

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA DIMETHYL SULFIDE (DMS) ĐẾN TẠO BIẾN DỊ LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ (*Dendrobium anosmum* Lindl)

Nguyễn Hữu Thọ^{1,4}, Nguyễn Thị Oanh¹, Lê Thị Thu Hằng³, Trương Thị Bích Phượng², Nguyễn Thị Kim Cúc^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tĩnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, Số 77 Nguyễn Huệ, TP. Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

³Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế, Số 102 Phùng Hưng, P. Đông Ba, TP. Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

⁴Trường Cao đẳng Cơ điện, Xây dựng và Nông lâm Trung Bộ, QL1A, KV8, P. Bùi Thị Xuân, TP. Quy Nhơn, Bình Định, Việt Nam

TÓM TẮT

Gây đột biến bằng hóa chất là một trong những biện pháp thường được sử dụng để chọn tạo giống thực vật. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng Dimethyl sulfide để gây đột biến trên giống lan Giả hạc tím Huế với mục đích chọn tạo được một số kiểu hình có giá trị thẩm mỹ và giá trị kinh tế cao. Xử lý mô sẹo lan Giả hạc tím Huế bằng Dimethyl sulfide với các nồng độ từ 0; 50; 100; 200; 400; 800 ppm trong các mốc thời gian khác nhau từ 2-10 giờ. Kết quả nghiên cứu sau 8 tuần nuôi cấy ghi nhận tỷ lệ mô sẹo còn sống đạt cao nhất là 73,62% ở thí nghiệm nồng độ DMS 50 ppm và xử lý trong 2 giờ, tuy nhiên số mẫu có biểu hiện hình thái khác so với đối chứng chỉ đạt 4,43%. Xử lý mô sẹo bằng DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ cho số mẫu biến dị hình thái lớn (14,93%). Các biến đổi ban đầu của mô sẹo sau khi xử lý DMS là những thay đổi về hình thái và màu sắc. Các tế bào biểu mô, khí khổng, hệ thống mạch dẫn của các chồi phát triển từ mô sẹo được xử lý DMS đều có những thay đổi chủ yếu là về hình dạng, trật tự sắp xếp. Từ những kết quả này chúng tôi tiếp tục nuôi cấy mô sẹo để tạo thành cây hoàn chỉnh nhằm chọn lọc các kiểu hình khác nhau phục vụ công tác chọn tạo giống lan Giả hạc tím Huế.

Từ khóa: Biến dị, cấu trúc tế bào, *Dendrobium anosmum* Lindl., Dimethyl sulfide (DMS), mô sẹo, thay đổi hình thái.

MỞ ĐẦU

Những năm gần đây, nhu cầu sưu tầm và trồng các loại hoa, cây cảnh có biến đổi về thân, lá, hoa tăng cao, đặc biệt lan Giả hạc là một trong những cây cảnh được nhiều người quan tâm. Lan Giả hạc có tên khoa học là *Dendrobium anosmum*, thuộc chi *Dendrobium*, họ Orchidaceae. Lan Giả hạc có hình thái, màu sắc và kích thước đa dạng nên được đánh giá là một trong những loài hoa, cây cảnh có giá trị trên thế giới (Teixeira da Silva *et al.*, 2015). Ở Việt Nam, lan Giả hạc phân bố từ Bắc vào Nam, trên mỗi vùng miền thì loài lan này có một số đặc điểm hình thái và thời điểm ra hoa riêng để nhận biết (Huyền, 2007). Lan Giả hạc tím Huế là một trong những giống lan đặc trưng của Thừa Thiên Huế, với đặc điểm hoa to, cánh viền, màu tím hồng đặc trưng và có mùi thơm dịu, mặt hoa cân đối, đây là một trong những giống lan Giả hạc được nhiều người quan tâm tìm kiếm (Tho *et al.*, 2024). Lan Giả hạc tím Huế mặc dù có giá trị thẩm mỹ cao nhưng ít có những biến dị di truyền nên độ đa dạng mặt hoa thấp hơn so với một số giống lan Giả hạc khác. Với mục tiêu tạo ra nhiều thay đổi hơn về kiểu hình, đa dạng nguồn nguyên liệu cho chọn lọc, đáp ứng nhu cầu đa dạng người chơi lan, làm tăng giá trị của dòng lan này, chúng tôi thực hiện nghiên cứu tạo đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng DMS.

DMS là một chất alkyl hóa đơn chức có phản ứng với DNA thông qua phản ứng thay thế hai phân tử (S_N2), tạo thành một phức hợp chuyển tiếp với nucleophile mạnh, đặc biệt là nitrogen bases như vị trí N7 của guanin và vị trí N3 của adenin (Lawley, 1974), dẫn đến đột biến chuyển tiếp GC \rightarrow AT (Singer, Grunberger, 1983). Đã có những nghiên cứu về tác động gây đột biến của DMS trên cây trồng như trên cây Đậu tây (Sekhi *et al.*, 2022), DMS đã làm thay đổi một số đặc điểm sinh hoá trên cây Đậu tây như hàm lượng diệp lục, proline, enzyme..., trên cây Xà cừ (Mostafa, 2015), trên cây Huỳnh liên (Mostafa, Alhamd, 2016), DMS đã làm thay đổi khả năng tăng trưởng, thành phần hoá học trong cây, thay đổi hình thái và màu sắc của hoa, lá. DMS chưa được sử dụng nhiều trong việc tạo đột biến trên lan, nghiên cứu này được xem là đầu tiên trong việc sử dụng DMS để tạo ra biến dị trên cây lan Giả hạc *D. anosmum* Lindl.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mô sẹo có kích thước đồng đều từ 0,2-0,3 cm được tạo ra từ chồi ngủ của thân lan Giả hạc tím Huế được nuôi cấy *in vitro*. Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS cơ bản (Murashige, Skoog, 1962) có 30 g/L sucrose, 7 g/L agar, 0,7 g/L than hoạt tính và bổ sung các chất kích thích sinh trưởng thực vật thích hợp ở từng giai đoạn khác nhau. Môi trường nuôi cấy có pH = 5,8, được khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm, trong 15 phút. Mẫu được giữ trong phòng nuôi ở nhiệt độ: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, mật độ thông lượng photon quang hợp trong khoảng $13,5 - 27 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày (Tho *et al.*, 2023).

Xử lý hóa chất

Mô sẹo lan khỏe mạnh, không có dấu hiệu nhiễm nấm khuẩn, có màu xanh lá, sinh trưởng tốt được sử dụng để xử lý hóa chất DMS. Hóa chất cho vào môi trường MS lỏng để đạt được các nồng độ theo từng công thức thí nghiệm (0, 50, 100, 200, 400, 800 ppm) và mỗi công thức thí nghiệm được xử lý trong một thời gian nhất định (2, 4, 6, 8, 10 giờ). Các chỉ tiêu theo dõi được ghi lại sau 8 tuần xử lý hóa chất. Những chỉ tiêu đánh giá bao gồm tỷ lệ sống của mẫu xử lý, tỷ lệ mẫu có phát triển hình thành mầm chồi và kích thước của mẫu còn sống, tỷ lệ mẫu có hình thái biến dị.

Phân tích đặc điểm biến đổi

Sử dụng chỉ thị hình thái: Quan sát, phân tích hình thái (Hình dạng mô sẹo, hình dạng và màu sắc lá mầm, chồi) của mẫu xử lý DMS so sánh với mẫu đối chứng không xử lý DMS.

Sử dụng chỉ thị tế bào: Được tiến hành theo phương pháp nghiên cứu với kính hiển vi của tác giả Trần Công Khánh (2005). Thực hiện làm tiêu bản tạm thời quan sát dưới kính hiển vi các mẫu mô sẹo và mẫu lá, thân, rễ của cây con *invitro* phát triển từ mô sẹo xử lý DMS giai đoạn ra rễ để đánh giá các biến đổi về hình dạng, kích thước, sắp xếp của tế bào, mạch dẫn của mô sẹo và chồi lan sau khi xử lý hóa chất so với mẫu đối chứng không xử lý DMS.

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp quan sát 15 mẫu. Số liệu thu được được xử lý bằng phần mềm SPSS 26 và được phân tích Duncan's test với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$. Hình ảnh được phân tích bằng phần mềm Imageji 1.8.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xử lý hóa chất đột biến DMS

Bảng 1. Kết quả xử lý mẫu mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy

CT	Nồng độ xử lý (ppm)	Thời gian xử lý (h)	Chỉ tiêu theo dõi sau khi xử lý bằng DMS			
			Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu có phát triển mầm chồi (%)	Tỷ lệ mẫu có hình thái biến dị (%)	Kích thước mẫu sống (cm)
ĐC	0	0	95,56±2,94 a	88,89±1,11 a	0,00±0,00 g	0,86±0,05 a
CT1	50	2	73,62±1,32 b	53,32±2,34 b	4,43±0,63 e	0,85±0,0 a
CT2	100	2	54,44±2,94 d	32,22±2,94 d	8,38±1,19 d	0,75±0,02 bc
CT3	200	2	33,33±3,85 g	21,11±2,22 e	12,19±1,50 bc	0,80±0,02 ab
CT4	400	2	7,78±2,22 jk	4,44±1,11 gh	3,71±0,38 ef	0,71±0,02 cd
CT5	800	2	0,00±0,00 m	0,00±0,00i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT6	50	4	66,58±2,95 c	37,49±2,11 c	14,93±1,91 a	0,67±0,01 de
CT7	100	4	24,44±1,11 h	14,44±1,11 f	7,77±0,63 d	0,65±0,04 de
CT8	200	4	7,78±1,11 jk	3,33±0,00 ghi	3,33±0,00 ef	0,61±0,02 efg
CT9	400	4	3,33±1,92 klm	1,11±1,11 hi	1,11±1,11 fg	0,56±0,05 fgh
CT10	800	4	1,11±1,11 lm	1,11±1,11 hi	1,11±1,11 fg	0,53±0,02 h
CT11	50	6	47,74±1,08 e	18,68±0,73e	13,56±1,09 ab	0,68±0,01 cde
CT12	100	6	10,00±1,92 j	5,56±1,11 g	3,89±0,48 ef	0,69±0,02 cde
CT13	200	6	2,22±1,11 lm	1,11±1,11 hi	2,22±1,11 efg	0,53±0,02 h

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

CT14	400	6	0,00±0,00 m	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT15	800	6	0,00±0,00 m	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT16	50	8	41,43±1,13 f	12,59±1,35 f	10,23±1,35 cd	0,61±0,04 efg
CT17	100	8	5,56±1,11 jkl	4,44±1,11 gh	2,72±1,43 efg	0,62±0,02 ef
CT18	200	8	1,11±1,11 lm	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,52±0,00 h
CT19	400	8	0,00±0,00 m	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT20	800	8	0,00±0,00 m	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT21	50	10	19,62±0,77 i	6,78±0,85 g	3,03±0,72 ef	0,56±0,05 fgh
CT22	100	10	2,22±1,11 lm	1,11±1,11 hi	1,11±1,11 fg	0,54±0,02 gh
CT23	200	10	1,11±1,11 lm	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,51±0,00 h
CT24	400	10	0,00±0,00 m	0,00±0,00 h	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT25	800	10	0,00±0,00 m	0,00±0,00 h	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i

Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột cho biết có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, Duncan's test).

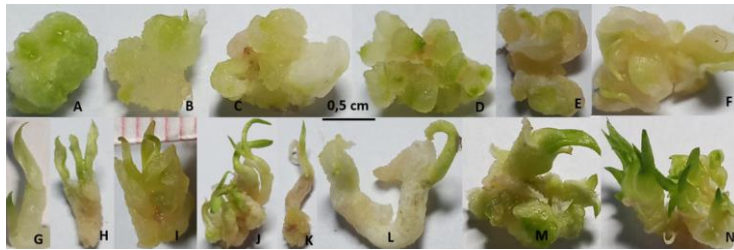
Sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mô sẹo còn sống khi được xử lý bằng DMS cao nhất đạt được là 73,62% (CT1). Tỷ lệ mẫu có mầm chồi phát triển ở công thức này là 53,32%, tuy nhiên số mẫu có biểu hiện hình thái khác so với đối chứng lại thấp chỉ đạt 4,43%. Công thức xử lý bằng DMS với nồng độ xử lý 50 ppm trong 4 giờ, có số mẫu biến dị hình thái lớn nhất đạt 14,93% (CT6). Các công thức thí nghiệm khác, tỷ lệ mẫu biến dị đều thấp hơn 14%, thậm chí công thức CT9, CT10, CT22 chỉ đạt 1,11% mẫu biến dị. Khi xử lý mô sẹo bằng DMS với nồng độ 400 ppm trở lên trong thời gian 6-10 giờ thì các mẫu đã bị chết 100% đến thời điểm 8 tuần sau xử lý. Các công thức CT14, CT15, CT19, CT24 và CT25 xử lý ở nồng độ 800 ppm trong 2 giờ cũng có kết quả tương tự. Ở thí nghiệm CT18 và CT23 đều ghi nhận có mẫu sống nhưng tỷ lệ rất thấp (1,11%), mẫu không phát triển mầm chồi và có màu úa vàng, mức tăng trưởng kém, kích thước mẫu chỉ đạt 0,52 cm và 0,51 cm. Kích thước của mô sẹo xử lý DMS còn sống sau 8 tuần nuôi cấy đạt được trong khoảng 0,51 – 0,86 cm, cao nhất ở công thức đối chứng (0,86 cm) và CT1 (0,85 cm) (bảng 1).

Gây đột biến bằng DMS được Mostafa (2015) sử dụng trên cây Xà cừ (*Khaya senegalensis*) để tạo ra các giống mới có đặc tính tốt hơn. Hạt cây Xà cừ ngâm trong dung dịch DMS (0, 1000, 2000, 3000, 4000 và 5000 ppm) trong 15 giờ. Kết quả cho thấy các nồng độ 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm đã cho những biến dị về số lượng cành lá, chiều cao cây, màu sắc và tốc độ tăng trưởng (Mostafa, 2015). Một nghiên cứu khác của Mostafa và Alhamd (2016) trên cây hoa Huỳnh liên (*Tecoma stans*), tiến hành ngâm hạt trong dung dịch DMS ở nồng độ 0, 200, 400, 600, 800 và 1000 ppm trong 15 giờ để tạo ra biến dị di truyền. Kết quả thử nghiệm cho thấy với các nồng độ thử nghiệm đều có những cây biến dị với các đặc điểm khác nhau về lá, hoa, màu sắc, kích thước cây và hoa (Mostafa, Alhamd, 2016). Một công bố khác của Victoria Vasko và Victor Kyrychenko (2016) trên cây hoa Hướng dương (*Helianthus annuus*), tác giả đã sử dụng DMS nồng độ 0,01 – 0,05% để xử lý hạt trong 18 giờ. Nghiên cứu cũng đã cho thấy DMS đã tác động làm thay đổi số lượng cánh hoa, màu sắc, kích thước cây của cây Hướng dương ở thế hệ 1 và 2 so với cây đối chứng (Vasko, Kyrychenko, 2016).

Như vậy, qua kết quả nghiên cứu này của chúng tôi và những công bố của các nhà khoa học trước đây có thể thấy được DMS là một chất có tác dụng mạnh lên giai đoạn sớm của phôi dẫn đến những biến đổi về hình thái sau đó và ở các thế hệ tiếp theo. Hóa chất này có thể được áp dụng trên nhiều đối tượng cây trồng, và có thể được xử lý ở các giai đoạn, protocorm, mô sẹo trong nuôi cấy *in-vitro*, hoặc được xử lý trực tiếp trên hạt.

Hình thái phát triển của mô sẹo sau khi xử lý hóa chất

Mô sẹo sau khi được xử lý bằng DMS sau thời gian nuôi cấy 3-4 tuần bắt đầu xuất hiện các hình thái khác với đối chứng. Biểu hiện đầu tiên đó là về màu sắc, màu xuất hiện như trắng (hình 1B, hình 1C), hơi vàng hoặc nâu (hình 1E, hình 1F) những mô sẹo này bắt đầu chết ở tuần thứ 4-5. Một số mô sẹo còn sống thì sinh trưởng có hình thành các phiến mỏng, màu trắng hơi xanh hoặc hơi vàng nâu bao bên ngoài. Các phiến này uốn lượn và gấp khúc, và nó không có khả năng phát triển thành chồi. Các mảng phiến mỏng này sẽ úa vàng, chết sau đó 1-2 tuần (hình 1E, hình 1F). Những mô sẹo còn sống thì khi phát triển thường có màu xanh, bắt đầu có lá mầm và lá mầm thường to, dày và ngắn hơn, có màu xanh lá đậm so với mẫu đối chứng (hình 1M, hình 1N), một số khác có hình thái lá mầm bị biến dạng nhiều, mầm không phát triển được (hình 1H, hình 1I, hình 1J, hình 1K, hình 1L).

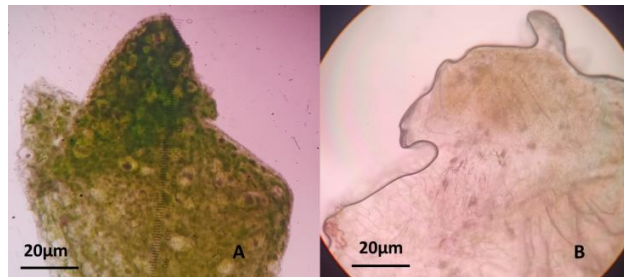


Hình 1. Một số hình dạng bất thường của mô sẹo và chồi sau khi xử lý DMS

A, G: Mẫu không xử lý hóa chất; B-F, H-N: Mẫu được xử lý bằng DMS.

Đặc điểm tế bào mô lá, thân và rễ

Thực hiện làm tiêu bản để quan sát đỉnh sinh trưởng, thân non, đầu rễ và biểu mô lá của các mẫu thí nghiệm. Đỉnh sinh trưởng ở mẫu đối chứng và xử lý DMS về hình thái đã có sự biến đổi khác nhau. Mẫu được xử lý DMS có đỉnh sinh trưởng hình dạng không ổn định, biến dạng nhiều vị trí, tế bào có xu hướng kéo dài, mật độ diệp lục thấp (hình 2B). Ngược lại, đỉnh sinh trưởng ở mẫu đối chứng có màu xanh đậm, tế bào xếp chặt chẽ với nhau, hình dạng tế bào tròn, và ổn định, ít có sự biến đổi hình dạng (hình 2A). Kết quả này cho thấy DMS đã ảnh hưởng tới sự sắp xếp tế bào, tới cấu trúc mô của đỉnh sinh trưởng lan Giả hạc tím Huế.



Hình 2. Đỉnh sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế được quan sát dưới kính hiển vi

A. Mẫu đối chứng không xử lý hóa chất; B. Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

Quan sát mặt cắt ngang phiến lá của 2 mẫu thí nghiệm (lá cây đối chứng và cây xử lý DMS) cho thấy ở mẫu lá của cây xử lý DMS không thấy rõ mạch dẫn, lá có màu xanh đậm, các tế bào có xu hướng kéo dài, phiến lá có bề dày $0,78 \pm 0,03$ mm (bảng 2, hình 3B). So với lá của cây đối chứng các lớp tế bào đều nhau, tế bào biểu bì hình dạng như nhau, dạng hình tròn, phiến lá mỏng dần về hai bên mép lá, có bề dày trung bình là $0,69 \pm 0,04$ mm, lượng diệp lục phân bố đều về hai bên mặt lá (bảng 2, hình 3A). Như vậy, DMS đã làm thay đổi hình thái tế bào, phân bố diệp lục trong lá, độ dày mỏng của phiến lá.



Hình 3. Mặt cắt ngang của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi (thước tỉ lệ 1 mm)

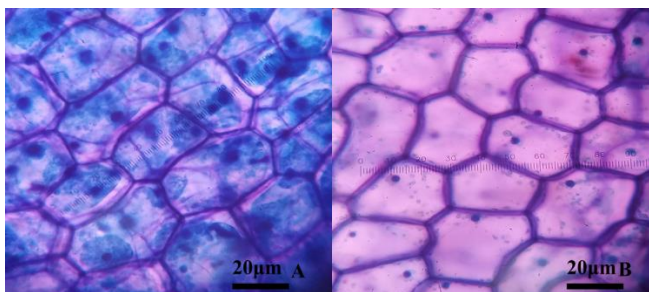
A: Lá đối chứng không xử lý hóa chất; B: Lá xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

Các tế bào biểu mô lá được quan sát từ mẫu được xử lý bằng DMS, có sự thay đổi lớn về hình dạng và trật tự sắp xếp, kích thước tế bào thì không thay đổi nhiều, có thành tế bào dày, nhân tế bào nhỏ so với đối chứng (Bảng 2, hình 4).

Bảng 2. Một số kích thước và số liệu tế bào

Mẫu thí nghiệm	Bó mạch dẫn trong thân non		Kích thước tế bào biểu mô		Đường kính nhân tế bào biểu mô lá (μm)	Chiều dày phiến lá (mm)	Lông hút của rễ	
	Số lượng (bó mạch/thân)	Đường kính (μm)	Chiều dài (μm)	Chiều rộng (μm)			Lông hút/ mm^2	Chiều dài (mm)
Đối chứng	21,27 \pm 0,21a	71,89 \pm 1,17a	28,62 \pm 1,14a	16,02 \pm 0,83a	3,84 \pm 0,20a	0,69 \pm 0,04b	252,47 \pm 10,90a	0,64 \pm 0,02a
DMS	19,33 \pm 0,13b	58,35 \pm 2,91b	27,60 \pm 1,25a	13,27 \pm 0,55b	2,95 \pm 0,12b	0,78 \pm 0,03a	247,13 \pm 10,16a	0,43 \pm 0,02b

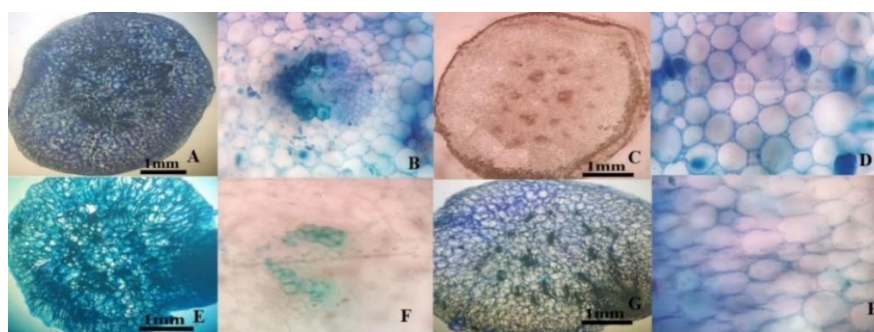
Các chữ cái khác nhau (a,b) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$, Duncan's test.



Hình 4. Tế bào biểu mô mặt dưới của lá lan Giả hạc tím Huế

A: Tế bào mẫu lá đối chứng không xử lý hóa chất; B: Tế bào mẫu lá xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

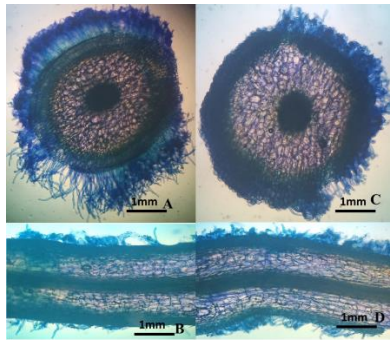
Giải phẫu phần thân non cho thấy rõ sự khác biệt giữa cây được xử lý DMS và cây đối chứng, số lượng bó mạch trong cấu trúc thân non của cây đối chứng trung bình 21,27 \pm 0,21 bó mạch/thân, dao động trong khoảng 20-22 bó mạch, sắp xếp thành nhiều vòng tròn từ ngoài vào trong đồng tâm, bó mạch tròn, kích thước tương đồng nhau và có đường kính 71,89 \pm 1,17 μm . Các tế bào xung quanh có hình tròn sắp xếp trật tự, kích thước tương đồng nhau (bảng 2, hình 5A, hình 5B, hình 5C, hình 5D). Mẫu chồi xử lý bằng DMS có số lượng bó mạch trong thân ít hơn đạt trung bình 19,33 \pm 0,13 bó mạch/thân, dao động trong khoảng 19-20 bó mạch, các bó mạch sắp xếp thưa, không đều nhau, bó mạch dẹp và có đường kính 58,35 \pm 2,91 μm , tế bào mô xung quanh có xu hướng thay đổi hình dạng nhiều, không đồng đều, lớp vỏ bao bên ngoài thân mỏng hơn so với đối chứng (bảng 2, hình 5E, hình 5F, hình 5G, hình 5H).



Hình 5. Hình thái giải phẫu mặt cắt ngang của thân chồi lan Giả hạc tím Huế

A, B, C, D: Mẫu thân chồi đối chứng; E, F, G, H: Mẫu thân chồi xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ;
A, E, C, G: Mặt cắt ngang; B, F: Bó mạch dẫn; D, H: Tế bào xung quanh mạch dẫn.

Quan sát hình thái giải phẫu của rễ ở 2 mẫu cây thí nghiệm (đối chứng và xử lý DMS) cũng thể hiện sự sai khác. Tuy nhiên mức độ sai khác ở rễ không nhiều, điểm sai khác chủ yếu tập trung vào hình thái và số lượng lông hút. Rễ cây đối chứng có lông hút phân bố đều, số lượng nhiều ở miền lông hút của rễ có mật độ 252,47 \pm 10,90 lông hút/ mm^2 , chiều dài đạt 0,64 \pm 0,02 mm (bảng 2, hình 6A, hình 6B). Cây xử lý DMS có rễ có kích thước to, lớp tế bào bao bên ngoài rất dày, rễ có lớp lông hút nhỏ, số lượng lông hút đạt 247,13 \pm 10,16 lông hút/ mm^2 về mặt thống kê không khác biệt so với đối chứng. Tuy nhiên, chiều dài chỉ đạt 0,43 \pm 0,02 mm, ngắn hơn rất nhiều so với đối chứng (bảng 2, hình 6C, hình 6D).



Hình 6. Hình giải phẫu rễ lan Già hạch tím Huế.

A, B: Mặt cắt ngang và dọc của rễ cây đối chứng;
C, D: Mặt cắt ngang và dọc của rễ cây xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

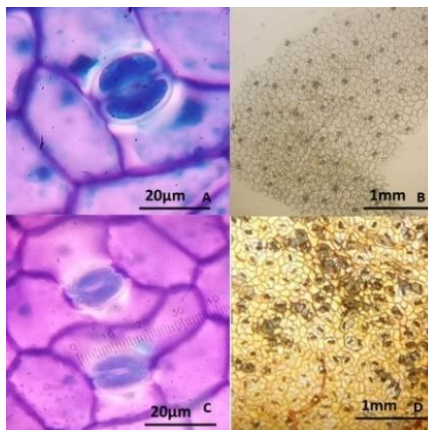
Đặc điểm tế bào khí khổng

Quan sát đặc điểm của khí khổng cho thấy chiều dài, chiều rộng, diện tích khí khổng và mật độ tế bào đạt lần lượt 14,84 μm ; 12,52 μm ; 158,82 μm^2 và 212,73 tế bào/ mm^2 . Kết quả này không có sự khác biệt so với mẫu đối chứng (bảng 3, hình 7). Điều này gợi ý rằng đột biến ít có ảnh hưởng tới đặc điểm tế bào khí khổng của lan.

Bảng 3. Đặc điểm của tế bào khí khổng trên biểu bì lá sau 3 tháng nuôi cấy

Mẫu	Tế bào khí khổng			
	Chiều dài (μm)	Chiều rộng (μm)	Diện tích (μm^2)	Mật độ tế bào/ mm^2
Cây đối chứng	15,79 \pm 0,56a	13,33 \pm 0,56a	168,66 \pm 13,29a	235,80 \pm 4,30a
Cây xử lý DMS	14,84 \pm 0,56a	12,52 \pm 0,54a	148,82 \pm 11,47a	212,73 \pm 3,90a

Các chữ cái khác nhau (a,b) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$, Duncan's test.



Hình 7. Hình thái khí khổng của lan Già hạch tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy chồi

A, B: Khí khổng ở lá cây đối chứng; C, D: Khí khổng ở lá cây xử lý DMS.

KẾT LUẬN

Xử lý mô sẹo bằng DMS với nồng độ 50 ppm, trong thời gian 4 giờ cho kết quả tỷ lệ mô sẹo biến đổi hình thái nhiều nhất đạt 14,93%. Nồng độ DMS và thời gian xử lý càng cao dẫn đến tỷ lệ sống của mô sẹo càng thấp. Tỷ lệ sống chỉ đạt từ 0 – 7,78% khi xử lý ở nồng độ lớn hơn 200 ppm. Các thay đổi của mô sẹo sau khi xử lý DMS chủ yếu là những thay đổi về hình thái, kích thước, màu sắc. Phân tích các chồi phát triển từ mô sẹo có biến đổi sau khi xử lý DMS, nhận thấy ở cấp độ tế bào có những thay đổi về hình dạng, trật tự sắp xếp, mật độ của các loại tế bào biểu mô lá, khí khổng, mạch dẫn.

Lời cảm ơn: Tất cả thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm Tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Kinh phí được phòng thí nghiệm hỗ trợ và từ nguồn học bổng VinIF. “Nguyễn Hữu Thọ được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thực sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.TS.121 ”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Huyền DD (2007). Tập 9: Họ Lan - Orchidaceae Juss. Chi hoàng thảo - *Dendrobium* Sw., *Thực vật chí Việt Nam (Flora of VietNam)*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 1–219.
- Khánh TC (2005). *Phương pháp nghiên cứu với kính hiển vi*. NXB Y học.
- Lawley PD (1974). Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis. In *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Elsevier, 23 (3).
- Mostafa GG (2015). Effect of some chemical mutagens on the growth, phytochemical composition and induction of mutations in *Khaya senegalensis*. *International Journal of Plant Breeding Genetics*, 9(2): 57–67. <https://doi.org/10.3923/ijpb.2015.57.67>
- Mostafa GG, Alhamd MFA (2016). Effect of Dimethyl Sulphate on the Growth, Induction of Mutations and Their Identification by Peroxidase Isozyme in *Tecoma stans*. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 10(2): 91–97. <https://doi.org/10.3923/ijpb.2016.91.97>
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.
- Sekhi YS, Hamad RM, Neamah SI (2022). Role of dimethyl sulfate on biochemical characteristics of fragaria ananassa duch under salinity stress in vitro. *The Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 53(1): 111–121.
- Singer B, Grunberger D (1983). Molecular biology of mutagens and carcinogens, 1st ed. *Plenum Publishing Corporation*, 233 Spring Street, New York, N.Y. 10013...
- Teixeira da Silva JA, Cardoso JC, Dobránszki J, Zeng S (2015). *Dendrobium* micropropagation: a review. In *Plant Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1754-4>
- Tho NH, Oanh NT, Phuong TTB, Cuc NTK (2024). *Dendrobium anosmum* Lindl. ‘Tim Hue’ and the method of vegetative propagation from the axillary node shoots of the stem (keikis). *Hội Nghị Khoa Học Quốc Gia Lần Thứ 6 về Nghiên Cứu và Giảng Dạy Sinh Học ở Việt Nam*, 908–915. <https://doi.org/DOI: 10.15625/vap.2024.0094>
- Tho NH, Oanh NT, Phuong TTB, Thanh P, Linh HK, Cuc NTK (2023). Conservation of *Dendrobium anosmum* Lindl. ‘Tim Hue’ by in vitro propagation. *Propagation of Ornamental Plants*, 23(2): 39–48.
- Vasko V, Kyrychenko V (2016). Variability of valuable economic traits in M1 and M2 sunflower generations influenced by dimethyl sulfate and γ -rays. *Žemės Ūkio Mokslai*, 23(4): 168–177.

RESEARCH ON THE EFFECT OF DIMETHYL SULFIDE (DMS) ON INDUCING VARIATION IN *DENDROBIUM ANOSMUM* LINDL 'TIM HUE' ORCHID

Nguyen Huu Tho^{1,4}, Nguyen Thi Oanh¹, La Thi Thu Hang³, Truong Thi Bich Phuong², Nguyen Thi Kim Cuc^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

²University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue City, Thua Thien Hue, Thua Thien Hue, Vietnam

³University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung street, Hue City, Vietnam

⁴College Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam, KV8, Bui Thi Xuan Ward, Quy Nhon city, Binh Dinh, Vietnam

SUMMARY

Chemical mutagenesis is one of the commonly used methods for plant breeding. In this study, we used Dimethyl sulfide (DMS) to induce mutations in the *Dendrobium anosmum* Lindl ‘Tim Hue’ to select morphotypes with high aesthetic and economic value. Treatment of *D. anosmum* ‘Tim Hue’ orchid callus with Dimethyl sulfide at concentrations of 0, 50, 100, 200, 400, and 800 ppm at different time points ranging from 2 to 10 hours. After 8 weeks of culture, the results showed that the highest survival rate of callus was 73.62% at a DMS concentration of 50 ppm for 2 hours. However, the number of samples exhibiting morphological differences compared to the control was only 4.43%. The experiment with the highest morphological variation rate (14.93%) was observed at a DMS concentration of 50 ppm for 4 hours. Initial changes in the callus after DMS treatment included alterations in morphology and color. The epithelial cells, stomata, and vascular systems of shoots grown from DMS-treated callus exhibited changes, mainly in shape and arrangement. Based on these results, we continued cultivating the mutated callus to develop complete plants, aiming to select various morphotypes for further breeding of *Dendrobium anosmum* Lindl ‘Tim Hue’ orchid.

Keywords: Variation, cellular structure, *Dendrobium anosmum* Lindl, Dimethyl sulfide (DMS), callus tissue, morphological changes.

* Author for correspondence: Tel: 0943112476; Email: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn