh cánh bèo tái sinh bình thường thì vẫn còn các cánh bèo tái sinh dị dạng, không nhô lên được. Cần tiếp tục nghiên cứu tối ưu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu quả của hệ thống tái sinh phục vụ cho các nghiên cứu chuyển gen.

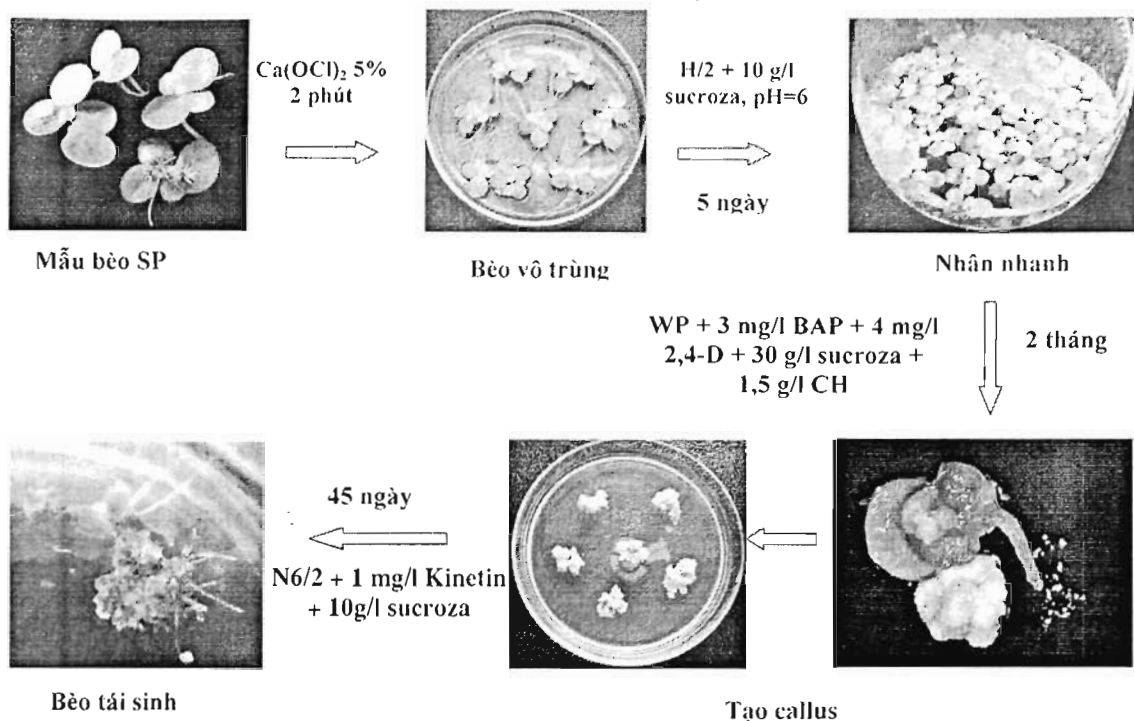
TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đình Hiền, Nguyễn Huy Hoàng, 1998. Phân tích số liệu trong Excel. Tài liệu môn Tin học (sách dùng cho học viên cao học- bài giảng).
2. Hoàng Thị Sáu, Trần Văn Ba (1998). Giải phẫu hình thái học thực vật. Nhà xuất bản Giáo dục, trang: 103.
3. Đỗ Năng Vịnh (2005). Công nghệ tế bào thực vật ứng dụng. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
4. Chang S. M., Yang C. C., Sung S. C. (1977). The cultivation and the nutrition value of Lemnaceae. *Bull. Inst. Chem. Acad. Sin.* 24:19-30.
5. Edwin E., George Ph. D. (1993/1996). Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited. 2nd edition. p:575-638.
6. Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P. and R. M. Twyma (2004). Current Opinion in Plant Biology. 7:152-158.
7. Landolt E. (1986). The family of Lemnaceae - a monographic study. Vol. 1. ETH. Stiftung Rybel, Zurich, Switzerland.
8. Landolt E., Kandeler R. (1987). The family of Lemnaceae - a monographic study. Vol. 2. ETH. Stiftung Rybel, Zurich, Switzerland.
9. Landolt E. (1998). Eco-geographical differentiation in some aquatic plants: the Lamnaceae. In: Urbanska K. (ed.), Differentiation

patterns in higher plants. Acad. Press, London. 201-215.

10. Hillman W. S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds. A review of the descriptive and experimental literature. Bot. Rev. 27.

11. Poral D., Hephher B., Kont A. (1979). Duckweeds as an aquatic crop: evaluation of clones for aquaculture. *Aquat. Bot.* 7:273-278.



Hình 3. Sơ đồ hệ thống tái sinh ở bèo tấm *Spirodela polyrrhiza*

RESEARCH ON REGENERATION SYSTEM IN *SPIRODELA POLYRRHIZA*

Phung Thi Thu Ha, Nguyen Thi Khanh Van,
Do Nang Vinh, Le Huy Ham

Summary

Spirodela polyrrhiza, a monocotyledon plant, belongs to *Lemnaceae* family. With capacity increase biomass fast, easy to cultivate and distributed worldwide, representatives of this family have great potential to be host plant for the production of biologically active substances. These studies have initially established a regeneration system from *Spirodela polyrrhiza* fronds. A number of process as callus initiation, callus multiplication, direct plant regeneration from callus have been investigated. Different factors such as nutrient composition, concentration of auxins and cytokinins, other supplement substances have significant influence on the efficiency of the regeneration system. Ratio of callus induction is 31.28% and front regenerated ratio is approximately 23.61 percent. Further works need to be done to optimize the efficiency of the regeneration system in this plant.

Key words: Duckweed, *Spirodela polyrrhiza*, regeneration system, callus.

Người phản biện: PGS. TS. Ngô Xuân Bình.