

ẢNH HƯỞNG CỦA XỬ LÝ ETHYLMETHANE SULPHONATE *IN VITRO* ĐỐI VỚI CÂY CẨM CHƯỚNG

**Effect of Ethylmethane Sulphonate on *In vitro* Mutagenic Treatment of Carnation
(*Dianthus caryophyllus* L.)**

Nguyễn Thị Lý Anh¹, Lê Hải Hà¹, Vũ Hoàng Hiệp²

¹ Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

² Trường Cao đẳng Công đồng Hải Phòng

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm bước đầu làm rõ tác động gây đột biến của xử lý ethylmethane sulphonate (EMS) *in vitro* cho cây cẩm chướng. Trong thí nghiệm, các đoạn thân mang mắt ngủ của cây *in vitro* được ngâm trong dung dịch EMS với nồng độ khác nhau (từ 0 - 1,0%) với thời gian 1 - 3 giờ sau đó được đặt trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường tạo chồi MS + 1ppm Kinetine và sau đó được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường tạo rễ MS + 0,5 ppm α -NAA. Kết quả cho thấy, nồng độ EMS càng cao, thời gian xử lý mẫu càng dài thì tỷ lệ mẫu sống và phát sinh chồi càng giảm. Xử lý EMS đã làm tăng tỷ lệ biến dị cho cây cẩm chướng nuôi cấy *in vitro* từ 5,1 đến 22,7 lần so với đối chứng. Nồng độ và thời gian xử lý thích hợp là 0,4% EMS trong thời gian 2 giờ. Sau xử lý, thu được năm dạng chồi biến dị (A, B, C, D, E). Mức độ tăng trưởng chiều cao, số lá và khả năng ra rễ của các dạng chồi giảm dần theo thứ tự: A > B > D > E > C. Trên cơ sở số liệu thực nghiệm đã xây dựng được mô hình toán học biểu diễn mối quan hệ giữa khả năng sống của mẫu cấy, tỷ lệ biến dị của chồi với nồng độ EMS và thời gian xử lý mẫu. Các kết quả trên tạo cơ sở cho việc ứng dụng công nghệ xử lý đột biến *in vitro* trong tạo giống hoa cẩm chướng mới ở Việt Nam.

Từ khoá: Cẩm chướng, chồi biến dị, mẫu cấy sống sót, xử lý EMS *in vitro*.

SUMMARY

This research aims at identifying mutagenic effect of ethylmethane sulphonate (EMS) on *in vitro* treatment of carnation. The stem segments bearing node of *in vitro* plantlets were soaked in EMS solution at different concentrations (from 0 to 1.0%) for 1 to 3 hours. After soaking, the explants were cultured on MS medium + 1 ppm kinetin for shooting and then transferred to MS medium + 0.5 ppm α -NAA for rooting. The results showed that the survival and regeneration rate of explants decrease with increasing EMS concentration and soaking time. EMS *in vitro* treatment resulted in increasing variants of *in vitro* shoots by 5.1 - 22.7 times in comparison with the control. The optimal EMS concentration and treatment duration is 0.4% and two hours, respectively. Five types of shoot variants appeared (A, B, C, D, E) and the growth rate, number of leaves and rooting ability decreased in following order: A > B > D > E > C. Based on the experimental data obtained, a formula expressing the dependence of the survival of the explants and the variant rate of the shoot on the EMS concentration and treatment duration was established, which can serve as basis for subsequent study on commutation treatment in carnation.

Key words: Carnation, EMS *in vitro* treatment, explants survival, shoot variant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa cảm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) là một trong bốn loại hoa cắt có giá trị thương mại hàng đầu trên thị trường hoa thế giới và Việt Nam (Office of the Gene Technology Regulator, 2005). Ở nước ta hiện nay, việc phát triển cây hoa có giá trị này không chỉ là việc nhân nhanh các giống nhập nội hay tìm ra những biện pháp kỹ thuật nhằm nâng cao năng suất chất lượng hoa, mà còn phải tạo ra được những giống hoa cảm chướng mới đáp ứng được nhu cầu thị trường, phù hợp với điều kiện sinh thái và có bản quyền của Việt Nam.

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* đã trở thành công cụ hữu hiệu trong chọn tạo giống cây trồng. Kỹ thuật này đã gây tạo và làm tăng tần số xuất hiện đột biến với các tính trạng có giá trị kinh tế ở các loài thực vật nói chung và cây hoa nói riêng. Bên cạnh việc sử dụng tia gamma là tác nhân gây đột biến, trên thế giới đã có nhiều công bố về EMS để gây tạo đột biến trên các cây trồng như: ngô, khoai lang, cà chua, hoa cúc (Đào Thanh Bằng và cộng sự, 1997; Arani, Majidi, 2004; Tulmann Neto et al., 2004; Luan, Yu-Shi et al., 2007; Shin Watanabe et al., 2007). Nhưng việc sử dụng EMS làm tác nhân gây đột biến *in vitro* trên cây cảm chướng còn chưa được đề cập.

Nghiên cứu này nhằm bước đầu làm rõ tác động gây đột biến của xử lý EMS *in vitro* cho cây cảm chướng tạo cơ sở cho việc ứng dụng công nghệ xử lý đột biến *in vitro* trong tạo giống hoa cảm chướng mới ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đoạn thân mang mắt ngủ của chồi *in vitro* cây hoa cảm chướng thơm (*Dianthus caryophyllus* L.) giống Quận chúa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật

Sử dụng phương pháp nuôi cấy *in vitro* trên môi trường cơ bản MS (Murahige & Skoog, 1962 với 6,2 g/l agar, 30 g/l saccarose và 100 mg/l inositol). Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh độ pH bằng 6,0 trước khi tiệt trùng và được khử trùng ở 121°C; 1,0 atm, trong thời gian 20 phút. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ 22 - 25°C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày. Các công thức thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành 3 lần nhắc lại, một lần nhắc lại bố trí 30 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu.

Các thí nghiệm đưa cây *in vitro* ra ngoài vườn ươm: Các cây đạt tiêu chuẩn (cây cao > 3,5 cm, có 4 - 5 rễ trở lên, rễ dài khoảng 2,5-3,0 cm) được trồng thủy canh với dung dịch dinh dưỡng Anthura theo phương pháp thủy canh tĩnh của Trung tâm nghiên cứu phát triển Rau châu Á. Mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc lại trồng 40 cây (hàng cách hàng và cây cách cây 5 cm).

2.2. Phương pháp xử lý đột biến *in vitro*

Các đoạn thân mang mắt ngủ của cây cảm chướng *in vitro* (khoảng 1,0 cm) được ngâm trong dung dịch EMS có nồng độ khác nhau (0 - 1,0%) và được lắc với tốc độ 100 vòng/phút, được xử lý ở 3 mức thời gian: 1h, 2h, và 3h giờ tùy từng thí nghiệm. Các mẫu sau khi xử lý được rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần và nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh chồi (MS + 1,5 ppm Kinetin). Sau 4 tuần nuôi cấy, các chồi *in vitro* được chuyển sang môi trường ra rễ (MS + 0,5 ppm -NAA). Mỗi công thức xử lý 100 mẫu *in vitro* cho một lần nhắc lại, tiến hành 3 lần nhắc lại/công thức.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Excel và Irristat 4.0S.

Sử dụng thuật toán nội suy Lagrange để xây dựng mô hình toán học (Nguyễn Đình Trí và cs., 2002).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của EMS tới sự phát sinh và sinh trưởng của cây cảm chứng *in vitro*

EMS là chất gây đột biến hoá học tác động trực tiếp vào hệ gen của tế bào qua phương

thức thẩm thấu qua bề mặt mô. Với 3 mức thời gian khác nhau, thí nghiệm đã cho thấy EMS có ảnh hưởng rất rõ đến khả năng sống và khả năng phát sinh chồi của các mẫu xử lý (Bảng 1).

Khi tăng nồng độ và thời gian xử lý EMS, tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu phát sinh chồi giảm dần. ở cả 3 mức thời gian xử lý khác nhau thì tỷ lệ phát sinh chồi đều đạt cao nhất tại nồng độ 0,4%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của EMS đến khả năng sống và sự phát sinh chồi *in vitro* (sau 4 tuần nuôi cấy)

Nồng độ EMS (%)	Xử lý 1 giờ		Xử lý 2 giờ		Xử lý 3 giờ	
	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (%)
0,0	100,00	100,00	98,83	98,58	97,78	97,67
0,2	91,11	91,66	88,89	88,26	83,33	82,68
0,4	86,67	93,93	82,22	91,11	78,89	84,15
0,6	81,97	88,90	70,00	86,50	62,44	82,19
0,8	48,89	80,40	45,55	77,38	39,97	74,66
1,0	32,22	73,83	26,67	71,86	18,99	69,74
CV%	4,00	1,20	1,90	1,50	1,30	0,80
LSD _{0,05}	4,26	1,93	1,30	2,30	1,51	1,15

Mô hình toán học biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ EMS và tỷ lệ mẫu chết với thời gian xử lý

TT	Thời gian xử lý	Mô hình toán học	R
1	1h	$Y = -62,16X + 1157,07X^2 - 4145,10X^3 + 5626,30X^4 - 2508,33X^5$	0,94
2	2h	$Y = 1,17 + 52,91X - 57,06X^2 + 563,85X^3 - 1107,81X^4 + 581,77X^5$	0,97
3	3h	$Y = 2,22 + 195,48X - 997,26X^2 + 2299,84X^3 - 2109,11X^4 + 689,48X^5$	0,98

Ghi chú: R-Hệ số tương quan; Y- Tỷ lệ mẫu chết; X- Nồng độ EMS

Từ kết quả thu được, bằng thuật toán nội suy Lagrange, một mô hình toán học được xây dựng biểu diễn mối quan hệ và hệ số tương quan giữa nồng độ, thời gian xử lý EMS với tỷ lệ mẫu chết. Hệ số tương quan $R \geq 0,9$ cho thấy, tỷ lệ mẫu chết và nồng độ EMS xử lý có mối tương quan thuận và rất chặt chẽ. Dựa vào mô hình toán học này, có thể dự báo được tỷ lệ mẫu chết với từng nồng độ EMS xử lý, từ đó xác định được khoảng nồng độ xử lý đem lại hiệu quả di truyền cao mà ít gây chết cho mẫu xử lý.

3.2. Ảnh hưởng của EMS đến sự phát sinh biến dị hình thái chồi *in vitro*

EMS không chỉ ảnh hưởng đến khả năng sống và tái sinh chồi của mẫu cấy mà còn có khả năng gây biến dị hình thái các chồi *in vitro*. Các chồi mọc từ các mẫu được xử lý EMS có các hình dạng khác nhau và không giống như các chồi mọc từ mẫu không xử lý EMS (đối chứng). Chúng tôi gọi đây là các chồi bị biến dị hình thái. Tỷ lệ xuất hiện các chồi biến dị hình thái ở các công thức thí nghiệm là khác nhau (Bảng 2). Số liệu thực nghiệm cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính của tỷ lệ các chồi biến dị hình thái vào nồng độ, thời gian xử lý EMS: nồng độ càng cao và thời gian xử lý càng dài thì tỷ lệ chồi biến dị càng lớn.

Bảng 2. Tỷ lệ (%) chồi biến dị hình thái khi xử lý EMS (sau 4 tuần nuôi cấy)

Nồng độ EMS (%)	Thời gian xử lý EMS (giờ)		
	1	2	3
0,0	2,24	4,19	5,87
0,2	13,20	18,51	29,93
0,4	15,60	28,25	33,33
0,6	34,75	38,53	46,01
0,8	45,72	49,53	56,33
1,0	52,50	57,88	64,49
CV%	3,40	6,70	4,30
LSD _{0,05}	1,75	3,91	3,04

Mô hình toán học biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ EMS và tỷ lệ biến dị của chồi với thời gian xử lý

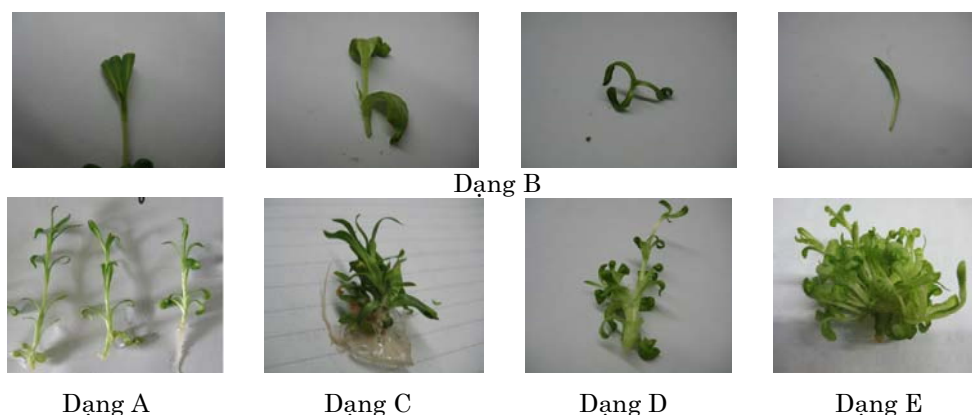
TT	Thời gian xử lý	Mô hình toán học	R
1	1h	$Y = 2,24 + 266,34X - 1823,63X^2 + 4983,33X^3 - 5431,25X^4 + 2061,46X^5$	0,985
2	2h	$Y = 4,19 + 99,15X - 192,33X^2 + 311,72X^3 - 201,04X^4 + 36,20X^5$	0,997
3	3h	$Y = 5,87 + 327,25X - 1665,40X^2 + 3870,73X^3 - 3865,10X^4 + 1391,15X^5$	0,980

Ghi chú: R- Hệ số tương quan ; Y- Tỷ lệ chồi biến dị ; X- Nồng độ EMS xử lý

Từ số liệu thực nghiệm, mô hình toán học về hệ số tương quan biểu diễn mối quan hệ giữa tỷ lệ biến dị của chồi với nồng độ EMS và thời gian xử lý EMS đã được xây dựng. Hệ số tương quan $R \geq 0,9$ cho thấy giữa tỷ lệ biến dị của chồi và nồng độ EMS và thời gian xử lý EMS có mối tương quan thuận rất chặt chẽ. Trên cơ sở mô hình toán học này có thể dự đoán được khoảng nồng độ và thời gian xử lý EMS hợp lý để tạo chồi biến dị.

Để làm rõ hơn nữa mức độ tác động của EMS, các dạng chồi mọc từ các mẫu được xử lý EMS được phân lập thành các dạng sau:

- Dạng A: Chồi phát triển bình thường.
- Dạng B: Chồi có biến đổi về hình thái lá như lá hình quạt, đốt thân mang 1 lá, lá dính vào nhau tạo hình loa, đốt thân mang 3 lá, các lá bao chặt thân tạo chồi có dạng vòi.
- Dạng C: Chồi thấp, các đốt thân rất ngắn các lá xếp xít lại với nhau, các lá dày, cứng màu xanh đậm.
- Dạng D: Chồi đa thân, thân được tạo bởi nhiều thân ghép lại với nhau
- Dạng E: Chồi có khả năng sinh sản mạnh, các chồi này có khả năng đẻ chồi rất mạnh, tạo thành cụm chồi.



Hình 1. Các dạng chồi thu được sau xử lý EMS

Bảng 3. Ảnh hưởng của EMS đến tỷ lệ (%) các dạng chồi *in vitro* với thời gian xử lý 1 h (sau 4 tuần nuôi cấy)

Nồng độ EMS (%)	Dạng A	Dạng B	Dạng C	Dạng D	Dạng E
0,0	97,76	2,24	0,00	0,00	0,00
0,2	86,75	8,10	2,16	3,00	0,00
0,4	74,40	17,32	2,54	4,19	1,55
0,6	64,91	22,32	4,78	4,28	3,70
0,8	54,62	33,25	6,12	3,82	2,19
1,0	47,50	34,72	15,45	2,33	0,00
CV%	1,40	5,70	8,80	8,40	5,20
LSD _{0,05}	1,75	2,00	0,81	0,11	0,11

Bảng 4. Ảnh hưởng của EMS đến tỷ lệ (%) các dạng chồi *in vitro* với thời gian xử lý 2 h (sau 4 tuần nuôi cấy)

Nồng độ EMS (%)	Dạng A	Dạng B	Dạng C	Dạng D	Dạng E
0,0	95,81	4,19	0,00	0,00	0,00
0,2	81,82	10,08	3,13	3,29	1,69
0,4	70,24	17,55	3,75	4,64	3,81
0,6	61,36	27,11	5,42	3,69	2,41
0,8	51,15	32,51	10,63	3,47	2,25
1,0	42,12	36,42	21,46	0,00	0,00
CV%	2,80	8,10	7,40	6,80	6,10
LSD _{0,05}	3,35	3,07	0,97	0,30	0,19

Bảng 5. Ảnh hưởng của EMS đến tỷ lệ (%) các dạng chồi *in vitro* với thời gian xử lý 3 h (sau 4 tuần nuôi cấy)

Nồng độ EMS (%)	Dạng A	Dạng B	Dạng C	Dạng D	Dạng E
0,0	94,13	5,87	0,00	0,00	0,00
0,2	69,71	19,71	4,69	3,50	2,39
0,4	66,33	21,73	5,39	4,36	2,20
0,6	53,59	31,46	9,31	3,57	2,08
0,8	44,71	38,06	14,33	2,90	0,00
1,0	34,76	35,44	29,80	0,00	0,00
CV%	2,30	4,60	5,00	9,30	4,70
LSD _{0,05}	2,49	2,06	0,95	0,39	0,09

Bảng 3, 4, 5 cho thấy, sự phân bố của các dạng chồi ở các công thức thí nghiệm không giống nhau. Ở đối chứng không chỉ có chồi dạng A mà còn xuất hiện dạng B (2,24 - 5,87%). Điều này cho thấy, sự tồn tại biến dị soma trong nuôi cấy *in vitro* cây cảm chướng dù ở tỷ lệ rất thấp. Khi xử lý ở nồng độ 0,2% xuất hiện 4 dạng chồi: A, B, C và D. Khi tăng nồng độ EMS lên 0,4; 0,6; 0,8% thì kết quả cho cả 5 dạng chồi A, B, C, D, E. Ở nồng độ xử lý 1,0%, tỷ lệ chồi biến dị cao, tuy nhiên số dạng chồi xuất hiện lại giảm chỉ có

4 dạng: A, B, C và D. Trong đó, chồi biến dị tăng chủ yếu ở dạng C là dạng có khả năng sống rất thấp khi đưa ra ngoài vườn ươm.

Như vậy, khi xử lý EMS ở nồng độ cao trong thời gian dài không những không tăng được dạng biến dị mà còn làm chúng giảm đi. Vì vậy, nồng độ thích hợp cho xử lý EMS là 0,4% trong thời gian ngâm mẫu 2 h. Ở nồng độ và thời gian xử lý này có tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu phát sinh chồi cao, số chồi lượng chồi và dạng chồi biến dị thu được nhiều.

Bảng 6. Sự sinh trưởng và khả năng ra rễ của các dạng chồi *in vitro*

Dạng chồi	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Thời gian ra rễ (ngày)	Chiều cao TB (cm/cây)	Số cặp lá (lá/cây)	Số rễ TB (rễ/cây)	Chiều dài rễ (cm)
Dạng A	100	7	4,96	4,11	9,23	3,13
Dạng B	88,89	9	4,72	3,92	6,44	1,87
Dạng C	37,78	15	1,52	2,21	0,78	0,58
Dạng D	83,33	11	3,76	3,56	6,21	1,41
Dạng E	76,67	12	3,45	3,37	5,76	1,36
CV%			1,80	2,40	2,10	5,00
LSD _{0,05}			0,12	0,15	0,21	0,15

Bảng 7. Sự sinh trưởng, phát triển của các dạng cây *in vitro* (sau 2 tuần trồng)

Dạng chồi	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao TB (cm)	Số cặp lá/cây
Dạng A	96,16	5,42	5,18
Dạng B	93,33	4,55	4,32
Dạng C	3,33	2,63	2,34
Dạng D	82,22	4,32	3,98
Dạng E	76,67	4,03	3,67
CV%		2,20	2,80
LSD _{0,05}		0,17	0,20

3.3. Khả năng ra rễ của các dạng chồi *in vitro*

Các dạng chồi thu được sau xử lý EMS được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường ra rễ (MS bổ sung 0,5 g/l than hoạt tính và 0,25 mg/l NAA). Sau 4 tuần nuôi cấy, sự sinh trưởng của các loại chồi biến dị đều kém hơn rất nhiều so với chồi bình thường, mức độ tăng trưởng chiều cao, số lá và khả năng ra rễ (tỷ lệ chồi ra rễ, thời gian xuất hiện rễ, số rễ/cây) của các dạng chồi giảm dần theo thứ tự: chồi dạng A > chồi dạng B > chồi dạng D > chồi dạng E > chồi dạng C (Bảng 6). Như vậy, sự sinh trưởng, phát triển của các dạng chồi biến dị trong nuôi cấy *in vitro* sẽ cung cấp dữ liệu giúp định hướng sàng lọc tiếp các dạng biến dị có lợi trong điều kiện tự nhiên.

3.4. Sự thích ứng của các dạng chồi *in vitro* trong điều kiện vườn ươm

Ở giai đoạn vườn ươm, các dạng chồi biến dị có khả năng sống và sinh trưởng thân lá

thấp hơn rất nhiều so với dạng chồi bình thường (Bảng 7). Tỷ lệ sống của các chồi dạng A cao nhất (93,33%) tiếp đến lần lượt là chồi dạng B, D, E, C. Chồi dạng C có khả năng sống thấp nhất (3,33%). Một trong những nguyên nhân chính là do số lượng rễ được tạo ra trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh của chồi dạng C rất thấp.

Sau giai đoạn vườn ươm, các dạng cây nêu trên đã được trồng ra vườn sản xuất để tiếp tục theo dõi, đánh giá về các đặc điểm sinh trưởng, phát triển khác nhằm xác định biến dị có lợi làm nguồn nguyên liệu cho chọn tạo giống hoa cẩm chướng mới.

4. KẾT LUẬN

EMS làm giảm khả năng sống, khả năng phát sinh chồi từ đoạn thân mang mắt ngủ của cây cẩm chướng *in vitro*. Nồng độ EMS càng cao, thời gian xử lý mẫu càng dài thì tỷ lệ mẫu sống và phát sinh chồi càng giảm.

Xử lý EMS đã làm tăng tỷ lệ biến dị cho cây cấy chồi nuôi cấy *in vitro* từ 5,1 đến 22,7 lần so với đối chứng. Nồng độ và thời gian xử lý thích hợp là 0,4% EMS trong thời gian 2 giờ.

Tùy thuộc vào nồng độ EMS và thời gian xử lý mẫu, đã thu được các dạng chồi biến dị khác nhau. Trong năm dạng chồi biến dị thu được (A, B, C, D, E) thì mức độ tăng trưởng chiều cao, số lá và khả năng ra rễ (tỷ lệ chồi ra rễ, thời gian xuất hiện rễ, số rễ/cây) của các dạng chồi giảm dần theo thứ tự: chồi dạng A > chồi dạng B > chồi dạng D > chồi dạng E > chồi dạng C.

Trên cơ sở số liệu thực nghiệm đã xây dựng được mô hình toán học và hệ số tương quan biểu diễn mối quan hệ giữa khả năng sống của mẫu cấy, tỷ lệ biến dị của chồi với nồng độ EMS và thời gian xử lý mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đào Thanh Bằng, Nguyễn Hữu Đống, Mai Ngọc Toàn, Khuất Hữu Trung, Nguyễn Mỹ Giang, Ngô Hữu Tình (1997). “Nghiên cứu hiệu quả của việc xử lý Ethylmethanesulphonate (EMS) trên ngô giống thế hệ M1 và M2”, Kết quả nghiên cứu khoa học 1997-1998, Viện Di truyền Nông nghiệp, tr. 240 - 245. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.
- Nguyễn Đình Trí, Tạ Văn Đĩnh, Nguyễn Hồ Quỳnh (2002). Toán học cao cấp, tập 2, NXB. Giáo dục, Hà Nội, tr. 56-58.
- Arani, A., Majidi, M.M (2004). Study of induced mutation via ethyl methane sulfonate (EMS) in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop), *Agricultural Sciences and Technology*, Vol 18, Number 2, pp.167-180.
- Gustav A. L. Mehlquist, Dorothy Ober, Yoneo Sagawa (1995). Somatic mutation in the Carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Genetics*, Vol 40, p.432 – 436.
- Luan, Yu-Shi, Zhang, Juan, Gao, Xiao-Rong, An, Li-Jia (2007). Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 88, Number 1, pp.77-81.
- M. Duron (2007). Induced mutations through EMS treatment after adventitious bud formation on shoot internodes of weigela cv. Bristol rub, *Acta Horticulturae*, Vol 64, pp1.
- Shin Watanabe, Tsuyohi Mizoguchi, Koh Aoki, Yasutaka Kubo, Hitoshi Mori, Shunsuke Imanishi, Yamazaki, Daisuke Shibata, Hiroshi Ezura (2007). Ethylmethanesulphonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. *Plant Biotechnology*, 24, pp.33- 38.
- Tulmann Neto, A., Latado, R.R., Adames, A.H (2004). *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 77, Number 1, pp. 103-106.
- Office of the Gene Technology Regulator, Australian Government (2005). *The Biology and Ecology of Dianthus caryophyllus* L. (Carnation).pp 3-4.