

## **ẢNH HƯỞNG CỦA XỬ LÝ ĐỘT BIẾN *IN VITRO* BẰNG ETHYL METHANE SULPHONATE (EMS) KẾT HỢP CHIẾU XẠ TIA GAMMA ĐẾN SỰ BIẾN DỊ Ở CÂY HOA CẨM CHƯỚNG (*Dianthus caryophyllus* L.)**

Vũ Hoàng Hiệp<sup>1,3\*</sup>, Nguyễn Thị Lý Anh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Nghiên cứu sinh khoa Nông học, Trường đại học Nông nghiệp Hà Nội*

<sup>2</sup>*Viện Sinh học nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

<sup>3</sup>*Trường Cao đẳng Cộng đồng Hải Phòng*

Email\*: vuhuanghiiep@hpce.edu.vn

Ngày gửi bài: 29.10.2013

Ngày chấp nhận: 29.12.2013

### TÓM TẮT

Nghiên cứu tác động của xử lý kết hợp EMS và chiếu xạ gamma *in vitro* đến khả năng sống, sự sinh trưởng, phát triển và sự hình thành các dạng biến dị của cây cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.), nhằm tìm kiếm phương pháp hữu hiệu để tạo nguồn nguyên liệu cho công tác chọn tạo giống cây hoa cẩm chướng. Trong thí nghiệm, các đoạn thân mang mắt ngủ của cây *in vitro* (giống Queen chúa) được xử lý với nồng độ EMS và liều lượng chiếu xạ tia gamma khác nhau (nồng độ EMS từ 0,1 đến 0,4%; liều hấp thụ tia gamma từ 10 – 30G $\gamma$ ). Sau xử lý, thu được tám dạng chồi *in vitro* (A, B, C, D, E, F, G, H) khác biệt nhau về hình thái, cấu trúc. Trong điều kiện *in vitro*, sự tăng trưởng chiều cao, số lá và khả năng ra rễ của các dạng chồi giảm dần theo thứ tự: C > A > D > B > F > H > G. Sự sinh trưởng, phát triển của các dạng chồi nêu trên ở vườn ươm cũng có sự khác nhau. Dạng chồi C có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh nhất, sau đó đến dạng A, D, F, B, H. Dạng chồi G không có khả năng sinh trưởng phát triển trong điều kiện vườn ươm. Một số dạng biến dị về hình thái thân lá và màu sắc hoa đã được phân lập. Kết quả cho thấy liều lượng xử lý cao tỷ lệ biến dị nhiều, tuy nhiên tỷ lệ biến dị tăng chủ yếu ở các dạng biến dị bất lợi. Liều lượng xử lý thích hợp là EMS 0,2% kết hợp xử lý chiếu xạ 20G $\gamma$ . Ở liều lượng này cho tỷ lệ sống cao và xuất hiện nhiều dạng biến dị có tiềm năng cho công tác chọn tạo giống hoa cẩm chướng mới.

Từ khoá: Cẩm chướng, xử lý đột biến *in vitro*, chồi biến dị, EMS, tia gamma.

### **Effects of *in vitro* Mutagenic Treatment with combination of Ethyl methane Sulphonate (EMS) and Gamma Irradiation on genetic changes in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)**

#### ABSTRACT

The study on the effects of combined EMS treatment and gamma radiation on survival, growth, development and genetic changes of *in vitro* carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) aimed at identifying effective methods to create materials for carnation breeding. Stem segments with nodes of *in vitro* plantlets (cultivar "Princess") were treated with different EMS concentrations and gamma - rays irradiation doses (EMS concentrations from 0.1 to 0.4% and the absorbed dose of gamma – rays from 10 - 30G $\gamma$ ). Eight types of shoot variants were obtained (A, B, C, D, E, F, G and H). *In vitro* condition, the height, number of leaves and rooting ability of these shoot variants were reduced gradually in the following descending order: C > A > D > B > F > H > G. The growth and development of these shoot types in the nursery were also different. The shoot type showed strongest growth, followed by types A, D, F, B, and H. The type G did not grow and develop in nursery conditions. Some variants of the leaf morphology and color of flowers were isolated. The results showed that the rate of genetic changes was positively correlated with treatment dose. However, mutation rate increased mainly in the undesirable types. The optimal treatment dose was 0.2% EMS and radiation of 20Gy. This dose yielded high survival rate and frequency of potential variant types for breeding new carnation cultivar.

Keywords: Carnation, *in vitro* mutagenie treatment, shoot variants, EMS, gamma-rays.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) là một trong 4 loài hoa cắt cành có giá trị kinh tế cao, chiếm 17% tổng sản lượng hoa cắt (Nguyễn Thị Kim Lý, 2012). Ở nước ta hiện nay, các giống cẩm chướng còn nghèo nàn về chủng loại, các giống cũ đang dần bị thoái hóa chưa đáp ứng yêu cầu ngày càng khắt khe của thị trường. Các giống cẩm chướng cung cấp cho sản xuất chủ yếu phải nhập nội từ nước ngoài do đó không chủ động và chi phí sản xuất cao, đặc biệt là không thể mở rộng sản xuất và xuất khẩu bởi không có bản quyền giống. Vì vậy, 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 cẩm chướng mới đáp ứng được nhu cầu thị trường, phù hợp với điều kiện sinh thái và có bản quyền của Việt Nam.

Chọn tạo giống cây trồng đột biến là lĩnh vực nghiên cứu được phát triển từ giữa thế kỷ 20 và đến nay đã được ứng dụng rộng rãi mang lại những thành tựu hết sức to lớn. Theo báo cáo của Tổ chức năng lượng nguyên tử quốc tế (IAEA), tính đến năm 2013 đã có 3200 giống cây trồng đột biến thuộc trên 200 loài khác nhau được công nhận và ứng dụng trong sản xuất. Hơn thế nữa, việc gây tạo đột biến nhân tạo kết hợp với nuôi cấy mô tế bào thực vật *in vitro* đã trở thành công cụ hữu hiệu giúp giảm thiểu chi phí và thời gian chọn tạo giống cây trồng mới (Okamura, 2006; Shu, 2009; IAEA, 2013).

Phương pháp xử lý đột biến *in vitro* bằng các tác nhân hóa học và vật lý đã 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. Hàng loạt các công trình chọn tạo giống cây trồng mới theo phương pháp này trên thế giới và ở nước ta đã được công bố (Vũ Hoàng Hiệp và Nguyễn Thị Lý Anh, 2013; Roychowdhury, 2011; Nguyễn Thị Lý Anh và cs., 2009; Đào Thanh Bằng và cs., 2006; Paramesh and Sona Chowdhury, 2005; Jerzy and Zalewska, 2000; Manreet Sooch et al., 2002...). Trong các công bố trên, các tác giả đều sử dụng riêng rẽ tia phóng xạ hoặc hóa chất để

gây đột biến nhân tạo. Việc sử dụng kết hợp cả hai tác nhân này để gia tăng hiệu quả gây đột biến còn chưa được đề cập.

Nghiên cứu này nhằm bước đầu làm rõ tác động gây đột biến của xử lý kết hợp EMS và chiếu xạ gamma *in vitro* cho cây cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) nhằm tìm kiếm phương pháp hữu hiệu để gây tạo các dạng biến dị phục vụ công tác chọn tạo giống hoa cẩm chướng mới ở Việt Nam.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Đoạn thân mang mắt ngủ của chồi *in vitro* cây hoa cẩm chướng (*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 6,5 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, 105 kPa trong thời gian 20 phút (Gamborg and Philips, 1995). Mẫu được nuôi ở nhiệt độ 24 °C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Các công thức thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm bố trí 50 mẫu cho một lần nhắc lại, tiến hành 3 lần nhắc lại.

#### 2.2.2. Phương pháp xử lý đột biến *in vitro*

Cây cẩm chướng *in vitro* 4 tuần tuổi được cắt lấy đoạn thân mang mắt ngủ có chiều dài khoảng 1,0 cm đem ngâm trong dung dịch EMS có nồng độ khác nhau (0,1; 0,2; 0,3; 0,4%), sau đó đưa vào máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút, đặt trong bóng tối, trong các thời gian 2 giờ. Các mẫu sau khi xử lý được rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần sau đó đem cấy trên môi trường MS trong đĩa petri với số lượng 50 mẫu/đĩa. Sau đó mẫu được chiếu xạ tia gamma (nguồn Co<sup>60</sup>) với các liều hấp thụ 10Gy, 20Gy, 30Gy tại Bệnh viện K Hà Nội. Các mẫu sau chiếu xạ được nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh chồi (MS bổ

Ảnh hưởng của xử lý đột biến *in vitro* bằng ethyl methane sulphonate (EMS) kết hợp chiếu xạ tia gamma đến sự biến dị ở cây hoa cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.)

sung 1,0 ppm Kinetin) và đánh giá ảnh hưởng của các liều lượng xử lý đến khả năng sống, tái sinh và sự sinh trưởng của các chồi. Mỗi công thức xử lý 50 mẫu *in vitro* cho một lần nhắc lại, tiến hành 3 lần nhắc lại. Các chồi tái sinh sau khi nhân nhanh được chuyển sang môi trường ra rễ (MS bổ sung 0,5 g/l than hoạt tính và 0,25 mg/l αNAA). Các môi trường nuôi cấy nêu trên sử dụng theo công bố trước đây của chúng tôi (Vũ Hoàng Hiệp và Nguyễn Thị Lý Anh, 2013)

Các cây *in vitro* đạt tiêu chuẩn được trồng tại vườn ươm bằng phương pháp khí canh sử dụng dung dịch Anthura (nồng độ chuẩn gồm: CaNO<sub>3</sub> : 610mg/l, KNO<sub>3</sub>: 200mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 204mg/l, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 150mg/l, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 200mg/l, FeEDTA: 27mg/l, MnSO<sub>4</sub>: 5mg/l, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: 0,95mg/l, ZnSO<sub>4</sub>: 0,9mg/l, CuSO<sub>4</sub>: 0,19mg/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>: 0,19mg/l.) với chu kỳ phun 15 phút/1 lần, mỗi lần phun 15 giây. Mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc lại trồng 50 cây (hàng cách hàng và cây cách cây 5cm).

Các thí nghiệm trồng cây ngoài đồng ruộng theo quy trình trồng cẩm chướng của Viện nghiên cứu rau quả - Viện khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

### 2.2.3. Các công thức thí nghiệm

Các công thức thí nghiệm được bố trí như trong bảng 1.

### 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 5.0S.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của xử lý kết hợp EMS và chiếu xạ gamma tới sự phát sinh và sinh trưởng của chồi cẩm chướng *in vitro*.

Để xác định mức độ ảnh hưởng của liều lượng chiếu xạ đến khả năng sống, khả năng phát sinh chồi của các mẫu được xử lý, chúng tôi tiến hành xử lý EMS với các nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4% kết hợp chiếu xạ với mức hấp thụ 10, 20, 30Gy, số liệu thu được tại bảng 1.

Kết quả thí nghiệm cho thấy liều lượng xử lý có ảnh hưởng rất rõ đến khả năng sống và phát sinh chồi của các mẫu xử lý. Khi tăng liều xử lý lên thì tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu phát sinh chồi giảm dần. Trong các công thức có xử lý

**Bảng 1. Ảnh hưởng của liều lượng xử lý EMS và chiếu xạ đến khả năng sống, sự phát sinh chồi (sau 4 tuần nuôi cấy)**

Công thức	Nồng độ EMS (%)	Liều hấp thụ (Gy)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (%)	Chất lượng chồi
ĐC	0	0	95,33	4,67	100,0	+++
CT1	0,1	10	87,33	12,67	89,33	+++
CT2	0,1	20	80,67	19,33	86,67	++
CT3	0,1	30	72,00	28,33	78,00	++
CT4	0,2	10	80,00	20,00	88,00	+++
CT5	0,2	20	73,33	20,67	86,67	+++
CT6	0,2	30	52,00	48,00	69,33	++
CT7	0,3	10	74,67	25,33	84,00	+++
CT8	0,3	20	54,67	45,33	77,33	++
CT9	0,3	30	32,67	67,33	66,67	++
CT10	0,4	10	68,67	31,67	76,00	++
CT11	0,4	20	42,67	57,33	68,67	++
CT12	0,4	30	24,67	75,33	60,00	+
	CV%		2,90	5,20	2,60	
	LSD <sub>0,05</sub>		3,13	3,09	3,52	

Ghi chú: +++ Chồi mập, thân lá màu xanh đậm; ++ Chồi Trung bình, thân lá màu xanh nhạt; + Chồi sinh trưởng phát triển kém, thân lá màu vàng

EMS kết hợp chiếu xạ gamma, tỷ lệ mẫu sống đạt cao nhất tại công thức CT1 (87,33%) và thấp nhất tại công thức CT12 (24,67%). Kết quả cho thấy sự thay đổi liều lượng xử lý gamma có ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu chết lớn hơn sự thay đổi nồng độ EMS. Hơn nữa, chỉ số này phụ thuộc nhiều vào kiểu gen và loại vật liệu đưa vào xử lý. Theo Jerzy and Zalewska (2000), khi chiếu xạ tia gamma với liều hấp thụ là 20 Gy cho các đoạn thân mang mắt ngủ giống cảm chướng *Dianthus gratianopolita-nus* Vill., syn. *D. caesius* Sm.) cv. Mini Pinky, tỷ lệ mẫu sống và tạo chồi chỉ đạt 44,7% so với đối chứng. Manreet Sooch và cộng sự (2000) cũng đã đưa ra những kết quả tương tự. Đối với tác nhân xử lý là EMS, Roychowdhury, (2011) chỉ ra rằng: khi xử lý hạt cảm chướng ở nồng độ 0,1% đến 0,7% trong 6 giờ, tỷ lệ sống chỉ còn từ 67,67% đến 51%. Trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Nguyễn Thị Lý Anh và cộng sự., 2009), khi xử lý EMS ở nồng độ 0,2% trong 3 giờ tỷ lệ sống và phát sinh chồi của mẫu cấy đạt 83,33 và 82,68%. Như vậy, việc xử lý kết hợp EMS và tia gamma đã làm giảm mạnh tỷ lệ mẫu sống so với xử lý riêng rẽ các tác nhân gây đột biến nêu trên.

### 3.2. Ảnh hưởng của xử lý kết hợp EMS và tia gamma đến sự phát sinh biến dị hình thái chồi *in vitro*

EMS và tia gamma không chỉ ảnh hưởng đến khả năng sống và tái sinh chồi của mẫu cấy mà còn gây tạo biến dị hình thái các chồi *in vitro*. EMS là chất gây đột biến hoá học tác động trực tiếp vào hệ gen của tế bào và gây đột biến điểm trên DNA. Bên cạnh đó, tia gamma vừa có tác động trực tiếp vào hệ gen của tế bào vừa có tác động gián tiếp thông qua sự ion hóa. Nó có khả năng biến các phân tử thành những phân tử mang điện tích. Nhờ sự ion hoá mà trong tế bào xảy ra những biến đổi về mặt hoá học của vật liệu di truyền và những chất khác khi hấp thụ năng lượng bức xạ. Kết quả quá trình này dẫn tới những biến đổi trong phân tử DNA, gây ra đột biến điểm, đôi khi gây ra sự gãy đứt tạo nên đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể

(Trần Duy Quý, 1997). Số liệu thu được cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính của tỷ lệ các chồi biến dị hình thái vào liều lượng xử lý, liều lượng càng cao tỷ lệ chồi biến dị càng lớn. Sau xử lý chúng tôi đã phân lập 8 dạng chồi:

- Dạng A: Chồi phát triển bình thường.
- Dạng B: Sinh trưởng phát triển kém, thân lá màu vàng
- Dạng C: Chồi sinh trưởng phát triển mạnh, thân lá mập màu xanh nhạt
- Dạng D: Chồi mập, màu xanh đậm, các lá to, lá phần ngọn cuộn lại hình ống
- Dạng E: Chồi bị thủy tinh hóa, thân lá mỏng nước
- Dạng F: Chồi có khả năng đẻ nhánh mạnh, từ các đốt thân có rất nhiều chồi tạo như hình bông hoa, lá ngắn, thân lá màu xanh đậm
- Dạng G: Chồi có thân nhỏ, mềm, lá ngắn, tạo thành cụm như cây rau má
- Dạng H: Chồi có khả năng phát sinh chồi mạnh, lá to bản, các lá dày phần cuống lá dính lại với nhau bao quanh thân.

Số liệu cho thấy sự phân bố của các dạng chồi ở các công thức thí nghiệm không giống nhau. Ở đối chứng chỉ xuất hiện 2 dạng chồi là chồi dạng A và dạng chồi E. Khi tăng liều xử lý thì tỷ lệ chồi biến dị có xu hướng tăng lên, tuy nhiên số dạng chồi lại có xu hướng giảm ở các công thức xử lý với liều lượng cao. Đặc biệt dạng chồi có khả năng sinh trưởng phát triển tốt (dạng chồi C) chỉ xuất hiện ở công thức CT4 đến CT10. Công thức CT5 (xử lý 0,2% EMS kết hợp chiếu xạ gamma ở liều hấp thụ 20Gy) xuất hiện nhiều dạng chồi, trong đó dạng chồi có khả năng sinh trưởng phát triển tốt có tỷ lệ cao (Dạng C: 9,99%). Theo Nguyễn Thị Lý Anh và cs. (2009) ; Vũ Hoàng Hiệp và Nguyễn Thị Lý Anh (2013), khi xử lý riêng rẽ tác giả thu được 4 dạng chồi *in vitro* khi xử lý bằng EMS và 6 dạng chồi *in vitro* khi xử lý chiếu xạ gamma. Như vậy xử lý kết hợp EMS và tia gamma trong giai đoạn nuôi cấy *in vitro* xuất hiện nhiều dạng chồi biến dị hơn so với xử lý riêng rẽ hai tác nhân này.

Ảnh hưởng của xử lý đột biến *in vitro* bằng ethyl methane sulphonate (EMS) kết hợp chiếu xạ tia gamma đến sự biến dị ở cây hoa cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.)



Hình 1. Các dạng chồi thu được sau xử lý

Bảng 2. Tỷ lệ chồi biến dị và các dạng chồi *in vitro* sau xử lý kết hợp EMS và tia gamma (Sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ EMS (%)	Liều hấp thụ gamma (Gy)	Dạng A (%)	Dạng B (%)	Dạng C (%)	Dạng D (%)	Dạng E (%)	Dạng F (%)	Dạng G (%)	Dạng H (%)	Tỷ lệ chồi biến dị (%)
ĐC	0,0	0,0	95,92	0,00	0,00	0,00	4,08	0,00	0,00	0,00	4,08
CT1	0,1	10	86,79	4,73	0,00	0,00	8,50	0,00	0,00	0,00	13,21
CT2	0,1	20	79,65	5,33	0,00	0,00	10,18	4,84	0,00	0,00	20,35
CT3	0,1	30	71,26	11,63	0,00	0,00	10,95	6,17	0,00	0,00	28,74
CT4	0,2	10	72,66	8,48	3,26	0,00	8,36	7,26	0,00	0,00	27,34
CT5	0,2	20	57,50	7,98	9,12	0,00	11,30	8,72	0,00	5,37	42,50
CT6	0,2	30	37,89	18,40	6,90	0,00	13,80	9,20	6,90	6,90	62,11
CT7	0,3	10	45,96	13,27	6,60	0,00	11,18	11,18	2,49	9,32	54,04
CT8	0,3	20	34,34	15,48	7,16	4,78	11,13	11,45	6,26	9,39	65,66
CT9	0,3	30	29,49	18,49	5,44	6,54	12,04	12,04	6,02	9,95	70,51
CT10	0,4	10	39,62	16,36	4,36	7,38	12,26	11,12	0,00	8,90	60,38
CT11	0,4	20	28,90	25,52	0,00	7,82	15,65	7,82	3,91	10,36	71,10
CT12	0,4	30	27,77	27,87	0,00	8,96	18,15	0,00	8,62	8,62	72,23
CV%			2,10	4,90	12,3	11,1	5,10	7,80	10,4	8,00	2,50
LSD <sub>0,05</sub>			1,92	1,10	0,68	0,51	0,96	0,91	0,73	0,71	1,92

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

Để đánh giá khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh của các dạng chồi *in vitro* sau xử lý gây tạo đột biến, các dạng chồi *in vitro* sau khi được nhân nhanh qua 5 thế hệ (M1V5) được cấy chuyển sang môi trường ra rễ (MS bổ sung 0,5 g/l than hoạt tính và 0,25 mg/l αNAA), theo dõi đo đếm các chỉ tiêu. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Sự sinh trưởng và khả năng ra rễ của các loại chồi biến dị B, D, E, F, G, H kém hơn so với chồi bình thường (dạng chồi A), cụ thể mức độ tăng trưởng chiều cao tỷ lệ chồi tạo rễ, thời gian xuất hiện rễ, số rễ/cây ở các dạng chồi này thấp hơn. Dạng chồi C là dạng chồi có khả năng sinh trưởng rất mạnh (tỷ lệ tạo rễ cao (100%), số rễ nhiều (7,27%), thời gian ra rễ nhanh (7,31

ngày), rễ dài (3,20 cm). Khả năng ra rễ của các dạng chồi giảm dần theo thứ tự chồi dạng C > chồi dạng A > dạng chồi D > Chồi dạng B > dạng chồi F > dạng chồi H > dạng chồi G. Dạng chồi E không có khả năng tạo rễ. Những kết quả này cho thấy các dạng chồi không chỉ khác nhau về hình thái mà sự sinh trưởng, phát triển của chúng trong nuôi cấy *in vitro* rất khác nhau. Như vậy có thể nói rằng tác nhân gây tạo đột biến đã tác động gây ra những biến đổi nhất định về kiểu gen ở các dạng chồi này. Chúng tôi cũng đã thu được những kết quả tương tự khi xử lý riêng rẽ EMS hoặc tia gamma (Nguyễn Thị Lý Anh và cộng sự. 2009; Vũ Hoàng Hiệp và Nguyễn Thị Lý Anh, 2013). Đặc điểm về 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**

Để đánh giá khả năng sinh trưởng của các dạng chồi trong điều kiện tự nhiên, chúng tôi đã đưa cây ra trồng tại vườn ươm theo phương pháp khí canh sử dụng dung dịch dinh dưỡng Anthura với nồng độ bằng dung dịch chuẩn, với chu kỳ phun 15 phút/lần, mỗi lần 15 giây.

Ở giai đoạn vườn ươm, tỷ lệ sống đạt cao nhất là dạng C (100%) sau đó là chồi dạng A, D, F, B, H. Chồi dạng H có khả năng sống rất thấp (45,56%). Các dạng chồi B, F, H có khả năng sống và sinh trưởng thấp hơn rất nhiều so với dạng chồi bình thường. Dạng chồi G không sống được ở điều kiện vườn ươm. Một trong những nguyên nhân chính là do số lượng rễ được tạo ra trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh của các dạng chồi này rất thấp.

**Bảng 3. Sự sinh trưởng và khả năng ra rễ của các dạng chồi *in vitro* (Sau 3 tuần nuôi cấy)**

Dạng chồi	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Thời gian xuất hiện rễ (ngày)	Chiều cao cây(cm)
Dạng A	98,89	6,93	3,01	8,04	4,82
Dạng B	85,56	5,02	2,17	10,95	3,46
Dạng C	100,0	7,27	3,20	7,31	5,17
Dạng D	87,78	5,53	1,23	8,71	2,99
Dạng E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dạng F	82,22	4,16	2,34	11,24	3,67
Dạng G	69,22	3,83	1,95	9,07	2,66
Dạng H	72,22	4,85	1,89	13,19	2,55
CV%	2,50	2,60	3,20	3,00	3,70
LSD0,05	3,36	0,23	0,11	0,52	0,22

**Bảng 4. Khả năng sống và sự sinh trưởng của các dạng cây *in vitro* ở vườn ươm (Sau 2 tuần trồng)**

Dạng chồi	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều caoTB (cm)	Số lá/cây
Dạng A	98,89	5,61	6,84
Dạng B	62,22	4,14	5,67
Dạng C	100,0	6,42	7,37
Dạng D	80,00	3,67	4,90
Dạng F	65,55	4,19	4,22
Dạng G	0,00	-	-
Dạng H	45,55	3,35	5,16
CV%	4,00	5,30	2,50
LSD0,05	4,60	0,33	0,21

Ảnh hưởng của xử lý đột biến *in vitro* bằng ethyl methane sulphonate (EMS) kết hợp chiếu xạ tia gamma đến sự biến dị ở cây hoa cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.)

### 3.5. Phân lập các dạng biến dị của cây cẩm chướng ở giai đoạn đồng ruộng

Hiệu quả cuối cùng của việc xử lý gây tạo đột biến bằng tác nhân EMS kết hợp chiếu xạ gamma được đánh giá ở giai đoạn trồng ngoài đồng ruộng. Để đánh giá hiệu quả của việc xử lý gây tạo đột biến bằng tác nhân EMS kết hợp chiếu xạ gamma các cây *in vitro* sau giai đoạn vườn ươm được đưa ra trồng ngoài đồng ruộng và theo dõi về tỷ lệ sống, sự sinh trưởng phát triển và đặc điểm hình thái cây. Qua theo dõi cho thấy liều lượng xử lý khác nhau không những ảnh hưởng đến sự sinh trưởng phát triển

của cây mà còn ảnh hưởng rất lớn đến sự phát sinh hình thái thân lá và màu sắc hoa của cây cẩm chướng. Do vậy, có thể nói tác nhân gây đột biến đã ảnh hưởng sâu sắc đến hệ di truyền của cây. Điều đáng lưu ý là khi xử lý ở liều lượng quá cao, biến dị thu được chủ yếu là những biến dị có chiều hướng bất lợi như cây sinh trưởng phát triển kém, hoa nhỏ, bị mất màu trên cánh hoa và hình dạng hoa không cân đối (dạng H4). Các biến dị đã được phân lập ở giai đoạn ngoài đồng ruộng được phân làm 2 nhóm: biến dị về hình thái thân lá và biến dị về màu sắc hoa (Hình 2 và Hình 3).



Đối chứng

Lá hình ống

Đầu lá cuộn

Chồi nách phát triển

**Hình 2. Một số dạng biến dị về hình thái thân lá**



Đối chứng

Dạng H1

Dạng H2

Dạng H3

Dạng H4

Dạng H5

**Hình 3. Một số dạng biến dị về màu sắc hoa**

**Bảng 5. Ảnh hưởng của xử lý kết hợp EMS và tia gamma đến tỷ lệ biến dị của cây cẩm chương khi trồng ngoài đồng ruộng**

Công thức	Dạng biến dị (%)								Tổng số
	Hình thái thân lá			Màu sắc hoa					
	Lá hình ống	Lá cuộn	Chồi nách phát triển	H1	H2	H3	H4	H5	
ĐC	0,00	2,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,67
CT1	1,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,67	0,00	4,00
CT2	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,67	2,00	0,00	6,67
CT3	2,67	2,67	0,00	0,00	0,00	2,67	2,67	0,00	10,67
CT4	3,33	2,00	1,33	1,33	0,00	4,00	3,33	0,00	15,33
CT5	3,33	2,00	2,67	4,00	0,00	5,33	5,33	2,00	24,66
CT6	3,33	5,33	0,00	3,33	1,33	4,67	3,33	0,00	21,32
CT7	5,33	4,67	0,67	2,67	0,00	2,00	6,00	0,00	21,34
CT8	6,00	4,00	0,00	0,00	0,00	2,67	6,00	0,00	18,67
CT9	4,00	3,33	3,33	2,67	0,00	3,33	4,67	0,00	21,33
CT10	4,67	5,33	0,00	2,67	0,00	4,00	5,33	0,00	22,01
CT11	4,00	4,00	2,67	1,33	0,00	2,67	6,00	0,00	20,66
CT12	6,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,67	8,00	0,00	18,67

Việc tìm kiếm biến dị có lợi được tập trung vào màu sắc và hình dạng mới của hoa. Trong các công thức thí nghiệm đã phát hiện được một số dạng hoa biến dị đáng quan tâm là dạng H1, H2, H3 và H5. Số liệu tại bảng 5 cho thấy các dạng biến dị về màu sắc xuất hiện nhiều ở công thức CT5, CT6, CT9. Đặc biệt dạng H2, H5 chỉ xuất hiện ở công thức CT5 (EMS 0,2% kết hợp xử lý chiếu xạ 20Gy). Khi tăng liều lượng xử lý, tỷ lệ biến dị dạng H4 (dạng biến dị bất lợi) tăng.

Để làm rõ quan hệ giữa các dạng chồi phân lập được trong giai đoạn nuôi cấy *in vitro* và các dạng biến dị biểu hiện ngoài đồng ruộng, chúng tôi đã theo dõi các dạng biến dị thể hiện ngoài đồng ruộng của các dạng chồi khác nhau. Số liệu tại bảng 6 cho thấy, các dạng biến dị về màu sắc tập trung chủ yếu ở dạng chồi A (dạng chồi bình thường), một số ít xuất hiện ở dạng chồi B, C, F. Dạng biến dị H4 chiếm tỷ lệ cao ở dạng chồi B. Các dạng chồi H chỉ xuất hiện các biến dị về

**Bảng 6. Tỷ lệ biến dị của một số dạng chồi cẩm chương *in vitro* khi trồng ngoài đồng ruộng**

Dạng chồi <i>In vitro</i>	Dạng biến dị (%)								Tổng số
	Hình thái lá			Màu sắc hoa					
	Lá hình ống	Lá cuộn	Chồi nách phát triển	H1	H2	H3	H4	H5	
A	1,03	0,67	0,15	1,38	0,10	1,59	1,03	0,15	6,10
B	0,62	0,92	0,62	0,00	0,00	0,31	0,67	0,00	3,13
C	0,41	1,08	0,00	0,00	0,00	0,41	2,00	0,00	3,90
D	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,00	0,00	0,36
F	1,49	0,41	0,05	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	2,51



Ảnh hưởng của xử lý đột biến *in vitro* bằng ethyl methane sulphonate (EMS) kết hợp chiếu xạ tia gamma đến sự biến dị ở cây hoa cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.)

hình thái lá. Kết quả nghiên cứu cho thấy các dạng biến dị có tiềm năng thu thập được ở giai đoạn ngoài đồng ruộng chủ yếu từ dạng chồi A. Như vậy sau xử lý chúng ta có thể phân lập các dạng chồi và loại bỏ những dạng chồi có khả năng sinh trưởng phát triển kém ngay ở giai đoạn nuôi cấy *in vitro*.

#### 4. KẾT LUẬN

Xử lý kết hợp EMS và tia gamma đã làm giảm khả năng sống, khả năng phát sinh chồi, đặc biệt đã làm tăng tỷ lệ biến dị cho cây cẩm chướng nuôi cấy *in vitro* (từ 13,23 đến 72,56%).

Trong tám dạng chồi *in vitro* thu được sau khi xử lý đột biến (A, B, C, D, E, F, G, H) 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: dạng C > chồi dạng A > dạng chồi D > Chồi dạng B > dạng chồi F > dạng chồi H > dạng chồi G. Dạng chồi E không có khả năng tạo rễ.

Sự sai khác về sinh trưởng, phát triển của các dạng chồi nêu trên được tiếp tục thể hiện ở giai đoạn vườn ươm: Dạng chồi C có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh nhất, sau đó đến dạng A, D, F, B, H. Riêng dạng chồi G không có khả năng sống ở điều kiện vườn ươm.

Khi phân lập biến dị về hình thái thân lá và màu sắc hoa ở giai đoạn trồng trên đồng ruộng cho thấy: các dạng biến dị có tiềm năng chủ yếu xuất hiện từ dạng chồi có hình thái bình thường (dạng A); liều lượng xử lý thích hợp để tạo được những dạng biến dị có tiềm năng cho công tác chọn tạo giống hoa cẩm chướng mới (dạng hoa H1 và H5) là xử lý EMS nồng độ 0,2% kết hợp chiếu xạ gamma với liều hấp thụ là 20Gy (CT5).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

Đào Thanh Bằng, Nguyễn Hữu Đồng và Trần Duy Quý (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 Lý Anh (2013). Ảnh hưởng của xử lý đột biến *in vitro* bằng chiếu xạ gamma đối với cây hoa cẩm chướng. 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 Thị Kim Lý, Lê Đức Thảo và Nguyễn Xuân Linh (2012). Kỹ thuật trồng và chăm sóc cây hoa cẩm chướng, NXB Nông nghiệp, Hà Nội

Trần Duy Quý (1997). Đột biến: cơ sở khoa học và ứng dụng. NXB Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 46-61

Gamborg and Philips (1995). Plant cell, tissue and Organ culture – Fundamental methods. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 35-37

International Atomic Energy Agency (2013). Nuclear Technology Review 2010, Vienna, p. 33-35

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, 24 ref.

Manreet Soodh, Arora, J. S., Kushal Singh, Gosal, S. S. (2002). Effect of Gamma ray irradiation on *in vitro* multiple shoot formation and establishment of carnation plants. Journal of Ornamental Horticulture (New Series), 3 (2): 118-119, 3 ref.

Okamura, M. (2006). Flower breeding by quantum beam technology, and its commercialization, Gamma Field Symposia, 45: 77- 89, 15 ref.

Paramesh, T. H., Sona Chowdhury (2005). Impact of explants and Gamma irradiation dosage on *in vitro* mutagenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Journal of Applied Horticulture, 7 (1): 43-45, 5 ref.

Roychowdhury R., Jagatpati Tah, Tinkari Dalal and Abhijit Bandyopadhyay (2011). Selection response and correlation studies for metrical traits in mutant carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) genotypes. Agricultural Science, 5 (3): 6 – 14.

Roychowdhury, R., (2011). Effect of Chemical Mutagens on Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.): A Mutation Breeding Approach (1st Ed.). LAP Lambert Academic Publishing, Germany, p. 14.

Shu Q.Y. (ed.) (2009). Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome: 425-427.