

# KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA ETHYL METHANE SULFONATE ĐẾN SỰ PHÁT SINH BIẾN DỊ TRÊN CÂY HOA CHUÔNG (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern) TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO*

Nguyễn Thị Pha<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hoàng Nhi<sup>1</sup>,  
Mai Thanh Thảo<sup>1</sup>, Trần Duy Khang<sup>1</sup>, Phan Thị Thu Hiền<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.2022.6.021-028>

## TÓM TẮT

Hoa chuông (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern), họ Gesneriaceae là một trong những loài hoa lạ, hấp dẫn vì vẻ đẹp về màu sắc và hình dáng cũng như độ bền của hoa. Nghiên cứu sử dụng đoạn thân của cây hoa chuông *in vitro* xử lý EMS (Ethyl Methane Sulfonate) với các nồng độ (0%; 0,4%; 0,8%; 1,2% và 1,6%) trong 1 giờ và 1,5 giờ. Kết quả ghi nhận nghiệm thức (NT) có kiểu hình khác biệt so với đối chứng là các mẫu xử lý EMS với các nồng độ (0,4%; 0,8%) trong 1 giờ và 1,5 giờ. Kỹ thuật ISSR (Inter simple sequence repeat) được sử dụng để khảo sát khác biệt di truyền 8 cây hoa chuông được tái sinh từ các nghiệm thức xử lý EMS ở các nồng độ khác nhau so với mẫu đối chứng. Với 8 mẫu ISSR sử dụng ghi nhận tổng cộng 250 băng có kích thước 242-2276 cặp nucleotide trung bình thu được 31,25 băng/mẫu. Số băng đơn hình 14,5 băng/mẫu, chiếm 46,4%, số băng đa hình 16,75 băng/mẫu, chiếm 53,6%. Chỉ số PIC trung bình thu được là 0,24. Giảm đồ phả hệ dựa trên dấu ISSR cho thấy có sự khác biệt về mặt di truyền giữa các mẫu đoạn thân cây hoa chuông với hệ số tương đồng thấp nhất 44,44% ở mẫu cây hoa chuông xử lý EMS 0,8% trong 1 giờ.

**Từ khóa:** Biến dị, Ethyl Methane Sulfonate (EMS), ISSR, *Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa chuông (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern), chi *Sinningia*, họ Gesneriaceae còn có nhiều tên gọi khác nhau như tử la lan, hoa tình yêu (valentine)... là một loài cây thân thảo, có củ nằm dưới mặt đất, lá rộng, sống lâu năm và có nguồn gốc từ Đông Nam Brazil. Hoa có hình chuông, mọc đơn lẻ hay mọc thành từng cụm nhiều bông, đa dạng về kiểu dáng với nhiều màu sắc khác nhau. Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển của công nghệ tế bào thực vật, công nghệ xử lý đột biến *in vitro* bằng hóa chất đã trở thành công cụ hữu hiệu trong chọn tạo giống cây trồng. Một trong những chất hóa học được biết đến với khả năng gây đột biến ở nấm, thực vật là EMS có công thức  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$ . Theo Altindal (2018) EMS là hóa chất làm thay đổi cấu trúc hóa học của các nucleotide bằng cách tương tác với DNA và RNA tạo đột biến ngẫu nhiên bằng cách thay thế nucleotide. Theo Greene và cộng sự (2003), EMS gây ra các đột biến ngẫu nhiên trên toàn bộ bộ gen bất kể cấu trúc nhiễm sắc hoặc trình tự DNA. EMS cũng

được dùng xử lý mẫu cây *in vitro* của nhiều loài thực vật nhằm thu nhận các biến dị trên tế bào soma (Amini, 2014). Dấu phân tử ISSR là dấu phân tử được sử dụng rộng rãi để nhận diện sự biến đổi di truyền ở thực vật. Cách tiếp cận phân tử để xác định kiểu gen thực vật có hiệu quả hơn so với các dấu hình thái vì nó cho phép khảo sát trực tiếp tới hệ gen thực vật, không bị ảnh hưởng bởi môi trường và có thể phát hiện được trong tất cả các giai đoạn phát triển của cây (Lê Y Phụng và cộng sự, 2018). Các dấu phân tử ISSR đã được sử dụng trong nghiên cứu mối quan hệ phát sinh loài của quần thể cây thuộc chi *Citrus* ở tỉnh Fars, Iran (Shahsavari et al., 2007). Xác định đa dạng di truyền quần thể ba kích tím theo Trần Thị Hương Giang và cộng sự (2020), đa dạng di truyền các dòng/giống đậu nành (Huỳnh Kỳ và cộng sự, 2021). Với mục tiêu phát triển nhiều dòng hoa chuông mới có kiểu hình lá, hoa lạ độc đáo góp phần tạo ra nhiều giống mới cũng như gia tăng nguồn biến dị cho giống hoa này, nghiên cứu được thực hiện.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và hóa chất

**Vật liệu:** Đoạn thân cây hoa chuông *in vitro* được nhân từ một dòng vô tính từ mẫu lá cây trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BAP, 0,2 mg/L NAA, 30g/L sucrose và 7g/L agar (Nguyễn Quang Thạch và cộng sự, 2004)

**Hóa chất:** Môi trường nuôi cấy cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962), pH (5,7 – 5,8) . Một số hóa chất khác như:  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (NAA), 6-Benzylaminopurine (BAP), EMS, 8 môi ISSR (Bảng 1), các hóa chất thực hiện ly trích DNA và thực hiện phản ứng PCR.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của EMS đến sự tạo biến dị ở đoạn thân cây hoa chuông

Mẫu đoạn thân cây hoa chuông *in vitro* (15 mẫu/NT) được ngâm trong EMS ở 6 nồng độ khác nhau (0%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; 1,2% và 1,6%) với thời gian 1 giờ và 1,5 giờ để khảo sát sự tái sinh chồi. Sau khi xử lý EMS, các mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng và cấy vào môi trường nhân chồi MS bổ sung 1 mg/L BAP, 0,02 mg/L NAA, 6,5 g/L agar và 30 g/L saccarose (Lã Thị Thu Hằng, 2015). Ghi nhận số chồi và hình thái chồi ở thời điểm 60 ngày và

90 ngày. Tất cả những mẫu này được đặt trong phòng nuôi cấy nhiệt độ dao động  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , cường độ ánh sáng 2.000 lux và thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

#### 2.2.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát, đánh giá sự phát sinh biến dị bằng kỹ thuật PCR - ISSR

##### 2.2.2.1. Ly trích DNA

Dựa trên kết quả phân tích hình thái chồi ở thí nghiệm 1, cây tái sinh có đặc điểm hình thái khác biệt so với đối chứng được chọn để đánh giá bằng chỉ thị phân tử ISSR. Ly trích DNA tổng số theo quy trình mô tả của (Roger & Bendich, 1988)

##### 2.2.2.2. Phản ứng PCR - ISSR

Môi ISSR được tổng hợp tại Công ty sinh hóa Phù Sa, Cần Thơ. Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 15  $\mu\text{l}$ . Thành phần một phản ứng PCR gồm nước cất tiệt trùng 2 lần: 8,8  $\mu\text{l}$ , hỗn hợp myTaq buffer 5X: 3  $\mu\text{l}$ , 1,2  $\mu\text{l}$  môi ISSR nồng độ 10 pmol, 2  $\mu\text{l}$  DNA khuôn nồng độ 50 ng. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy PCR với chu trình nhiệt:  $94^\circ\text{C}$  - 5 phút;  $94^\circ\text{C}$  - 45 giây; 50 -  $61,3^\circ\text{C}$  phụ thuộc vào môi (Bảng 1) - 1 phút;  $72^\circ\text{C}$  - 2 phút; lặp lại 40 lần từ bước 2 đến bước 4;  $72^\circ\text{C}$  - 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 2% ở hiệu điện thế 120 Volt, trong 80 phút sử dụng dung dịch đệm TBE (Tris-Borate-EDTA).

**Bảng 1. Tên môi ISSR, trình tự môi và nhiệt độ gắn môi trong phản ứng PCR**

Tên môi	UBC-830	UBC-810	UBC-818	ISSRHA	ISSR2	ISSR3	ISSR4	ISSR7
Trình tự môi (5'-3')	(TG)8G	(GA)8T	(CA)8G	AGA GAG AGA GAG AGA GAG AGG	(AG)8C	(GA)8YG	(AC)8G	(AC)8C
Tm ( $^\circ\text{C}$ )	52,4	50,0	52,4	61,3	52,4	55,0	50,0	52,4

Ghi chú: Y là base C hoặc T.

#### Xử lý số liệu

Tất cả băng xuất hiện trên phổ điện di được mã hóa thành số theo dạng nhị phân (1 và 0), 1 tương ứng với locus được khuếch đại, 0 tương

ứng với locus không được khuếch đại. Chỉ số PIC (Polymorphism Information Content) là chỉ số đa hình di truyền hay còn gọi là thước đo độ

đa hình. PIC được tính theo công thức:

$$PIC = 1 - \sum P_i^2$$

Trong đó:

$P_i$  là tần xuất xuất hiện của band DNA trên tổng số băng đa hình (Botstein et al., 1980).

Các số liệu xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel, giản đồ phân nhánh được xây dựng trên phần mềm BioDiversity Pro. Trọng lượng phân tử các băng DNA được tính toán bằng phần mềm GelAnalyzer 19.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của EMS đến sự tạo biến dị ở đoạn thân cây hoa chuông

Sau 60 ngày khảo sát, có 5/8 nghiệm thức (NT) có chồi tái sinh với tỉ lệ tái sinh chồi cao nhất đạt 100% ở NT đối chứng (ĐC) và thấp nhất đạt 33,33% ở nghiệm thức 0,8% EMS-1,5 giờ. Các NT 0,4% EMS-1 giờ, 0,4% EMS-1,5 giờ và 0,8% EMS-1 giờ có tỷ lệ tái sinh lần lượt là 93,33%, 80% và 53,33%. Nhìn chung, nồng độ EMS và thời gian xử lý càng tăng khả năng tái sinh chồi càng giảm. Số chồi tái sinh bị ảnh hưởng khi tăng nồng độ và số cây tái sinh thu được theo một xu hướng tương đồng. Kết quả Bảng 2, với nồng độ EMS tăng dần từ 0 – 0,4% - 0,8% - 1,2% - 1,6% thì số chồi thu được cao nhất ở NT ĐC đạt 55 chồi và giảm dần đạt 9 chồi ở NT 0,4%, 7 chồi NT 0,8%. Không thu được chồi tái sinh ở nồng độ 1,2%, 1,6%. Kết quả xử lý EMS ở thời gian 1,5 giờ cũng thu được tương tự 1 giờ, số chồi tái sinh giảm một cách đáng kể khi nồng độ EMS tăng. Cụ thể NT 0,4% thu được 7 chồi, NT 0,8% chỉ thu được 2 chồi và không thu được chồi tái sinh ở NT7, NT8. Về hình thái chồi ở các chỉ tiêu khảo sát các NT có xử lý EMS đều tạo được khác biệt và phát triển kém hơn so với NT ĐC. NT ĐC có chiều cao trung bình (4,25 cm/chồi), số lá trung bình (5,8 lá/chồi) lá có màu xanh, phát triển bình thường; Ở NT xử lý EMS 0,8% trong 1,5 giờ cây có chiều cao trung bình 2,7 cm/chồi và số lá trung bình 4,2 lá/chồi thấp nhất so với các NT còn lại

có cây tái sinh. Về mặt hình thái khi xử lý EMS so với ĐC ghi nhận một số khác biệt như: phiên lá xoắn (NT1, NT5, NT6), xuất hiện lá có màu hồng (NT2).

Quan sát chồi ở thời điểm 90 ngày nuôi cây cho thấy có sự khác biệt rõ về số chồi và hình thái chồi ở các NT, bên cạnh đó còn ghi nhận sự phát sinh rễ ở các NT (Bảng 2, Hình 1). NT ĐC với số chồi tăng lên 81 chồi, chiều cao trung bình 4,9 cm/chồi, số lá trung bình 8,1 lá/chồi cao nhất trong tất cả NT, lá màu xanh, xuất hiện rễ; NT6 với chiều cao và số lá trung bình thấp nhất, lần lượt là 3 cm/chồi và 5,2 lá/chồi. Số chồi đều tăng ở các NT có cây tái sinh: NT1 có 18 chồi, NT2 có 11 chồi, NT5 có 12 chồi, NT6 có 5 chồi và các NT không tái sinh ở 60 ngày đều chết khi theo dõi đến 90 ngày. Về hình thái chồi so với thời điểm 60 ngày một số dạng mới xuất hiện như cuống lá dày, dính lại với nhau bao quanh thân (NT1); chóp lá màu cam, phát sinh rễ.

Kết quả hình thái cây hoa chuông tái sinh xử lý EMS so với cây đối chứng cho thấy có sự khác biệt. Sự khác biệt về kiểu hình màu sắc trên phiên lá cây hoa chuông khi nuôi cây trong điều kiện *in vitro* chứng tỏ có sự thay đổi vật chất di truyền của các mẫu hoa chuông sau khi xử lý đột biến bằng tác nhân EMS. Theo (Sikora et al., 2011), EMS gây ra đột biến ngẫu nhiên. Khi nồng độ EMS tăng lên, xác suất cảm ứng đột biến có thể tăng lên. Những đột biến này có thể dẫn đến những khiếm khuyết trong quá trình tổng hợp các hợp chất cần thiết cho cây trồng. Liều cao hơn có thể sẽ gây ra nhiều tổn thương di truyền hơn trên các cây được xử lý, điều này có thể giải thích tại sao tỷ lệ sống sót thấp hơn khi xử lý EMS ở nồng độ cao (Baghery et al., 2016). Sự giảm tỷ lệ sống của cây khi nồng độ EMS và thời gian xử lý tăng lên đã được nghiên cứu bởi (Das et al., 2010) ở chi *Withania*, chi *Horsegram* (Kulkarni, 2011) và trên nhiều loại cây trồng khác.

**Công nghệ sinh học & Giống cây trồng**

**Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của EMS đến hình thái chồi sau 60 ngày và 90 ngày**

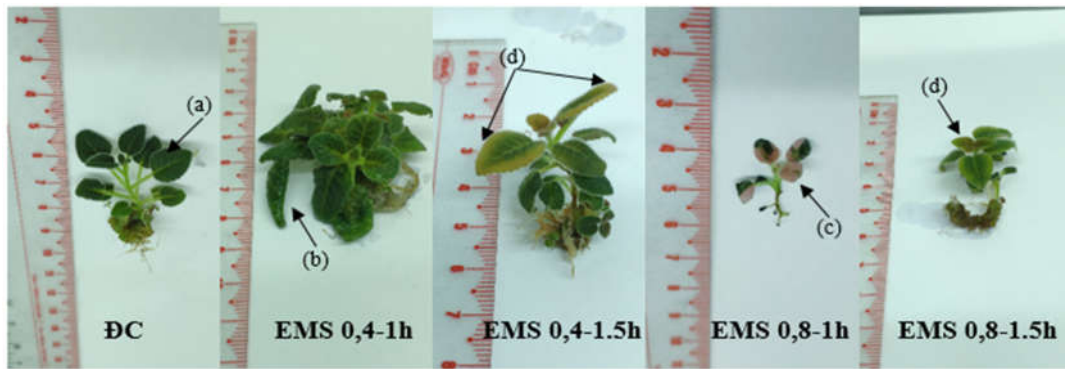
Nghiem thức	Nồng độ (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Hình thái chồi sau 60 ngày				Hình thái chồi sau 90 ngày				Phát sinh rễ
			Số chồi	Chiều cao trung bình (cm)	Số lá trung bình	Màu sắc lá	Số chồi	Chiều cao trung bình (cm)	Số lá trung bình	Màu sắc lá	
Đối chứng (ĐC)	0	0	55	4,3	5,8	Lá màu xanh	81	4,9	8,1	Lá màu xanh	+++
1	0,4		9	3,4	5,4	Phiến lá xoắn, lá có màu xanh	18	3,7	7,8	Cuống lá dày, dính lại với nhau bao quanh thân, lá có màu xanh	++
2	0,8	1	7	2,6	4,5	Lá có màu xanh xuất hiện lá có màu hồng	11	3,1	5,3	Lá có màu hồng	+
3	1,2		-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1,6		-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0,4		7	3,1	5,3	Lá màu xanh, phiến lá xoắn	12	3,5	7,4	Chóp lá xuất hiện màu cam	++
6	0,8	1,5	2	2,7	4,2	Lá màu xanh, phiến lá xoắn	5	3,0	5,2	Chóp lá xuất hiện màu cam	+
7	1,2		-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	1,6		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: “-“ biểu thị mẫu khảo sát của nghiệm thức không thu được kết quả;

“+++” có một vài sợi rễ, ngắn;

“++” rễ ít, ngắn;

“+” có xuất hiện rễ, sợi nhỏ.



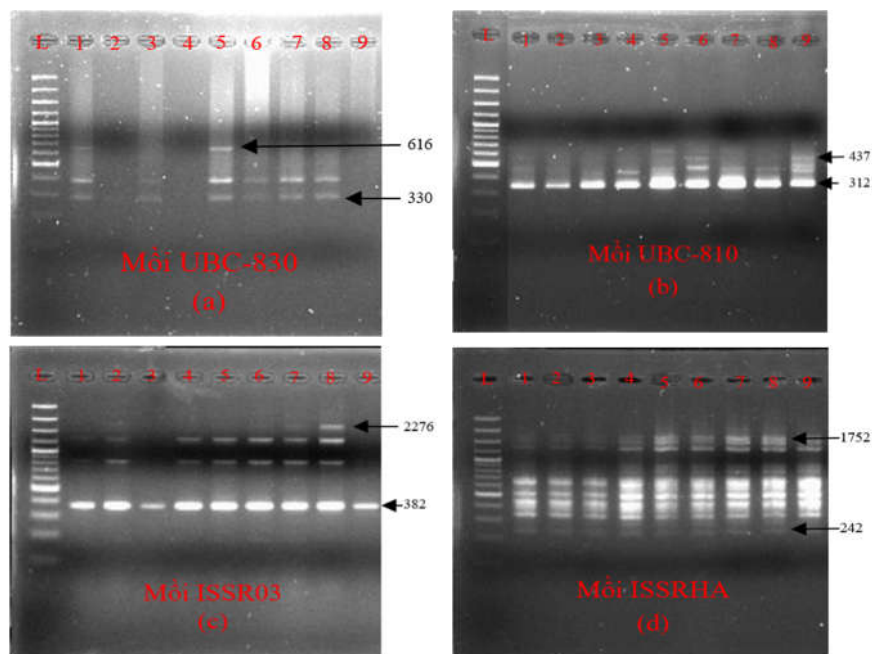
**Hình 1. Mẫu chồi khảo sát hình thái thời điểm 90 ngày nuôi cây**

(a) Lá màu xanh; (b) Phiến lá xoắn; (c) Lá có màu hồng có dấu hiệu chuyển lại màu xanh; (d) Chóp lá màu cam

### 3.2. Kết quả khảo sát sự phát sinh biến dị bằng kỹ thuật PCR - ISSR

Từ kết quả ghi nhận về hình thái ở thí nghiệm 1, 8 cây hoa chuông được tái sinh trong 4 NT (mỗi NT chọn 2 cây) có sự khác biệt về đặc điểm hình thái như: màu sắc lá, hình dạng phiến lá so với đối chứng, được chọn để khảo sát khác biệt di truyền so với đối chứng bằng kỹ thuật PCR - ISSR. Trong 8 môi khảo sát ghi nhận 8/8 môi có khả năng bắt cặp và khuếch đại sản phẩm trên DNA khuôn với tổng số băng là 250, trung bình thu được 31,25 băng/môi. Số băng đơn

hình trung bình thu được 14,5 băng/môi, chiếm 46,4%, số băng đa hình trung bình thu được 16,75 băng/môi chiếm 53,6% (Bảng 3). Mức độ đa hình của các băng DNA thu được phản ánh sự khác nhau trong cấu trúc DNA của hệ gen ở lá. Chỉ số PIC thu được trung bình là 0,24, cao nhất 0,38 ở môi UBC-830 (Hình 2a) và thấp nhất 0,16 ở môi UBC-810 (Hình 2b) và ISSR3 (Hình 2c). Băng lớn nhất có kích thước khoảng 2276 bp ở môi ISSR3 (Hình 2c) và môi ISSRHA có băng kích thước nhỏ nhất khoảng 242 bp (Hình 2d).



**Hình 2. Kết quả PCR – ISSR các môi UBC-830, UBC-810, ISSR03 và ISSRHA**

Chú thích: L: Thang chuẩn (100bp plus fermentas); 1, 2 cây được xử lý EMS mức 0,4% trong 1 giờ; 3, 4 cây được xử lý EMS mức 0,4% trong 1,5 giờ; 5, 6 cây được xử lý EMS mức 0,8% trong 1 giờ; 7, 8 cây được xử lý EMS mức 0,8% trong 1,5 giờ; 9: Cây đối chứng (ĐC). (a) Môi UBC-830; (b) Môi UBC-810; (c) Môi ISSR03; (d) Môi ISSRHA.

**Bảng 3. ISSR được sử dụng để phân tích sự đa dạng di truyền trên cây hoa chuông**

STT	Tên mẫu	Số băng thu được	Số băng đơn hình	Tỷ lệ băng đơn hình (%)	Số băng đa hình	Tỷ lệ băng đa hình (%)	Chỉ số PIC	Kích thước băng (bp)
1	ISSR2	23	9	39	14	61	0,29	346-1226
2	ISSR3	35	27	77	8	23	0,16	361-2276
3	ISSR4	37	0	0	37	100	0,28	362-2014
4	ISSR7	38	9	24	29	76	0,24	264-736
5	ISSRHA	57	36	63	21	37	0,20	242-1752
6	UBC-810	22	18	82	4	18	0,16	312-437
7	UBC-818	23	17	74	6	26	0,21	376-680
8	UBC-830	15	0	0	15	100	0,38	330-616
Tổng số băng		250	116		134	53		242 – 2534 bp
<b>Trung bình</b>		<b>31,25</b>	<b>14,5</b>	<b>46,4</b>	<b>16,75</b>	<b>53,6</b>	<b>0,24</b>	

Hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây phá hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu (Bảng 4, Hình 3). Hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng 44,44 - 79,41%. Độ tương đồng càng nhỏ thì sự khác nhau về vật chất di truyền giữa các nghiệm thức với mẫu đối chứng càng lớn và khả năng biến dị sẽ xảy ra càng cao. Dựa vào cây phân loại được xây dựng dựa trên các dữ liệu về khoảng cách di truyền cho thấy 9 cây hoa chuông được phân thành 3 nhóm chính (Hình 3). Trong đó, nhóm 1 chỉ có cây số 5 (cây tái sinh xử lý EMS 0,8% trong 1 giờ) khác biệt di truyền so với ĐC là 44,44%, Nhóm 2 gồm cây số 6 (cây tái sinh xử lý EMS 0,8% trong 1 giờ) và mẫu 9 (ĐC) hệ số tương đồng của 2 mẫu trong nhóm này 79,41%. Nhóm 3 bao gồm 6 cây: 2, 4, 7, 8, 3, 1 với mỗi

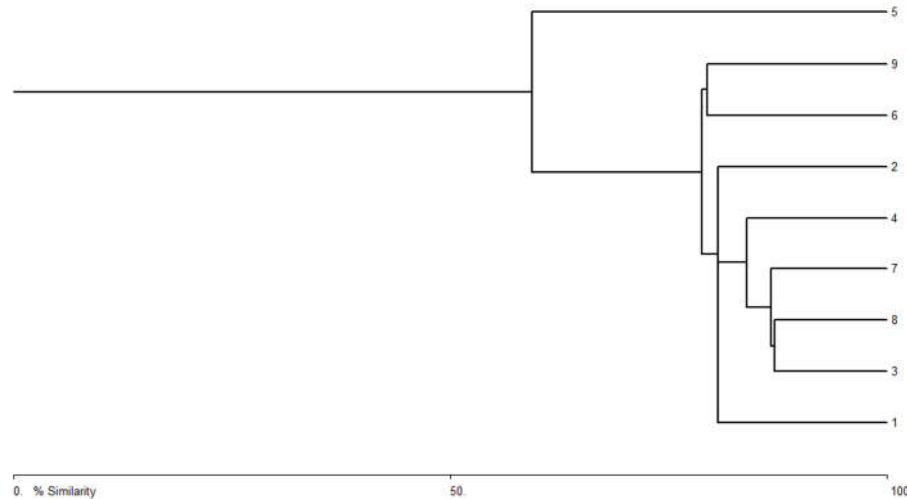
cây tương ứng với các nồng độ EMS như (Bảng 4) và có hệ số tương đồng giữa các cây này so với cây đối chứng dao động từ 65,71% đến 78,79%.

Qua kết quả phân nhóm di truyền cho thấy nồng độ EMS xử lý có tác động đến vật chất di truyền khi khảo sát bằng chỉ thị PCR-ISSR, nhưng sự tác động này không giống nhau dù sử dụng cùng nồng độ EMS. Cây số 5 được xử lý EMS 0,8 – 1 giờ có hệ số tương đồng khi so với ĐC là 44,44% đây cũng là hệ số tương đồng thấp nhất, chứng tỏ mẫu này có sự khác biệt di truyền cao nhất so với ĐC. Tuy nhiên, vẫn nồng độ EMS 0,8 – 1 giờ ở cây số 6 chỉ tạo khác biệt so với ĐC 20,59%, tương tự cây số 7, số 8 với EMS 0,8 – 1,5 giờ tạo khác biệt so với ĐC lần lượt là 29,41%, 28,57%.

**Bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền của 8 cây hoa chuông *in vitro* sau khi xử lý với EMS so với cây đối chứng**

Mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*	77,42	80,65	71,88	54,84	67,65	80,00	80,65	65,71
2	*	*	78,13	80,65	40,00	70,59	77,42	78,13	78,79
3	*	*	*	83,87	56,25	73,53	80,65	87,10	71,43
4	*	*	*	*	53,13	70,59	71,88	83,87	68,57
5	*	*	*	*	*	59,38	41,18	51,52	44,44
6	*	*	*	*	*	*	67,65	68,57	79,41
7	*	*	*	*	*	*	*	86,67	70,59
8	*	*	*	*	*	*	*	*	71,43
9	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Chú thích: 1, 2 cây được xử lý EMS mức 0,4% trong 1 giờ; 3,4 cây được xử lý EMS mức 0,4% trong 1,5 giờ; 5, 6 cây được xử lý EMS mức 0,8% trong 1 giờ; 7, 8 cây được xử lý EMS mức 0,8% trong 1,5 giờ; 9: Cây đối chứng (ĐC).



**Hình 3. Sơ đồ hình cây phả hệ của 8 cây hoa chuông *in vitro* sau khi xử lý với EMS so với cây đối chứng**

Chú thích: 1, 2 cây được xử lý EMS mức 0,4% trong 1 giờ; 3,4 cây được xử lý EMS mức 0,4% trong 1,5 giờ; 5, 6 cây được xử lý EMS mức 0,8% trong 1 giờ; 7, 8 cây được xử lý EMS mức 0,8% trong 1,5 giờ; 9: Cây đối chứng (ĐC).

Có thể giải thích cho sự khác biệt này do EMS là một chất gây đột biến hóa học một cách ngẫu nhiên trong vật chất di truyền, do vậy không phụ thuộc nhiều vào nồng độ mà phụ thuộc vào EMS khi tác động vào tế bào đảm bảo sự tái sinh chồi và nồng độ tác động vào vật chất di truyền nhưng vẫn không làm chết mẫu. Điều này tương tự nghiên cứu (Greene et al., 2003) khi gây đột biến EMS ở cây *Arabidopsis* kết quả có sự xuất hiện và tạo ra các đột biến phân bố ngẫu nhiên trong toàn bộ bộ gen, loài *Lotus japonicus* (Mohd-Yusoff, 2015) EMS đã tạo ra một phổ đột biến ngẫu nhiên trên toàn bộ bộ gen của cây đột biến và có khuynh hướng thay đổi G/C thành A/T khi giải trình tự.

#### 4. KẾT LUẬN

Đoạn thân cây hoa chuông *in vitro* xử lý EMS ở nồng độ 0,4% và 0,8% ở 2 mức thời gian trong 1 giờ và 1,5 giờ thu được cây tái sinh và có hình thái khác biệt so với ĐC. Kỹ thuật ISSR khảo sát sự khác biệt về mặt di truyền giữa cây xử lý EMS và cây đối chứng thu được cây tái sinh từ nghiêm thức xử lý EMS 0,8% trong 1 giờ có hệ số tương đồng thấp nhất 44,44% so với cây ĐC. Kết quả nghiên cứu cho thấy EMS là hóa chất gây đột biến dạng ngẫu nhiên vì thế chọn lọc các thể biến dị theo cá thể (cây tái sinh riêng lẻ) có kết hợp quan sát hình thái và di

truyền có ý nghĩa trong việc tìm ra cây mang biến dị phục vụ công tác tạo giống mới.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ananya Das, Animesh K. Datta, Arnab Bhattacharya, Anjan Bhattacharyya, Shyamal Ghose (2010). EMS induced mutagenesis in 'Poshita' and 'Jawahar 22' of *Withania somnifera* (L.) Dunal (*Solanaceae*). *Cytologia*, 75. 305 - 311.
2. Demet Altindal, Nüket Altindal (2018). Effect of Ethyl Methanesulphonate (EMS) applications on *in vitro* growth of sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Palancı-1) under salinity conditions. *Journal of the Institute of Science and Technology*. 351 - 359.
3. Mohsen Amini (2014). Ethyl Methanesulfonate. In Philip Wexler (Editor), *Encyclopedia of Toxicology*. Academic Press. 522 - 524.
4. David Botstein, Raymond L. White, Mark Skolnick, Ronald W. Davis (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 314 - 331.
5. Elizabeth A Greene, Christine A Codomo, Nicholas E Taylor, Jorja G Henikoff, Bradley J Till, Steven H Reynolds, Linda C Enns, Chris Burtner, Jessica E Johnson, Anthony R Odden, Luca Comai, Steven Henikoff (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*, Volume 164. 731 - 740.
6. Ganesh B. Kulkarni (2011). Effect of mutagen on pollen fertility and other parameters in horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdec). *Bios. Discov*. 146 - 150.
7. Huỳnh Kỳ, Nguyễn Lộc Hiền, Văn Quốc Giang, Nguyễn Văn Mạnh, Chung Trương Quốc Khang, Trần In Đô, Nguyễn Châu Thanh Tùng (2021). Nghiên cứu đa dạng di truyền của các dòng/giống đậu nành bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt*



Nam, số 05. 126.

8. Lê Thị Thu Hằng (2015). *Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống in vitro và trồng cây hoa chuông (Sinningia speciosa) tại tỉnh Thừa Thiên Huế*. Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Huế, thành phố Thừa Thiên Huế.

9. Lê Y Phụng, Huỳnh Kỳ, Trần Văn Hậu, Nguyễn Lộc Hiền, Văn Quốc Giang (2018). Khảo sát đặc điểm hình thái và đặc tính di truyền bằng dấu chỉ thị phân tử ISSR của các giống thanh trà ((*Bouea oppositifolia* (Roxb.) MEISNE.) tại thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, tập 54, Số 1B. 50 - 60.

10. Mohammad Amin Bagheri, Seyed Kamal Kazemitabar, Reza Esmacilzadeh Kenari (2016). Effect of EMS on germination and survival of okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Bih. Bio.* 33 - 36.

11. Toshio Murashige, Folke Skoog (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*, *Physiologia Plantarum.* 473 - 497.

12. Nguyễn Quang Thạch, Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Xuân Trường, Nguyễn Công Hoan, Nguyễn Thị Lý Anh (2004). Nghiên cứu nhân nhanh cây hoa chuông (*Sinningia speciosa*). *Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp.* 1 - 6.

13. Nur Fatimah Mohd-Yusoff, Pradeep Ruperao,

Nurain Emylia Tomoyoshi, David Edwards, Peter M. Gresshoff, Bandana Biswas, Jacqueline Batley (2015). Scanning the Effects of Ethyl Methanesulfonate on the Whole Genome of *Lotus japonicus* Using Second-Generation Sequencing Analysis. *G3 (Bethesda).* 559 - 567.

14. Per Sikora, Aakash Chawade, Mikael Larsson, Johanna Olsson, Olof Olsson (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *Inter. J. Plant Genom.* 1 - 13.

15. Scott O. Rogers, Arnold J. Bendich (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual.* 1 - 10.

16. Alireza Shahsavari, Keramat Izadpanah, E. Tafazoli, Badraddin Ebrahim Sayed-Tabatabaei (2007). Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae.* 310 - 314.

17. Trần Thị Hương Giang, Nguyễn Thị Thúy Hương, Nguyễn Thị Thu Hiền, Trần Hồ Quang, Nguyễn Đức Thuận, Phạm Bích Ngọc (2020). Đánh giá đa dạng di truyền trong các quần thể ba kích tím (*Morinda officinalis* F. C. How.) tại Quảng Nam và Quảng Ninh bằng chỉ thị phân tử ISSR *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.* 23 - 30.

## **EFFECTS OF ETHYL METHANE SULFONATE ON THE VARIATION OF GLOXINIA (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern) UNDER *IN VITRO* CONDITIONS**

**Nguyen Thi Pha<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hoang Nhi<sup>1</sup>,  
Mai Thanh Thao<sup>1</sup>, Tran Duy Khang<sup>1</sup>, Phan Thi Thu Hien<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Can Tho University

<sup>2</sup>Hanoi Pedagogical University2

### **SUMMARY**

*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern, the family Gesneriaceae is one of the strange flowers. There are attractive flowers for their colorful, shape as well as durability of flowers. The study of stem segments *in vitro* gloxinia (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern) treated with EMS (Ethyl Methane Sulfonate) at different concentrations (0%, 0.4%, 0.8%, 1.2% and 1.6%) for 1 hour and 1.5 hours. The survey results showed that the treatment had a different phenotype compared to the control sample, which was the EMS treatment samples with concentrations (0.4%, 0.8%) for 1 hour and 1.5 hours. The Inter simple sequence repeat (ISSR) technique was used to investigate the genetic differences of 8 *Sinningia speciosa* regenerated from EMS treatments at different concentrations compared to the control samples. Using 8 ISSR primers (Inter simple sequence repeat), 250 bands of size 242-2276 bp were generated. One primer generated an average of 31.25 bands. The number of monomorphic bands per sample was 14.5 bands/primer (46.4%), with polymorphism bands accounting for the remaining 16.75 bands/primer (53.6%). The average PIC value obtained was 0.24. The ISSR-based cluster analysis reveals that the genetic diversity of gloxinia samples stems from segments with the lowest ratio of 44.44% in the EMS treatment samples with concentrations of 0.8% for 1 hour.

**Keywords:** Ethyl Methane Sulfonate (EMS), ISSR, *Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern, variation.

**Ngày nhận bài** : 15/8/2022

**Ngày phản biện** : 15/9/2022

**Ngày quyết định đăng** : 27/9/2022