

MOLECULAR MARKERS FOR SPECIES IDENTIFICATION AND pH EFFECTS ON DUCKWEED SAMPLES COLLECTED IN LAM DONG

Hoang Thi Nhu Phuong*, Hoang Thanh Tung

Dalat University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 01/4/2025 Revised: 29/6/2025 Published: 29/6/2025 KEYWORDS <i>atpF-atpH</i> DNA barcode <i>Lemna aequinoctialis</i> <i>psbK-psbI</i> <i>Spirodela polyrhiza</i>	Duckweeds are monocotyledonous plants, small, and grow quickly. Chloroplast coding genes or non-coding regions can identify duckweeds with more accurate results than identification based on morphology. In this study, three duckweed samples from the <i>Spirodela</i> genus and three from the <i>Lemna</i> genus collected in Lam Dong were identified using the genetic markers <i>atpF-atpH</i> and <i>psbK-psbI</i>. The results indicated that the investigated samples were <i>Spirodela polyrhiza</i> and <i>Lemna aequinoctialis</i>. The polymorphism level of SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) was higher in the <i>atpF-atpH</i> region compared to the <i>psbK-psbI</i> region and was also higher in <i>L. aequinoctialis</i> than in <i>S. polyrhiza</i>. Morphological and size variations of the frond were also analyzed, revealing specific differences among samples within the same species. Additionally, the study demonstrated that pH (5,0 - 8,0) significantly affected the growth rate of the samples. For <i>L. aequinoctialis</i>, sample LD1 flourished at pH 8.0, sample LD2 grew most effectively at pH 5.0, and sample LD3 grew quickly at all investigated pH values. Growth rate variations across pH levels were less noticeable for <i>S. polyrhiza</i>, sample LD1 showed the most significant increase in biomass (about 400%), whereas sample LD3 showed the slowest growth (around 200%) after 16 days of cultivation.

ĐỊNH DANH BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ VÀ KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA pH LÊN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA MỘT SỐ MẪU BÈO TẮM THU TẠI LÂM ĐỒNG

Hoàng Thị Như Phương*, Hoàng Thanh Tùng

Trường Đại học Đà Lạt

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 01/4/2025 Ngày hoàn thiện: 29/6/2025 Ngày đăng: 29/6/2025 TỪ KHÓA <i>atpF-atpH</i> Chỉ thị DNA <i>Lemna aequinoctialis</i> <i>psbK-psbI</i> <i>Spirodela polyrhiza</i>	Bèo tấm là thực vật một lá mầm, có kích thước nhỏ, tốc độ sinh trưởng nhanh. Bèo tấm có thể được định danh bằng gene mã hóa lục lạp hay các vùng không mã hóa và chúng cho kết quả chính xác hơn so với định danh dựa trên hình thái. Trong nghiên cứu này, chỉ thị phân tử <i>atpF-atpH</i> và <i>psbK-psbI</i> được sử dụng để định danh các mẫu bèo tấm thuộc chi <i>Spirodela</i> và <i>Lemna</i> thu tại Lâm Đồng. Kết quả cho thấy các mẫu khảo sát là loài <i>Spirodela polyrhiza</i> và <i>Lemna aequinoctialis</i>; trong đó, mức độ đa hình của các SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) ở vùng <i>atpF-atpH</i> cao hơn so với vùng <i>psbK-psbI</i> và của loài <i>L. aequinoctialis</i> cao hơn so với loài <i>S. polyrhiza</i>. Ngoài ra, sự đa dạng về hình thái và kích thước của frond cũng được ghi nhận. Bên cạnh đó, pH (5,0 - 8,0) có ảnh hưởng rõ rệt đến tốc độ sinh trưởng của các mẫu nghiên cứu. Đối với loài <i>L. aequinoctialis</i> thì mẫu LD1 thích hợp với pH = 8,0, mẫu LD2 sinh trưởng tốt nhất ở pH = 5,0, trong khi đó mẫu LD3 có tốc độ sinh trưởng nhanh ở các giá trị pH khảo sát. Đối với loài <i>S. polyrhiza</i>, sự khác biệt về tốc độ sinh trưởng ở các giá trị pH khác nhau là không quá lớn, mẫu LD1 có sự gia tăng sinh khối nhanh nhất (khoảng 400%), trong khi mẫu LD3 sinh trưởng chậm nhất (khoảng 200%) sau 16 ngày nuôi cấy.

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.12450>

* Corresponding author. Email: phuonghtn@dlu.edu.vn

1. Giới thiệu

Bèo tấm là một nhóm thực vật thủy sinh nổi trên mặt nước, có phân bố rộng rãi trên toàn cầu, từ các khu vực nhiệt đới đến ôn đới, và sinh trưởng nhanh trong cả môi trường nước ngọt lẫn nước lợ [1]. Hệ thống phân loại hiện nay xác định nhóm này gồm 37 loài (trong đó có 2 loài lai), phân bố trong 5 chi khác nhau: *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* và *Wolffia* [2]. Chúng là loại thực vật thủy sinh có cấu trúc rất đơn giản chỉ gồm 1 cụm từ 2 – 3 lá (thường được gọi là frond) và có hoặc không có rễ [1]. Bèo tấm có tiềm năng ứng dụng làm nguồn nguyên liệu cho sản xuất nhiên liệu sinh học (bio-ethanol, bio-gas,...) [3] - [9]. Bên cạnh đó, bèo tấm còn được đánh giá cao trong nhiều lĩnh vực ứng dụng như xử lý nước thải, làm thức ăn chăn nuôi,... [10] - [12] hoặc thực phẩm cho con người [13], [14].

Bốn gene mã hóa lục lạp (*rpoB*, *rpoC1*, *rbcL* và *matK*) và ba vùng không mã hóa (*atpF-atpH*, *psbK-psbI* và *trnH-psbA*) đã được sử dụng để định danh các loài bèo tấm khác nhau [15], trong đó *atpF-atpH* và *psbK-psbI* là hai chỉ thị phân tử được dùng rộng rãi nhất. Việc định danh loài dựa trên chỉ thị phân tử cho kết quả chính xác và có độ tin cậy cao hơn so với các đặc điểm về mặt hình thái [16], [17].

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật nói chung và thực vật thủy sinh nói riêng, giá trị pH của đất hoặc của dung dịch nuôi trồng có ảnh hưởng rất lớn vào các chu trình sống, phản ứng sinh hóa và quyết định đến sự sinh trưởng và phát triển của thực vật [18]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu về bèo tấm vẫn còn hạn chế, đặc biệt chưa có công trình nào định danh các loài bèo tấm thuộc chi *Lemna* và *Spirodela* bằng chỉ thị sinh học phân tử cũng như đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của loài này dưới tác động của các giá trị pH môi trường khác nhau.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu bèo tấm thuộc chi *Spirodela* (3 mẫu) và chi *Lemna* (3 mẫu) được thu nhận tại các khu vực khác nhau trong tỉnh Lâm Đồng (được ký hiệu là LD1, LD2 và LD3).

2.2. Phương pháp nuôi mẫu bèo tấm

Các mẫu bèo tấm được nuôi trong môi trường dinh dưỡng với thành phần hóa học gồm 60 μM KH_2PO_4 , 1 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 8 mM KNO_3 , 1 mM MgSO_4 , 5 μM H_3BO_3 , 13 μM MnCl_2 , 0,4 μM Na_2MoO_4 , 25 μM FeEDTA [19]. Tiến hành điều chỉnh pH của môi trường về các giá trị khảo sát (5,0 - 8,0) bằng các dung dịch NaOH 1N và HCl 1N; sau đó, hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1atm trong vòng 20 phút.

2.3. Phương pháp tách DNA, khuếch đại, giải và phân tích trình tự

Mẫu lá tươi (0,3 g/mẫu) được đông lạnh bằng nitơ lỏng và nghiền mẫu bằng máy Retsch MM400. DNA được tách bằng bộ kit DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104-Qiagen). DNA sau đó được rửa với 200 μl dung dịch đệm Tris-acetate - EDTA và kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di.

Sử dụng các cặp mồi tương ứng để khuếch đại vùng *atpF-atpH* (*atpF*: ACTCGCACACACTCCCTTTCC và *atpH*: GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT) và *psbK-psbI* (*psbK*: TTAGCCTTTGTTTGGCAAG và *psbI*: AGAGTTTGAGAGTAAGCAT) [20], [21]. Phản ứng PCR được thực hiện ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ ở 95°C trong 45 giây, ở 55°C (*psbK-psbI*) hoặc 49°C (*atpF-atpH*) trong 30 giây, ở 72°C trong 50 giây và ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm điện di trên gel agarose 1,2% (w / v), nhuộm bằng SYBR Green và coi kết quả bằng đèn UV (GelDoc-It®2315 imageer UVP-USA). Các đoạn DNA khuếch đại thành công sẽ được đem giải trình tự tại công ty Macrogen (Seoul, Hàn Quốc).

2.4. Phương pháp tính diện tích bề mặt

Diện tích bề mặt mẫu được chụp ảnh định kỳ mỗi 2 ngày có thước đo chuẩn đi kèm, hình ảnh được xử lý bằng phần mềm ImageJ (phiên bản 1.53 dành cho hệ điều hành Windows) để tính toán diện tích bề mặt mẫu.

2.5. Phương pháp đo chỉ số SPAD

Mẫu bèo tấm sau 16 ngày nuôi cấy được sử dụng để đo hàm lượng diệp lục bằng máy đo diệp lục SPAD - 502 plus Konica Minolta (Tokyo).

2.6. Phương pháp xử lý thống kê

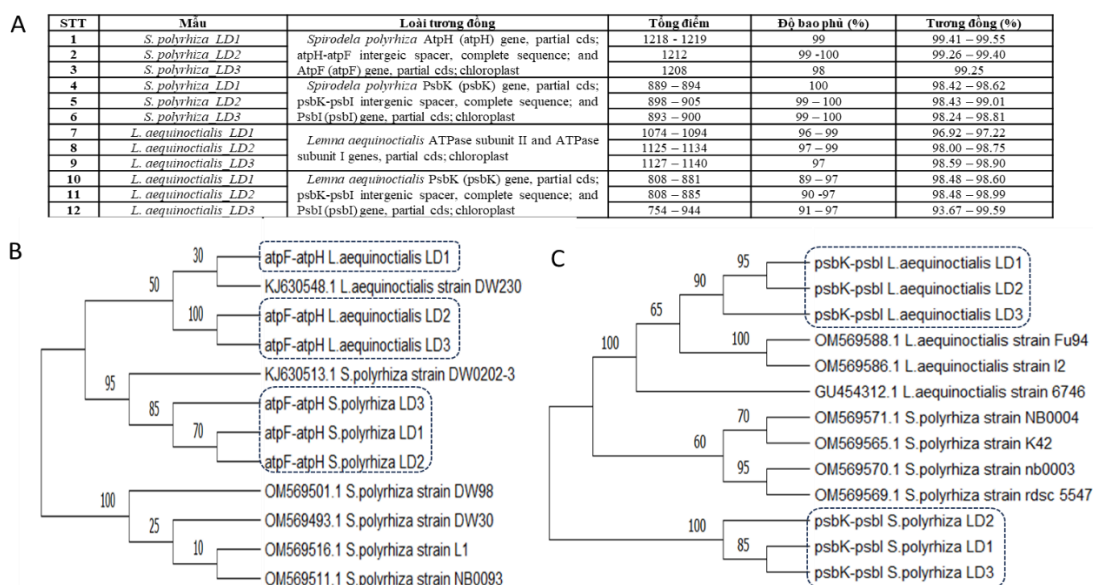
Số liệu diện tích bề mặt mẫu và chỉ số SPAD được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Định danh phân tử và đặc điểm hình thái

3.1.1. Đặc điểm trình tự vùng *atpF-atpH* và *psbK-psbI* và định danh 06 mẫu bèo tấm thuộc chi *Spirodela* và *Lemna*

DNA tổng số từ các mẫu lá bèo tấm thuộc chi *Spirodela* (3 mẫu) và *Lemna* (3 mẫu) được đánh giá thông qua điện di trên gel agarose và đo quang phổ. Kết quả cho thấy có một băng DNA đặc hiệu và sạch. Tỷ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ dao động từ 1,8 đến 2,0. Đặc điểm chỉ thị vùng *atpF-atpH* và *psbK-psbI* của các mẫu bèo tấm thuộc chi *Spirodela* và *Lemna* cho thấy chiều dài vùng *atpF-atpH*: 654 - 683 bp và vùng *psbK-psbI*: 505 - 513 bp. Kết quả phân tích BLAST với 05 mẫu cho kết quả cao nhất cho thấy trình tự vùng *atpF-atpH* và *psbK-psbI* của các mẫu bèo tấm thuộc chi *Spirodela* là *Spirodela polyrhiza* và các mẫu thuộc chi *Lemna* là *Lemna aequinoctialis* (Hình 1A). Việc xây dựng cây phát sinh chủng loại được thực hiện dựa trên một số trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) và trình tự của mẫu thu được. Kết quả cho thấy có sự phân nhóm giữa các trình tự của mẫu khảo sát và các trình tự đã công bố (Hình 1B, C), như vậy các biến đổi trong trình tự có thể được sử dụng để phân loại vùng sinh thái của các mẫu bèo tấm.



Hình 1. Kết quả BLAST với 5 mẫu cho kết quả cao nhất vùng *atpF-atpH* và *psbK-psbI* của 06 mẫu bèo tấm khảo sát (A). Phân tích phát sinh chủng loại phân tử xây dựng dựa trên trình tự đoạn vùng *atpF-atpH* (B) và *psbK-psbI* (C) của 06 mẫu bèo tấm với các trình tự trên GeneBank bằng phần mềm MEGA 11; các chữ in hoa và số là mã số các dòng địa lý của loài *S. polyrhiza* và *L. aequinoctialis* được công bố trên GeneBank

Chương trình Clustal Omega được sử dụng để thực hiện căn chỉnh (alignment) các trình tự của vùng *atpF-atpH* và *psbK-psbI* của 3 mẫu *S. polyrhiza* và 3 mẫu *L. aequinoctialis* để xác định vị trí các SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms - đa hình nucleotide đơn lẻ). Mỗi SNP là một điểm khác biệt trong DNA, khi một nucleotide (A, T, C hoặc G) được thay thế bằng một nucleotide khác.

Kết quả căn chỉnh cho thấy các vị trí SNPs ở vùng *atpF-atpH* và vùng *psbK-psbI* ở các mẫu *S. polyrhiza* (Bảng 1) và *L. aequinoctialis* (Bảng 2). Kết quả phân tích trình tự cho thấy sự xuất hiện các SNPs có sự khác biệt giữa 2 vùng khảo sát và giữa 2 loài bèo tấm. Số lượng SNPs của mẫu *S. polyrhiza* thấp hơn của *L. aequinoctialis* ở cả 2 vùng khảo sát và số lượng SNPs của vùng *atpF-atpH* nhiều hơn so với vùng *psbK-psbI* ở cả 2 loài bèo tấm.

Bảng 1. Vị trí các SNPs ở vùng *atpF-atpH* (trái) và vùng *psbK-psbI* (phải) ở các mẫu *S. polyrhiza*

<i>atpF - atpH</i>	311	413	670	672	<i>psbK-psbI</i>	424	472
<i>S.polyrhiza</i> _LD1	G	G	A	T	<i>S.polyrhiza</i> _LD1	A	A
<i>S.polyrhiza</i> _LD2	A	A	A	A	<i>S.polyrhiza</i> _LD2	G	G
<i>S.polyrhiza</i> _LD3	G	G	C	A	<i>S.polyrhiza</i> _LD3	A	G

Đối với loài *S. polyrhiza* chỉ có 4 SNPs ở vùng *atpF-atpH* và 2 SNPs ở vùng *psbK-psbI* (Bảng 1). Đối với loài *L. aequinoctialis*, kết quả phân tích ở vùng *atpF-atpH* có đến 20 SNPs được xác định. Ở vùng *psbK-psbI* xuất hiện 8 SNPs và đặc biệt là 1 vị trí mất nu 439 (T/-) và 2 vị trí mất đoạn (DEL) ở mẫu *L. aequinoctialis*_LD1 và LD_2 so với mẫu *L. aequinoctialis*_LD3 (Bảng 2).

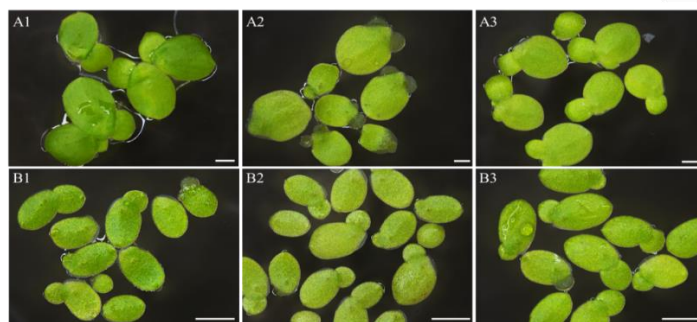
Kết quả thu được cho thấy tính bảo thủ ở các vùng khảo sát có sự khác nhau giữa các loài. Nhìn chung vùng *psbK-psbI* bảo thủ hơn (thể hiện ở số lượng SNPs ít) so với vùng *atpF-atpH*, bên cạnh đó tần số xuất hiện đột biến của *S. polyrhiza* thấp hơn nhiều so với của *L. aequinoctialis*. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Xu và cộng sự (2019) cho thấy *S. polyrhiza* có mức độ đa dạng di truyền thấp tương quan tới tần số đột biến thấp [22]. SNP có thể được sử dụng để khám phá các gene mới và chức năng của chúng bằng cách tác động đến biểu hiện gene, hoạt động phiên mã và hoạt động của trình tự khởi động dịch mã. Ở lúa, việc sử dụng bộ chỉ thị của 384 SNPs đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền và khả năng chuyển hóa đường từ rom rạ của 64 dòng lúa Việt Nam [23]. Như vậy, các SNPs cung cấp các thông tin không những ở mức độ phân tử để đánh giá đa dạng di truyền mà còn ở mức độ điều hòa biểu hiện gene quy định tính trạng, vì thế SNPs có vai trò quan trọng trong nghiên cứu và ứng dụng vào công tác chọn tạo giống cây trồng.

Bảng 2. Vị trí các SNPs ở vùng *atpF-atpH* và vùng *psbK-psbI* ở các mẫu *L. aequinoctialis*

<i>atpF - atpH</i>	57	60-60	63	166	177	202	260	265	289	337	399	438	458	524	540	562	565	610	640	646-647
<i>L.aequinoctialis</i> _LD1	T	AT	G	C	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	TG
<i>L.aequinoctialis</i> _LD2	-	TA	T	T	T	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	T	GC
<i>L.aequinoctialis</i> _LD3	-	TA	T	T	T	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	T	GC
<i>psbK-psbI</i>	107-128					158	185	204	292-296	327	374	439	521							
<i>L.aequinoctialis</i> _LD1						T	C	C	-	G	G	-	C							
<i>L.aequinoctialis</i> _LD2						T	C	C	-	G	G	-	A							
<i>L.aequinoctialis</i> _LD3	GATAGGTATAGTATAATT					G	G	G	ATTAT	T	T	T	A							

3.1.2. Đặc điểm hình thái các mẫu bèo tấm

Sự thay đổi giữa hình dạng lá (hay thường được gọi là frond), kích thước lá (chiều dài, chiều rộng và tỷ lệ dài/rộng), số lá/cụm và diện tích bề mặt giữa các mẫu *L. aequinoctialis* và *S. polyrhiza* đã được ghi nhận (Bảng 3). Hình dạng lá thay đổi bầu dục sang hình trứng, từ đối xứng sang không đối xứng và diện tích bề mặt (mm²) của lá lớn nhất cũng thay đổi từ 3,36 đến 4,65 đối với loài *L. aequinoctialis* và từ 21,85 đến 25,08 đối với loài *S. polyrhiza*. Số lượng lá trên mỗi cụm chủ yếu là 2 (một lá mẹ và một lá con) đối với loài *L. aequinoctialis*, và 3 (một lá mẹ và hai lá con) đối với loài *S. polyrhiza* (Hình 2). Sự khác nhau về hình thái của các mẫu thuộc cùng 1 loài cho thấy mỗi khu vực sinh thái đã có ảnh hưởng nhất định đến hình dạng và kích thước của lá bèo tấm. Như vậy, việc kết hợp các đặc điểm về hình thái và các SNPs đặc trưng trong các vùng trình tự khảo sát có thể là những thông tin hữu ích trong việc phân loại đến cấp độ dưới loài của các mẫu bèo tấm.



Hình 2. Sự khác biệt về mặt hình thái giữa các mẫu thuộc loài *S. polyrhiza* (A) và loài *L. aequinoctialis* (B). Thanh bar: 2 cm

A1: *S. polyrhiza*_LD1: Bầu dục dài, bất đối xứng; A2: *S. polyrhiza*_LD2: Bầu dục ngắn, bất đối xứng; A3: *S. polyrhiza*_LD1: Bầu dục tròn, bất đối xứng

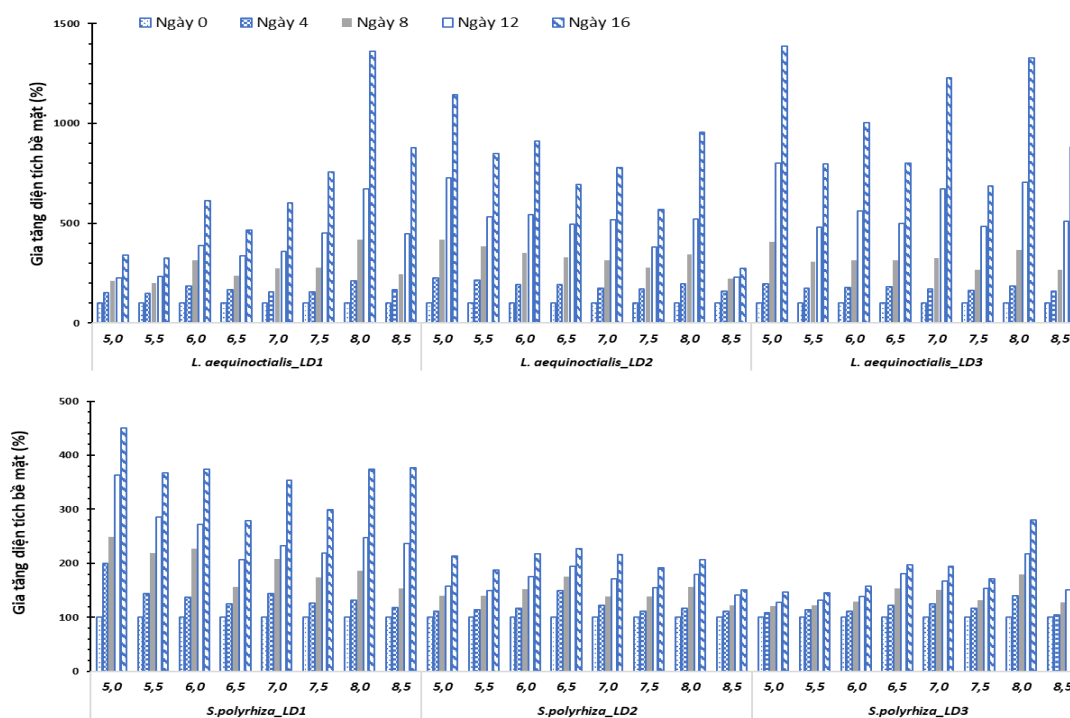
B1: *L. aequinoctialis*_LD1: Hình trứng dài, đối xứng; B2: *L. aequinoctialis*_LD2: Hình trứng tròn, bất đối xứng; B3: *L. aequinoctialis*_LD3: Hình trứng dài, đối xứng

Bảng 3. Sự đa dạng về hình thái của lá ở các mẫu bèo tấm

Mẫu	Hình dạng lá	Số lá/cụm	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Tỷ lệ dài/rộng	Diện tích bề mặt lá (mm ²)
<i>S. polyrhiza</i> _LD1	Bầu dục dài, bất đối xứng	3 - 4	6,72 ± 0,29	4,78 ± 0,19	1,41 ± 0,07	24,52 ± 0,79
<i>S. polyrhiza</i> _LD2	Bầu dục ngắn, bất đối xứng	3	6,39 ± 0,37	5,05 ± 0,47	1,27 ± 0,07	25,08 ± 4,35
<i>S. polyrhiza</i> _LD3	Bầu dục tròn, bất đối xứng	3 - 4	5,37 ± 0,27	4,29 ± 0,26	1,25 ± 0,09	21,85 ± 2,69
<i>L. aequinoctialis</i> _LD1	Hình trứng dài, đối xứng	2	2,69 ± 0,24	1,78 ± 0,06	1,52 ± 0,14	3,84 ± 0,32
<i>L. aequinoctialis</i> _LD2	Hình trứng tròn, bất đối xứng	2	2,87 ± 0,27	2,01 ± 0,18	1,44 ± 0,14	4,65 ± 0,84
<i>L. aequinoctialis</i> _LD3	Hình trứng dài, đối xứng	2	2,58 ± 0,19	1,67 ± 0,09	1,51 ± 0,11	3,36 ± 0,37

3.2. Ảnh hưởng của pH lên sự sinh trưởng và chỉ số SPAD

3.2.1. Ảnh hưởng của pH lên sự sinh trưởng của các mẫu bèo tấm



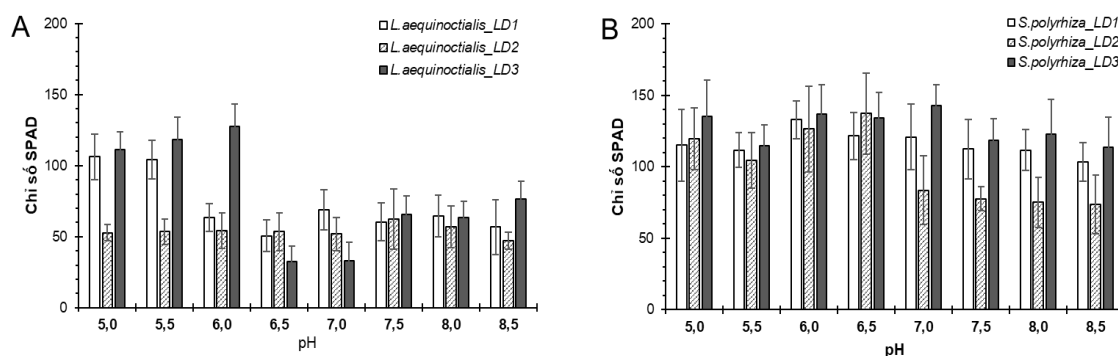
Hình 3. Ảnh hưởng của pH lên sự gia tăng diện tích bề mặt (%) của các mẫu bèo tấm *L. aequinoctialis* (trên) và *S. polyrhiza* (dưới)

Kết quả qua 16 ngày nuôi cấy của các mẫu nghiên cứu (Hình 3) thể hiện sự thay đổi trung bình diện tích bề mặt của 3 mẫu *L. aequinoctialis* theo thời gian dưới các mức pH khác nhau. Trong vòng 8 ngày đầu nuôi cấy, tốc độ gia tăng diện tích bề mặt tương đối chậm, tuy nhiên sau đó thì tốc độ tăng nhanh đáng kể. Nhìn chung, *L. aequinoctialis* LD3 có tiềm năng phát triển mạnh hơn trong môi trường pH thấp, trong khi *L. aequinoctialis* LD1 và *L. aequinoctialis* LD2 có xu hướng phát triển tốt hơn ở pH trung tính đến cao. Đối với 3 mẫu bèo tấm *S. polyrhiza* cho thấy chỉ có mẫu *S. polyrhiza* LD1 có sự thay đổi đáng kể về diện tích bề mặt từ sau ngày nuôi cấy thứ 8 trong khi sự sinh trưởng của 2 mẫu *S. polyrhiza* còn lại tương đối chậm ở dải pH nghiên cứu. Vì vậy, tùy từng mục đích nghiên cứu sẽ có sự lựa chọn mẫu thích hợp. Nếu mục tiêu là tăng trưởng tối đa, *S. polyrhiza* LD1 có tiềm năng nhất. Nếu cần sự ổn định, *S. polyrhiza* LD3 là lựa chọn tốt hơn. Từ kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của các mẫu bèo tấm *L. aequinoctialis* và *S. polyrhiza* cho thấy mỗi một dòng bèo tấm có điều kiện sinh trưởng khác nhau, điều này cho thấy khả năng thích nghi với các điều kiện ngoại cảnh của các dòng bèo tấm ở các khu vực địa lý khác nhau.

3.2.2. Ảnh hưởng của pH lên chỉ số SPAD của các mẫu bèo tấm

Chỉ số SPAD có sự khác biệt dưới ảnh hưởng của pH và theo đặc điểm của từng mẫu (Hình 4). Đối với các mẫu *L. aequinoctialis* cho thấy *L. aequinoctialis* LD3 có giá trị SPAD cao nhất trong các mức 5,0 - 6,0 nhưng sau đó giảm mạnh. *L. aequinoctialis* LD1 có xu hướng ổn định trong khi *L. aequinoctialis* LD2 luôn có giá trị SPAD thấp nhất trong suốt các mức đo. Đối với các mẫu *S. polyrhiza* cho thấy mẫu *S. polyrhiza* LD3 có chỉ số SPAD cao nhất trong các giá trị pH khảo sát, trong khi mẫu *S. polyrhiza* LD2 có chỉ số SPAD thấp nhất và ổn định hơn. Tóm lại, *L. aequinoctialis* có khả năng quang hợp tốt nhất trong môi trường acid nhẹ (pH 5,0 - 6,0) nhưng kém chịu đựng pH cao. Trong khi đó, *S. polyrhiza* có khả năng thích nghi tốt hơn với sự thay đổi pH, với giá trị SPAD khá ổn định từ pH 5,0 đến 8,5. Nếu trồng hai loài này trong điều kiện môi trường thay đổi pH, *S. polyrhiza* có ưu thế hơn do khả năng chịu đựng rộng hơn.

Khi đánh giá sự ảnh hưởng của pH đến sự gia tăng diện tích bề mặt và chỉ số SPAD của các mẫu bèo tấm khảo sát cho thấy *L. aequinoctialis* phát triển tốt nhất về mặt diện tích bề mặt ở pH 8,0 - 8,5, nhưng hàm lượng diệp lục cao nhất ở pH 6,0. Khi pH tăng lên, cây có xu hướng phát triển kích thước hơn là tăng cường quang hợp. Trong điều kiện pH cao, cây có thể mở rộng diện tích bề mặt để tối ưu hóa sự hấp thụ ánh sáng, bù đắp cho việc giảm hàm lượng diệp lục. Nếu mục tiêu là tối ưu quang hợp (SPAD cao), nên duy trì pH ~6,0; nếu mục tiêu là gia tăng sinh khối, pH 8,0 có thể là lựa chọn tốt hơn. Trong khi đó, các dòng *S. polyrhiza* khác nhau có phản ứng khác nhau với pH, ở pH trung tính (6,5 - 7,5) là điều kiện thuận lợi nhất cho sự phát triển diện tích bề mặt và chỉ số SPAD, khi pH quá thấp hoặc quá cao đều ảnh hưởng tiêu cực đến sự tăng trưởng và chỉ số SPAD.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH lên chỉ số SPAD của các mẫu bèo tấm *L. aequinoctialis* (A) và *S. polyrhiza* (B)

Như vậy, có thể thấy chiến lược sinh trưởng của 2 loài bèo tấm có sự khác biệt: đối với *L. aequinoctialis*, ưu tiên quang hợp khi môi trường thuận lợi (pH 6,0 - 6,5) hoặc ưu tiên mở rộng diện tích lá khi môi trường pH cao (pH 8,0 - 8,5) để duy trì hấp thụ ánh sáng. Giảm tốc độ tăng

trường khi pH quá thấp hoặc quá cao để tránh các căng thẳng sinh lý. Trong khi đó, ở *S. polyrhiza* cho thấy pH ảnh hưởng đến hấp thụ dinh dưỡng từ đó ảnh hưởng đến sự phát triển diện tích bề mặt và SPAD. Ở pH trung tính (6,5 - 7,5) là tối ưu cho sự phát triển do hấp thụ dinh dưỡng tốt, pH quá thấp (<6,0) hoặc quá cao (>7,5) có thể gây căng thẳng sinh lý, làm giảm hiệu suất quang hợp và tốc độ sinh trưởng. Từ những ghi nhận trên, chứng tỏ khả năng thích nghi của *L. aequinoctialis* đối với sự thay đổi/đa dạng của môi trường sống tốt hơn so với *S. polyrhiza*. Tuy nhiên, để tồn tại trong điều kiện bất lợi của môi trường sống, *S. polyrhiza* có chiến thuật sinh tồn rất đặc biệt đó là hình thành chồi ngủ (được gọi là turion), tích lũy nhiều tinh bột và chìm xuống đáy ao hồ, đến khi điều kiện ngoại cảnh thuận lợi trở lại, turion sẽ nảy mầm và tiếp tục phát triển [24].

Như vậy, kết quả của nghiên cứu này cho thấy mức độ đa dạng sinh học của các dòng bèo tấm tại Lâm Đồng từ hình thái, chỉ thị sinh học phân tử đến điều kiện sinh trưởng. Các nghiên cứu tiếp theo về mức độ tích lũy tinh bột, kim loại nặng,... sẽ cung cấp các dữ liệu có ý nghĩa cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng của bèo tấm ở các lĩnh vực khác nhau.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã sử dụng các chỉ thị phân tử để hỗ trợ định danh các mẫu bèo tấm thuộc chi *Spirodela* và *Lemna* thu tại Lâm Đồng, sự kết hợp chỉ thị *atpF-atpH* và *psbK-psbI* với đặc điểm hình thái đã xác định được các mẫu bèo tấm thu tại Lâm Đồng thuộc loài *S. polyrhiza* và *L. aequinoctialis*. Kết quả phân tích trình tự nucleotide của 2 chỉ thị cho thấy sự có mặt của các SNPs ở vùng *atpF-atpH* cao hơn so với vùng *psbK-psbI* và loài *L. aequinoctialis* cao hơn so với loài *S. polyrhiza*. Ngoài ra, sự đa dạng rất rõ ràng về mặt hình thái, kể cả là giữa các mẫu trong cùng một loài liên quan đến sự thay đổi trong trình tự gene. Bên cạnh đó, kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy mức độ đa dạng trong khả năng thích nghi của bèo tấm, có mẫu thích nghi tốt với dải pH rộng như *L. aequinoctialis* LD3 và *S. polyrhiza* LD1, trong khi một số mẫu khác lại phát triển mạnh ở giá trị pH tối ưu như *L. aequinoctialis* LD3 ở pH 8,0 hoặc *L. aequinoctialis* LD2 và LD3 ở pH 5,0.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] E. Landolt, *The family of Lemnaceae – a monographic study*, vol. 1, Publications of the Geobotanical Institute of the Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, 1986.
- [2] L. Braglia, S. Ceschin, M. A. Iannelli, M. Bog, M. Fabiani, G. Frugis, F. Gavazzi, S. Gianì, F. Mariani, M. Muzzi, E. Pelella, and L. Morello, "Characterization of the cryptic interspecific hybrid *Lemna*×*mediterranea* by an integrated approach provides new insights into duckweed diversity," *Journal of Experimental Botany*, vol. 75, no. 10, pp. 3092-3110, 2024.
- [3] J. Xu, H. Zhao, A.-M. Stomp, and J. J. Cheng, "The production of duckweed as a source of biofuels," *Biofuels*, vol. 3, no. 5, pp. 589-601, 2012.
- [4] K. S. Sree, S. Maheshwari, K. Boka, P. Khurana, Á. Keresztes, and K.-J. Appenroth, "The duckweed *Wolffia microscopica*: A unique aquatic monocot," *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, vol. 210, pp. 31-39, 2014.
- [5] W. Cui and J. J. Cheng, "Growing duckweed for biofuel production: a review," *Plant Biol (Stuttg)*, vol. 17 Suppl. 1, pp. 16-23, Jan 2015.
- [6] Y. Liu, X. Chen, X. Wang, Y. Fang, Y. Zhang, M. Huang, and H. Zhao, "The influence of different plant hormones on biomass and starch accumulation of duckweed: A renewable feedstock for bioethanol production," *Renewable Energy*, vol. 138, pp. 659-665, 2019.
- [7] D. Pagliuso, A. Grandis, E. Lam, and M. S. Buckeridge, "High Saccharification, Low Lignin, and High Sustainability Potential Make Duckweeds Adequate as Bioenergy Feedstocks," *BioEnergy Research*, vol. 14, no. 4, pp. 1082-1092, 2021.
- [8] V. R. Patel and N. Bhatt, "Aquatic weed *Spirodela polyrhiza*, a potential source for energy generation and other commodity chemicals production," *Renewable Energy*, vol. 173, pp. 455-465, 2021.
- [9] Q. Rana, M. A. N. Khan, Z. Shiekh, S. Parveen, S. Ahmed, M. Irfan, R. Gauttam, A. A. Shah, A. Jamal, and S. Khan, "Production of bioethanol and biogas from *Spirodela polyrhiza* in a biorefinery concept and output energy analysis of the process," *Biomass Conversion and Biorefinery*, vol. 13, pp. 11219-11228, 2023.
- [10] T. Ahammed, S. Islam, M. R. Amin, M. M. Kamal, and M. O. Faruque, "Effect of *Spirodela Polyrhiza* on Physio-Chemical Changes in Industrial Wastewater," *Pollution Research*, vol. 42, no. 04, pp. 413-423, 2023.

- [11] N. Coughlan, É. Walsh, P. Bolger, G. Burnell, N. O' Leary, M. O'Mahoney, S. Paolacci, D. Wall, and M. Jansen, "Duckweed bioreactors: Challenges and opportunities for large-scale indoor cultivation of Lemnaceae," *Journal of Cleaner Production*, vol. 336, 2022, Art. no. 130285.
- [12] T. Stadlander, F. Tschudi, A. Seitz, M. Sigrist, D. Refardt, and F. Leiber, "Partial replacement of fishmeal with duckweed (*Spirodela polyrhiza*) in feed for two carnivorous fish species, Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)," *Aquaculture Research*, vol. 2023, no. 1, 2023, Art. no. 6680943.
- [13] N. On-Nom, P. Promdang, W. Inthachat, P. Kanoongon, Y. Sahasakul, C. Chupeerach, U. Suttisansanee, and P. Temviriyankul, "Wolffia globosa-Based Nutritious Snack Formulation with High Protein and Dietary Fiber Contents," *Foods*, vol. 12, no. 14, 2023, Art. no. 2647.
- [14] D. S. Said, T. Chrismadha, N. Mayasari, D. Febrianti, and A. R. M. Suri, "Nutrition Value and Growth Ability of Aquatic Weed *Wolffia globosa* as Alternative Feed Sources for Aquaculture System," *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 950, no. 1, 2022, Art. no. 012044.
- [15] W. Wang, R. A. Kerstetter, and T. P. Michael, "Evolution of Genome Size in Duckweeds (Lemnaceae)," *Journal of Botany*, vol. 2011, pp. 1-9, 2011.
- [16] M. Bog, S. Xu, A. Himmelbach, R. Brandt, F. Wagner, K. J. Appenroth, and K. S. Sree, "Genotyping-by-Sequencing for Species Delimitation in Lemna Section *Uninerves* Hegelm. (Lemnaceae)," in *The Duckweed Genomes*, X. H. Cao, P. Fourounjian, and W. Wang, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 115-123.
- [17] S. Letsiou, P. Madesis, E. Vasdekis, C. Montemurro, M. E. Grigoriou, G. Skavdis, V. Moussis, A. E. Koutelidakis, and A. G. Tzakos, "DNA Barcoding as a Plant Identification Method," *Applied Sciences*, vol. 14, no. 4, 2024, Art. no. 1415.
- [18] Y. Song, X. J. He, M. Chen, L. L. Zhang, J. Li, and Y. Deng, "Effects of pH on the Submerged Macrophyte *Hydrilla verticillata*," *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 65, no. 4, pp. 611-619, 2018.
- [19] K. J. Appenroth, D. J. Crawford, and D. H. Les, "After the genome sequencing of duckweed - how to proceed with research on the fastest growing angiosperm?," *Plant Biol (Stuttg)*, vol. 17, Suppl. 1, pp. 1-4, Jan 2015.
- [20] W. Wang, Y. Wu, Y. Yan, M. Ermakova, R. Kerstetter, and J. Messing, "DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots," *BMC Plant Biol*, vol. 10, 2010, Art. no. 205.
- [21] N. Borisjuk, P. Chu, R. Gutierrez, H. Zhang, K. Acosta, N. Friesen, K. S. Sree, C. Garcia, K. J. Appenroth, and E. Lam, "Assessment, validation and deployment strategy of a two-barcode protocol for facile genotyping of duckweed species," *Plant Biology*, vol. 17, no. s1, pp. 42-49, 2015.
- [22] S. Xu, J. Stapley, S. Gablenz, J. Boyer, K. J. Appenroth, K. S. Sree, J. Gershenzon, A. Widmer, and M. Huber, "Low genetic variation is associated with low mutation rate in the giant duckweed," *Nature Communications*, vol. 10, no. 1, 2019, Art. no. 1243.
- [23] X. T. Duong, T. D. Nguyen, H. Claire, M. M. Simon, G. Leonardo, V. T. Nguyen, and H. L. Le, "Genetic diversity analysis via 384 SNPs and rice straw digestibility evaluation of some Vietnamese rice accessions," *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, vol. 3, no. 57, pp. 53-60, 2015.
- [24] K.-J. Appenroth, "Clonal differences in the formation of turions are independent of the specific turion-inducing signal in *Spirodela polyrhiza* (great duckweed)," *Plant Biology*, vol. 4, no. 06, pp. 688-693, 2002.