

ẢNH HƯỞNG CỦA ETHYL METHANESULFONATE VÀ TIA CỰC TÍM ĐẾN SỰ HÌNH THÀNH BIẾN DỊ SOMA *IN VITRO* CỦA CÂY HOA CÚC

Nguyễn Thị Mỹ Diên¹, Lê Công Hùng¹, Hoàng Thị Thuý¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu ảnh hưởng của xử lý Ethyl methanesulfonate (EMS) và tia cực tím (UV) đến khả năng tạo dòng biến dị *in vitro*, đồng thời đánh giá sinh trưởng, phát triển và biến dị của các dòng biến dị này trên loài cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) nhằm tạo nguồn nguyên liệu phong phú cho công tác chọn tạo giống hoa cúc mới. Trong nghiên cứu này, các chồi cúc *in vitro* được cắt bỏ lá, được cắt thành các mẫu có kích thước 1,0 - 1,5 (cm) mang một mắt ngủ đem ngâm vào môi trường xử lý MS lỏng có bổ sung 0,1mg/IBA và EMS và trùng với các nồng độ khác nhau (từ 0,1% đến 0,3%) và xử lý bằng tia UV có cường độ 125 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ứng với bước sóng 253nm và trong 8 giờ. Kết quả cho thấy, trong điều kiện *in vitro* thu được tỷ lệ chồi biến dị hình thái cao nhất ở công thức 2 (EMS 0,1% + UV), tỷ lệ biến dị đạt 20% chiều cao cây, số lá và khả năng ra rễ của các dòng cúc giảm dần khi tăng nồng độ xử lý EMS. Sự sinh trưởng, phát triển của các dòng cúc ở vườn trồng cũng có sự khác nhau, chiều cao cây của các dòng đối chứng tốt hơn, trong khi đó chiều cao cây của dòng M2 là thấp nhất. Một số dạng biến dị có lợi về hình thái thân lá và hình thái hoa đã được quan sát thấy ở dòng M2 (EMS 0,10% + UV), dòng M6 (EMS 0,30% + UV). Các biến dị này có tiềm năng cho công tác chọn tạo giống hoa cúc mới.

Từ khóa: Ảnh hưởng, cúc vàng, biến dị, Ethyl methanesulfonate (EMS), tia UV

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa cúc là một loại hoa đẹp với nhiều màu sắc khác nhau. Đối với các nước trên thế giới cũng như Việt Nam thì hoa cúc luôn là loại hoa phù hợp với phân đông thị hiếu của người dân. Hiện trên thế giới có 1500 giống hoa cúc nhưng tại Việt Nam không phải giống nào cũng phát triển mạnh và có hoa đẹp cho người chơi hoa. Bởi vậy, các nhà khoa học đã và đang nghiên cứu các phương pháp chọn, tạo nhân giống hoa cúc nhằm tạo đa dạng các giống hoa, phục vụ nhu cầu thẩm mỹ ngày càng cao của thị trường, cũng như tăng lựa chọn, thu nhập cho người trồng hoa.

Kỹ thuật xử lý đột biến *in vitro* đã gây tạo và làm tăng tần số xuất hiện đột biến với các tình trạng có giá trị kinh tế ở các loài thực vật nói chung và cây hoa nói riêng, góp phần không nhỏ cho việc cải tiến giống cây trồng. Ở Việt Nam và trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu riêng rẽ dùng hóa chất EMS và các tia phóng xạ như tia X, tia Gamma, tia UV-C... để gây đột biến nhân tạo đã được công bố (Đào Thanh Bằng và *ctv.*, 2006). Ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về ứng dụng tạo đột biến như ảnh hưởng của xử lý Ethyl methane sulfonate *in vitro* đối với cây cẩm chướng (Nguyễn Thị Lý Anh và *ctv.*, 2009), ảnh hưởng của xử lý đột biến *in vitro* bằng Ethyl methane sulfonate kết hợp chiếu xạ tia gamma đến sự biến dị ở cây hoa cẩm chướng (Vũ Hoàng Hiệp và Nguyễn Thị Lý Anh, 2013), ảnh hưởng của loại mẫu cây và hệ thống chiếu sáng đơn sắc lên khả năng tái sinh chồi cây hoa cúc (Nguyễn Ba Nam và *ctv.*, 2012). Trên thế giới,

các công trình nghiên cứu sử dụng UV để tạo dòng biến dị còn ít như tạo biến dị số ma từ mô sẹo khoai tây gây ra bởi bức xạ UV-C (Ehsanpour, 2007), đánh giá đa dạng di truyền của bốn giống hoa cúc nhỏ sử dụng RAPD (Chattejee *et al.*, 2005), ảnh hưởng của bức xạ cực tím đến sự biến động số ma ở cây khoai tây (Iuliana and Cerasela, 2014), ảnh hưởng của tia X và gamma đối với quá trình tạo chồi trong chậu của hoa cẩm chướng (Jerzy and Zaleski, 2000)... nhưng việc sử dụng kết hợp cả hai tác nhân là tia UV và hóa chất EMS làm gia tăng hiệu quả gây đột biến thì chưa được đề cập.

Trong khuôn khổ bài báo này, nhóm nghiên cứu lựa chọn hai tác nhân gây đột biến là hóa chất Ethyl methanesulfonate (EMS) và tia cực tím (UV) thực hiện trên đối tượng nghiên cứu là giống cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum*) để gia tăng tần suất xuất hiện biến dị nhằm tạo nguồn nguyên liệu phong phú cho công tác chọn tạo giống hoa cúc mới.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) *in vitro* 30 ngày tuổi do Trung tâm Công nghệ sinh học, trường Đại học Nông - Lâm Bắc Giang cung cấp.

- Hóa chất đa lượng, vi lượng trong nuôi cấy mô (Xilong, Trung Quốc), đường sacharose (Biên Hòa, Việt nam), agar (Công ty Hải Long, Việt Nam), BA (Benzyl adenin purin), NAA (Merk, Đức) được sử dụng trong môi trường Murashige và Skoog (1962). Phân bón đầu trâu (NPK - 14 : 14 : 14) (Bình Điền, Việt Nam).

¹ Trường Đại học Nông - Lâm Bắc Giang

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo dòng *in vitro* ở cây cúc vàng bằng EMS và UV

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Mẫu ban đầu là đốt thân cây cúc vàng *in vitro* (30 ngày tuổi) kích thước 1 - 1,5 cm được đảo đều trong dung dịch EMS với 7 nồng độ riêng rẽ (tương ứng với 7 công thức thí nghiệm được ký hiệu từ CT 1 - CT 7): 0,0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 và 0,3 (%). Sau đó, mẫu được thấm khô và cấy lên môi trường tái sinh và nhân nhanh (môi trường MS cơ bản + 30 g/l đường saccharose + 100 ml/l nước dừa + 100 mg/l myo inositol + 0,1 mg/l BA, pH = 5,8) (Murashige and Skoog, 1962). Chiếu tia UV cường độ 125 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (~bước sóng 253 nm) liên tục trong 8 giờ. Theo dõi các chỉ tiêu: tỷ lệ sống (%), tỷ lệ bật chồi (%), tỷ lệ biến dị (%), chiều cao chồi (cm), số lá (lá/chồi), hệ số nhân nhanh sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.2. Đánh giá sinh trưởng, phát triển của một số dòng cây hoa cúc vàng

Các chồi cúc thu được ở thí nghiệm 1 cho ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh (môi trường MS cơ bản + 30 g/l đường saccharose + NAA 0,1 mg/l, pH = 5,8), cây *in vitro* được huấn luyện ngoài vườn ươm và chăm sóc theo hướng dẫn kỹ thuật (Viện Nghiên cứu Rau Quả, 2017). Theo dõi các chỉ tiêu tỷ lệ sống (%), tỷ lệ biến dị (%), số nhánh/cây (sau 3 tháng), chiều cao cây tối đa (sau 3 tháng), số lá/cây (sau 3 tháng), thời gian ra hoa (ngày), tỷ lệ hoa biến dị (%), đường kính hoa (cm), độ bền hoa cắt (ngày).

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và IRRISTAT 4.0

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5 năm 2018 đến tháng 5 năm 2019. Các thí nghiệm thực hiện trong phòng thí nghiệm, ruộng thí nghiệm tại Trường Đại học Nông - Lâm Bắc Giang.

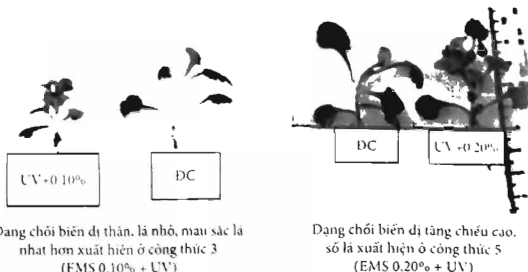
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo dòng *in vitro* ở cây cúc vàng bằng EMS và UV

Kết quả được thể hiện ở bảng 1 cho thấy khi tăng nồng độ EMS xử lý thì tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu bật chồi cúc giảm dần. Ở công thức xử lý bằng (EMS 0,30% + UV) có tỷ lệ mẫu sống và bật chồi thấp nhất, chỉ đạt tương ứng 66,67 và 63,33 (%). Bên cạnh đó, tỷ lệ xuất hiện các chồi cúc biến đổi hình thái lại tăng dần khi tăng nồng độ xử lý EMS, ngoại trừ công thức xử lý bằng (EMS 0,10% + UV) có tỷ lệ biến dị cao nhất đạt 20% và công thức xử lý bằng (EMS 0,20% + UV) có tỷ lệ chồi biến dị là 10%; ở 2 công thức này xuất hiện nhiều lá nhỏ (Hình 1). Tỷ lệ biến dị cao là cần thiết để tạo nguyên liệu cho chọn lọc dòng *in vitro*. Về chỉ tiêu chiều cao trung bình chồi, số lá/chồi và hệ số nhân nhanh ở các công thức xử lý bằng EMS và UV đều thấp hơn so với công thức đối chứng.

Bảng 1. Một số chỉ tiêu tái sinh chồi biến dị từ chồi cây hoa cúc *in vitro* sau xử lý EMS kết hợp tia UV (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Tỷ lệ biến dị (%)	4 tuần sau cấy chuyển		
				Chiều cao (cm)	Số lá (lá)	Hệ số nhân nhanh
CT1 (ĐC)	100,00	100,00	0,00	4,76	5,70	1,36
CT2 (EMS 0,05% + UV)	90,00	86,67	3,33	3,40	5,40	1,23
CT3 (EMS 0,10% + UV)	83,33	80,00	20,00	2,93	5,03	1,26
CT4 (EMS 0,15% + UV)	80,00	76,67	6,67	3,60	5,26	1,16
CT5 (EMS 0,20% + UV)	76,67	70,00	10,00	3,60	5,60	1,23
CT6 (EMS 0,25% + UV)	73,33	66,67	13,33	3,76	5,33	1,30
CT7 (EMS 0,30% + UV)	66,67	63,33	16,67	3,13	5,20	1,13
CV (%)				3,20	2,30	5,30
LSD _{05%}				0,20	0,21	0,11



Hình 1. Biến dị hình thái thu được sau xử lý chồi cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) *in vitro* EMS kết hợp tia UV

3.2. Đánh giá sinh trưởng, phát triển của một số dòng cây hoa cúc vàng

Kết quả theo dõi tỷ lệ sống, các dạng biến dị hình thái, động thái tăng trưởng chiều cao, số lá, số nhánh/cây sau 3 tháng sinh trưởng được thể hiện qua bảng 2 và bảng 3.

Kết quả được thể hiện ở bảng 2 cho thấy, sau khi đã qua giai đoạn thích ứng vườn ươm, bộ rễ cây được ổn định, khi đưa ra vườn trồng, cây có thể hút nước và dinh dưỡng thuận lợi hơn. Vì vậy, ngoại tỷ lệ sống cao, các dòng cúc đã thể hiện sự tăng trưởng chiều cao, số lá, số nhánh qua các lần theo dõi, cụ thể chiều cao cây tối đa đạt từ 50,12 cm ở dòng

M2 (EMS 0,10% + UV) đến 63,20 cm ở dòng M0 (ĐC), số lá tối đa đạt từ 19,75 ở dòng M2 (EMS 0,10% + UV) đến 22,84 ở dòng M0 (ĐC), số nhánh tối đa đạt từ 2,42 ở dòng M5 (EMS 0,25% + UV) đến 3,56 ở dòng M0 (ĐC).

Tương tự, giai đoạn tạo dòng *in vitro*, tỷ lệ xuất hiện các dạng biến dị ở dòng đối chứng M0 là thấp nhất (0,0%), tỷ lệ này tăng dần tỷ lệ thuận với nồng độ xử lý EMS, ngoại trừ dòng M2 (EMS 0,10% + UV), tỷ lệ biến dị là 18,5%. Kết quả này cho thấy dòng M2 (EMS 0,10% + UV) cho hiệu quả gây biến dị hình thái cao nhất. Tỷ lệ biến dị cao là cần thiết để tạo nguyên liệu cho chọn tạo giống cúc mới.

Bảng 2. Đặc điểm sinh trưởng, phát triển và sự biến dị của một số dòng cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) sau xử lý kết hợp EMS và tia cực tím (UV) *in vitro* trong điều kiện vườn trồng

Công thức	Dòng cúc	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ biến dị (%)	Số nhánh cuối cùng (tháng thứ 3)	Chiều cao cuối cùng (tháng thứ 3)	Số lá cuối cùng (tháng thứ 3)
EMS 0,0% + UV	M0	100,0	0,0	3,56	63,20	22,84
EMS 0,05% + UV	M1	92,5	7,4	3,48	61,84	21,56
EMS 0,10% + UV	M2	85,1	18,5	3,02	50,12	19,75
EMS 0,15% + UV	M3	90,7	9,2	3,50	61,00	21,22
EMS 0,20% + UV	M4	83,3	11,1	3,52	62,41	21,90
EMS 0,25% + UV	M5	81,4	12,9	2,42	60,84	20,73
EMS 0,30% + UV	M6	79,6	16,7	3,25	60,00	20,26
LSD _{0,05}				0,27	0,43	0,10
C.V. (%)				6,50	7,60	4,10

Kết quả được thể hiện ở bảng 3 cho thấy sau trồng khoảng 80 ngày, ở các dòng được xử lý bằng EMS + UV đều ra hoa sớm so với dòng đối chứng M0, cụ thể thời gian ra hoa ở các dòng được xử lý

dao động từ 70 đến 85 ngày sau trồng, ở dòng đối chứng M0 thời gian ra hoa là 90 ngày sau trồng. Đường kính hoa trung bình dao động từ 4,3 cm ở công thức M2 (EMS 0,10% + UV) đến 6,3 cm ở công

thực M0 (ĐC). Độ bền hoa cắt dao động từ 10 ngày ở dòng M2 (EMS 0,10% + UV) đến 11,8 ngày ở dòng M0 (ĐC). Ngoài ra, trong quá trình theo dõi chúng tôi có phát hiện một số biến dị đáng quan tâm: Hoa

có kích thước nhũ lợt và hoa tiêu biến nhị ở dòng M2 (EMS 0,10% + UV), cấu trúc hoa thay đổi ở dòng M6 (EMS 0,30% + UV)

Bảng 3. Đặc điểm ra hoa của một số dòng cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) sau xử lý EMS kết hợp tia cực tím (UV) *in vitro* trong điều kiện vườn trồng

Công thức	Dòng cúc	Thời gian ra hoa (ngày sau trồng)	Tỷ lệ hoa biến dị (%)	Đường kính hoa (cm)	Độ bền hoa cắt (ngày sau cắt)
EMS 0,0% + UV	M0	90	0,0	6,2	11,8
EMS 0,05% + UV	M1	85	3,7	6,0	11,2
EMS 0,10% + UV	M2	70	14,8	5,3	10,0
EMS 0,15% + UV	M3	86	7,4	5,88	11,0
EMS 0,20% + UV	M4	85	9,2	5,88	11,0
EMS 0,25% + UV	M5	84	14,8	5,69	10,8
EMS 0,30% + UV	M6	83	18,5	5,69	11,0



Hoa bình thường ở dòng M0



Dạng hoa tiêu biến nhị ở dòng M2 (EMS 0,1% + UV)



Hoa có kích thước nhũ lợt ở dòng M2 (EMS 0,1% + UV)



Hoa có cấu trúc thay đổi ở dòng M6 (EMS 0,3% + UV)



Biến dị hình thái lá ở dòng M6 (EMS 0,3% + UV)



Biến dị hình thái lá ở dòng M6 (EMS 0,3% + UV)

Hình 3. Một số dạng biến dị hình thái thân lá, hoa thu được của các dòng cúc vàng sau xử lý EMS và UV *in vitro*

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Xử lý kết hợp EMS và tia UV có khả năng tạo biến dị *in vitro* từ chồi của cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*), công thức xử lý EMS + UV 0,10% có tỷ lệ

biến dị hình thái cao nhất (20,0%). Chồi *in vitro* tái sinh có đặc điểm chậm ra rễ, giảm chiều cao, giảm số lá/chồi, giảm số rễ/chồi, giảm chiều dài rễ so với các chỉ tiêu này ở dòng cúc đối chứng.

Sự sai khác về sinh trưởng, phát triển của các dòng cúc được tiếp tục thể hiện ở vườn trồng: Dòng cúc M0 (ĐC) có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh nhất, dòng M2 (EMS 0,1% + UV) có chiều cao trung bình thấp nhất.

Khi phân lập biến dị về hình thái thân, lá và hoa ở giai đoạn vườn trồng cho thấy: Các dạng biến dị có tiềm năng cho công tác chọn tạo giống cúc mới chủ yếu xuất hiện ở dòng M2 (EMS 0,10% + UV), dòng M6 (EMS 0,30% + UV), dạng hoa tiêu biến nhị, và hoa có cấu trúc nhị lớn, chiều cao cây thấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Ivy Anh, Lê Hải Hà và Vũ Hoàng Hiệp. 2009. Ảnh hưởng của xử lý Ethyl methane sulphonate *in vitro* đối với cây cúc chướng. *Tạp chí Khoa học và phát triển*, 7 (2): 130-136.

Đào Thanh Bằng, Nguyễn Hữu Đông và Trần Duy Quy. 2006. Thành tựu và triển vọng của việc ứng dụng kỹ thuật gây tạo đột biến trong công tác chọn giống cây trồng. Viện Di truyền Nông nghiệp - 20 năm (1984 - 2004) xây dựng và phát triển. NXB Nông nghiệp Hà Nội, tr. 17-32

Vũ Hoàng Hiệp và Nguyễn Thị Ivy Anh. 2013. Ảnh hưởng của xử lý đột biến *in vitro* bằng Ethyl methane sulfonate kết hợp chiếu xạ tia gamma đến sự biến dị ở cây hoa cúc chướng. Trong *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 9/2013*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, tr. 817-821.

Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Đình Lâm, Dương Văn Nhứt. 2012. Ảnh hưởng của loại mẫu cây và hệ thống chiếu sáng đơn sắc lên khả năng tái sinh chồi của cúc (Chrysanthemum morifolium Ramat ex. Link) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50 (6): 595-606.

Viện Nghiên cứu Rau quả. 2017. Quy trình kỹ thuật trồng và chăm sóc hoa cúc (*chrysanthemum sp*). Địa chỉ: <http://ceford.vn/quy-trinh-cong-nghe-quy-trinh-ky-thuat-trong-va-cham-soc-hoa-cuc-chrysanthemum-sp>.

Chatterjee. A.K.A., Madal. S.A., Ranade. S.K., Datta. 2005. Estimation of genetic diversity of four Chrysanthemum mim cultivars using RAPD. *Pakistan Journal of Biotechnology Sciences*, 8 (4): 546-549.

Ehsanpour. 2007. Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD-PCR. *Gen. Appl. Plant Physiology*: 33 (1-2): 3-11.

Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-479.

Iuliana C., Cerasela P., 2014. The effect of the ultraviolet radiation on the somaclonal variability for Solanum tuberosum. *Rom Biotechnol Lett*, 19 (3): 9339-9344

Jerzy, M., Zalewska, M., 2000. Effect of X and Gamma rays on *in vitro* adventitious bud production of pot carnation, *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 6 (1): 49-52.

Effects of ethyl methanesulfonate and ultraviolet radiation on formation of *in vitro* somaclonal variation of *chrysanthemum indicum*

Nguyen Thi My Dien, Le Cong Hung, Hoang Thi Thu

Abstract

This paper presents the study on the effect of ethyl methanesulfonate (EMS) and ultraviolet (UV) radiation treatment on the *in vitro* variation and also assesses the growth, development and variation of these lines of *Chrysanthemum indicum* to produce an abundant material sources for selection of new cultivars. In this experiment, the segments without leaves from the *in vitro* shoots were used as explants of 1-1.5 cm in length and contained a bud. These explants were immersed in liquid MS supplemented with 0.1 mg/1B₆ and sterilized EMS with different concentrations from 0.1% to 0.3% and then treated by UV with intensity of 125 μW/cm² corresponding to 253 nm wavelength in 3 hours. The results showed the treatment 2 (EMS 0.10% + UV) had the highest proportion of variant buds, the rate of variation reached 20% in *in vitro* conditions. The shoot height, the number of leaves and the rooting ability of the *Chrysanthemum indicum* lines decreased correspondingly with the increasing concentration of EMS. The growth and development of these *Chrysanthemum indicum* lines in nurseries were also different, the height of plant in M0 lines (the control) was better than that in the others treatments while the height plant of M2 line was lowest. Several morphological variant traits of leaf and flower were observed in M2 line (EMS 0.10% + UV) and M6 line (EMS 0.30% + UV). These variant materials are potential for selection and breeding of new *Chrysanthemum* cultivars.

Keywords: effect, *Chrysanthemum indicum*, variation, Ethyl methanesulfonate (EMS), ultraviolet (UV)

Ngày nhận bài: 15/11/2019
 Ngày phản biện: 12/12/2019

Người phản biện: TS. La Việt Hồng
 Ngày duyệt đăng: 13/01/2020