

KHẢO SÁT SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA ETHYL METHANE SULFONATE ĐẾN SỰ PHÁT SINH ĐỘT BIẾN Ở CÂY HOA CHUÔNG (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern)

Đặng Thị Phương Thảo, Ngô Minh Trí, Lâm Ngọc Kim Trúc, Trần Thị Mỹ Tiên, Nguyễn Bửu Thuận và Nguyễn Thị Pha*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Pha, Email: ntpha@ctu.edu.vn

Lịch sử bài báo

Ngày nhận: 18/11/2021; Ngày nhận chỉnh sửa: 19/01/2022; Duyệt đăng: 23/02/2022

Tóm tắt

Nghiên cứu sự ảnh hưởng của Ethyl methane sulfonate đến sự hình thành các đột biến ở cây hoa chuông (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern). Đoạn thân của hoa chuông *in vitro* được xử lý bằng EMS với 6 nồng độ khác nhau (0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; 1%) trong 1 giờ và 2 giờ. Kết quả cho thấy nồng độ EMS càng cao, thời gian xử lý mẫu càng dài thì tỷ lệ mẫu sống, phát sinh chồi càng giảm và càng xuất hiện nhiều hình thái khác hơn so với đối chứng. Trong đó, nồng độ EMS 0,8% trong thời gian 1 giờ và nồng độ EMS 0,2% trong 2 giờ cho kiểu hình cây con khác biệt so với đối chứng và có khả năng tái sinh cao. Vùng ITS của 02 nghiệm thức này được đọc trình tự ghi nhận 13 dấu SNPs (Single nucleotide polymorphism) trong đó xử lý EMS ở nồng độ 0,8% trong 1 giờ ghi nhận 12 dấu SNPs, và 0,2% trong 2 giờ ghi nhận 1 dấu SNP.

Từ khóa: Cây hoa chuông (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern), đột biến, EMS, trình tự ITS.

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

Dang Thi Phuong Thao, Ngo Minh Tri, Lam Ngoc Kim Truc, Tran Thi My Tien, Nguyen Bui Thuan, and Nguyen Thi Pha*

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University, Vietnam

*Corresponding author: Nguyen Thi Pha, Email: ntpha@ctu.edu.vn

Article history

Received: 18/11/2021; Received in revised form: 19/01/2022; Accepted: 23/02/2022

Abstract

This study was to evaluate the effect of Ethyl methane sulfonate on mutant formation in gloxinia (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern). Stem segments with axillary buds of *in vitro* gloxinia samples were treated with six different EMS concentrations (0%, 0.2%, 0.4%; 0.6%; 0.8%; 1%) for 1 hour and 2 hours. The results showed that, the higher EMS concentration, longer treatment time, the lower the survival rate, shoot regeneration rate and the more different morphologies appear compared to the control. Among these, EMS concentration of 0.8% for 1 hour and EMS concentration of 0.2% for 2 hours treatments showed a different phenotype of the seedlings compared with the control, and had a high regeneration ability. The ITS regions of these two treatments were sequenced to detect 13 SNPs (Single nucleotide polymorphism), in which EMS treatment at a concentration of 0.8% for 1 hour recorded 12 SNP markers, and 0.2% for 2 hours recorded 1 SNP marker.

Keywords: EMS, mutant, *Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern, sequencing ITS.

DOI: <https://doi.org/10.52714/dthu.11.2.2022.941>

Trích dẫn: Đặng, T. P. T., Ngô, M. T., Lâm, N. K. T., Trần, T. M. T., Nguyễn, B. T., & Nguyễn, T. P. (2022). Khảo sát sự ảnh hưởng của ethyl methane sulfonate đến sự phát sinh đột biến ở cây hoa chuông (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern). *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp*, 11(2), 74-79. <https://doi.org/10.52714/dthu.11.2.2022.941>.

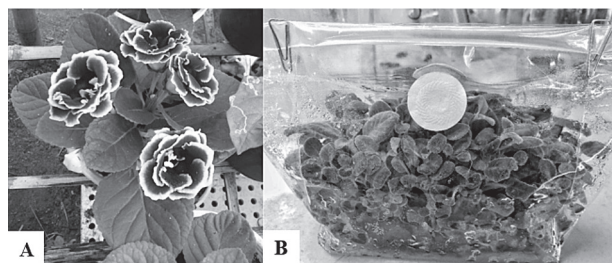
1. Đặt vấn đề

Cây hoa chuông tên khoa học là *Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern, là một loại cây thân thảo, có dạng thân củ sống lâu năm, có nguồn gốc từ Đông Nam Brazil (Zaitlin, 2012, tr. 1-17). Hoa chuông là một trong những giống hoa nhập nội có giá trị kinh tế cao, nhờ có những ưu điểm: đa dạng về màu sắc (tím, đỏ tươi, hồng thắm, hồng phớt...), kiểu dáng hoa (hoa cánh đơn, hoa cánh kép), nhiều hoa và thời gian ra hoa kéo dài (thời gian cây có hoa kéo dài hàng tháng) (Nguyễn & cs., 2004, tr. 239- 244). 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 (Vũ & Nguyễn, 2013, tr. 1092-1100), giúp giảm thiểu chi phí và thời gian chọn tạo giống cây trồng mới. Phương pháp xử lý đột biến *in vitro* bằng tác nhân hóa học và vật lý 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 (Vũ & Nguyễn, 2013, tr. 1092-1100) EMS (Ethyl methane sulfonate) có công thức $CH_3SO_3C_2H_5$, là một trong những chất hóa học được biết đến với khả năng gây đột biến ở nấm, thực vật, côn trùng và tế bào người (Amini, 2014, tr. 522-524). EMS 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, cụ thể là bằng cách alkyl hóa guanine (Sarmiento & cs., 2011, tr. 43-73). EMS có thể được áp dụng trong mẫu cây *in vitro* của nhiều loài và có thể được xử lý đồng nhất cho các tế bào (Amini, 2014, tr. 522-524). Nghiên cứu này được thực hiện để làm rõ tác động phát sinh đột biến của việc xử lý EMS trên cây hoa chuông (*Sinningia speciosa* (G. Lodd.) Hiern) để tìm kiếm phương pháp hữu hiệu và nồng độ EMS thích hợp cho việc tạo ra các dạng đột biến mới phục vụ cho công tác chọn tạo giống cây hoa chuông mới tại Việt Nam.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp

Vật liệu: Mẫu hoa chuông *in vitro* được mua tại Công ty cổ phần Dược và Trang thiết bị y tế Bình Định (BIDIPHAR), có hoa màu tím và viền trắng, dạng lá đối xứng. Đoạn thân được sử dụng để làm vật liệu nuôi cấy khởi đầu.



Hình 1. Mẫu cây mẹ và túi mô hoa chuông *in vitro* được sử dụng trong nghiên cứu (A: Mẫu cây mẹ; B: túi mô hoa chuông *in vitro*)

Hóa chất: Môi trường nuôi cấy cơ bản MS (Murashige and Skoog) + 3% sucrose + 7% agar, pH (5,7-5,8). Một số hóa chất khác như: α -Naphthaleneacetic acid (NAA), 6-Benzylaminopurine (BAP), EMS (Sigma Aldrich), cặp mồi ITS1/ITS4 (ITS1: 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3', ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White & cs., 1990, tr. 317), các hóa chất thực hiện ly trích DNA và thực hiện phản ứng PCR.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm 1: Khảo sát nồng độ và thời gian xử lý EMS đến khả năng tái sinh ở chồi

Đoạn thân hoa chuông *in vitro* được ngâm trong EMS ở 6 nồng độ khác nhau (0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; 1%) trong 1 giờ và 2 giờ để khảo sát đến sự tái sinh ở chồi. Sau khi xử lý, các mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng và cấy vào môi trường tái sinh chồi (MS + 0,5 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA) (Nguyễn & cs., 2004, tr. 239-244) ghi nhận số chồi tái sinh sau 30 ngày (mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu). Chồi tái sinh ở thời điểm 30 ngày được tiếp tục cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi (MS + 2,0 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA) và ghi nhận số chồi và hình thái chồi ở thời điểm 60 ngày, 90 ngày và 120 ngày. Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Thí nghiệm 2: Xác định dấu SNPs của vùng ITS các mẫu tái sinh sau khi xử lý EMS

Các mẫu chồi tái sinh và có khác biệt về hình thái so với đối chứng thu được ở nội dung 1 được sử dụng để ly trích DNA tổng số theo quy trình CTAB được mô tả bởi Rogers & Bendich (1988, tr. 1-10) có hiệu chỉnh (Trần, 2011) và kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 0,8%. Phản ứng khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1/ITS4 có tổng thể tích

một phản ứng là 25 µl, bao gồm: 15,75 µl: Nước cất 2 lần tiệt trùng, 5 µl: Master buffer (5X), 1,0 µl mỗi ITS1 (10 pmol), 1,0 µl mỗi ITS4 (10 pmol), 0,25 µl: *Taq* polymerase (5 unit/µl), 2 µl DNA khuôn (~50 ng). Chu kỳ nhiệt: 94°C: 5 phút; lặp lại 35 chu kỳ: 94°C: 30 giây, 54°C: 30 giây, 72°C: 45 giây và kết thúc bằng 72°C: 7 phút. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% ở hiệu điện thế 25V, trong thời gian 60 phút. Sản phẩm PCR rõ nét được đọc trình tự tại Công ty First BASE Laboratories, Malaysia. Chọn vùng tín hiệu ổn định trên giản đồ bằng phần mềm BioEdit, tiến hành phân tích tìm ra các dấu SNPs trên vùng trình tự ITS để xác định sự ảnh hưởng của EMS đến sự phát sinh biến dị trên cây hoa chuông.

Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu thu được ở các thí nghiệm sẽ được phân tích bằng phần mềm Minitab 16 và phân tích trình tự bằng phần mềm Bioedit.

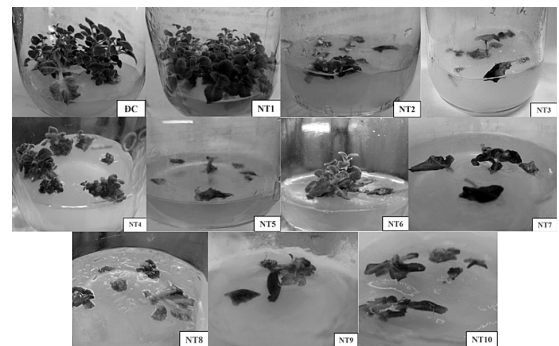
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của Ethyl methane sulfonate đến khả năng tái sinh ở chồi

Từ kết quả ở Bảng 1 và Hình 2 cho thấy: Sau 30 ngày khảo sát, có 6/10 NT (thí nghiệm) có chồi tái sinh với số chồi nhiều nhất ở NT xử lý EMS nồng độ 0,2% trong 1 giờ đạt 97 chồi tương đương với đối chứng không xử lý EMS (93 chồi) điều này cho thấy nồng độ 0,2% EMS trong 1 giờ chưa ảnh hưởng đến quá trình tái sinh chồi của mẫu cây. Kết quả xử lý EMS ở nồng độ 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; 1% trong thời gian 1 giờ cho thấy: Số chồi tái sinh bị ảnh hưởng khi tăng nồng độ tuy nhiên số cây tái sinh thu được chưa theo một quy luật nhất định với nồng độ cụ thể ở nồng độ 0,4% EMS số chồi thu được là 7 chồi, nồng độ 0,6% không thu được chồi tái sinh, tuy nhiên ở nồng độ 0,8% số chồi tái sinh tăng cao với 66 chồi và giảm còn 3 chồi ở thí nghiệm bổ sung 1,0% EMS. Kết quả xử lý EMS thời gian 2 giờ cũng thu được tương tự như các mẫu xử lý EMS trong 1 giờ, nhưng số lượng chồi tái sinh giảm đi một cách đáng kể: NT bổ sung 0,2% EMS có số chồi nhiều nhất là 6 chồi, không thu được chồi ở 2 nồng độ là 0,4 và 0,6% EMS nhưng lại thu được 2 chồi ở nồng độ 0,8% và khi tăng lên 1,0% thì không có chồi được hình thành.

Bảng 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của EMS đến sự tái sinh chồi sau 30 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Thời gian xử lý (giờ)	Nồng độ EMS (%)	Tổng số mẫu/ Nghiệm thức	Tổng số chồi/ Nghiệm thức
ĐC	0 giờ	0	15	93
NT1	1 giờ	0,2	15	97
NT2		0,4	15	7
NT3		0,6	15	0
NT4		0,8	15	66
NT5		1,0	15	3
NT6	2 giờ	0,2	15	4
NT7		0,4	15	0
NT8		0,6	15	0
NT9		0,8	15	2
NT10		1,0	15	0



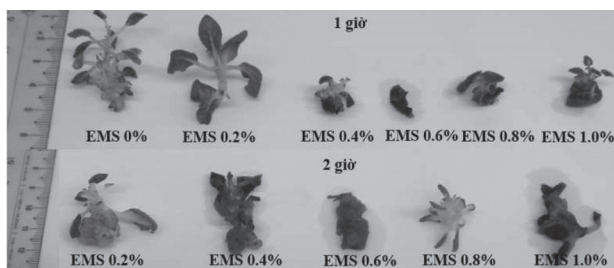
Hình 2. Chồi tái sinh sau 30 ngày nuôi cấy

Đối với việc xử lý gây đột biến, quan sát hình thái chồi có ý nghĩa quan trọng giúp nhận biết sự khác biệt về kiểu hình từ đó có thể lựa chọn nồng độ chất gây đột biến phù hợp. Nhìn chung, ở thời điểm 30 ngày kích thích chồi khá nhỏ vì thế chưa ghi nhận sự khác biệt rõ về hình thái. Để khảo sát hình thái chồi tốt hơn, chồi 30 ngày tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường MS cơ bản bổ sung 2,0 mg/L BAP và 0,2 mg/L NAA. Kết quả quan sát hình thái của các chồi ở thời điểm 60 và 90 ngày được mô tả trong Bảng 3, Hình 3 và Hình 4. Nhìn chung ở thời điểm 60 và 90 ngày quan sát, các thí nghiệm có sự khác biệt về hình thái chồi so với đối chứng. Đối chứng có chồi cao, lá to, lá màu xanh đậm. Ngoại trừ thí nghiệm xử lý với EMS 0,2% các NT còn lại nồng độ từ 0,4%-1% EMS có sự khác biệt về mặt hình thái so với đối chứng như: chồi thấp, phiến lá xoắn, xuất hiện nốt trên thân... (Hình 3 và Hình 4).

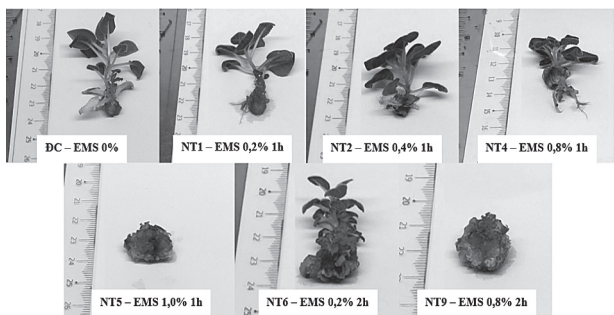
Bảng 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của EMS đến hình thái chồi sau 60 và 90 ngày nuôi cấy

Thí nghiệm	Thời gian xử lý (giờ)	Nồng độ EMS (%)	Hình thái chồi	
			Sau 60 ngày nuôi cấy	Sau 90 ngày nuôi cấy
ĐC	0 giờ	0	Chồi cao, lá to, lá màu xanh đậm	Chồi cao, lá to màu xanh đậm, rễ ít, ngắn
NT1	1 giờ	0,2	Chồi cao, lá to, phiến lá xoắn, lá có màu xanh đậm	Chồi cao, lá to, phiến lá xoắn màu xanh nhạt, dưới thân có nốt màu xanh, rễ ít, ngắn
NT2		0,4	Chồi thấp, lá to, phiến lá xoắn, lá có màu xanh đậm	Chồi thấp, lá to, phiến lá xoắn màu xanh nhạt, rễ ít, ngắn
NT3		0,6	-	-
NT4		0,8	Chồi thấp, lá to, phiến lá xoắn, lá có màu xanh đậm	Chồi thấp, lá to, phiến lá xoắn màu xanh nhạt, dưới thân có nốt màu xanh, rễ nhiều, dài
NT5		1,0	Chồi thấp, lá nhỏ, lá có màu xanh nhạt	Chồi thấp, lá nhỏ, lá và sẹo màu xanh nhạt
NT6	2 giờ	0,2	Chồi thấp, lá to, phiến lá xoắn, phần cuống lá dính lại với nhau bao quanh thân, lá có màu xanh nhạt	Chồi thấp, lá to, phiến lá xoắn màu xanh nhạt
NT7		0,4	-	-
NT8		0,6	-	-
NT9		0,8	Chồi thấp, lá nhỏ, phiến lá xoắn, các lá dày phần cuống lá dính lại với nhau bao quanh thân, lá có màu xanh rất nhạt	Chồi thấp, lá nhỏ, phiến lá xoắn màu xanh rất nhạt
NT10		1,0	-	-

Ghi chú: “-” biểu thị mẫu khảo sát của thí nghiệm không thu được kết quả.



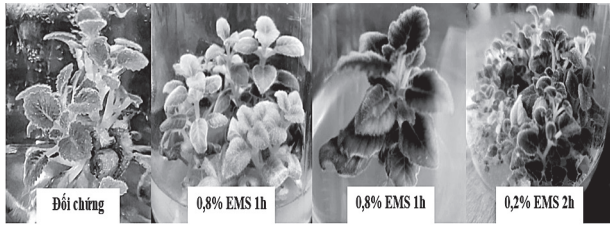
Hình 3. Mẫu chồi khảo sát thời điểm 60 ngày nuôi cấy



Hình 4. Mẫu chồi khảo sát thời điểm 90 ngày nuôi cấy

Quan sát chồi ở 120 ngày cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về màu sắc lá ở một số thí nghiệm. Cụ thể, ở thí nghiệm xử lý 0,2% EMS trong 2 giờ chồi có màu trắng, hồng, toàn phần hoặc một phần. Thí nghiệm xử lý 0,8% EMS trong 1h chồi xuất hiện 2 kiểu hình khác biệt, chồi có màu hồng đậm hơn so với thí nghiệm 0,2% EMS 2 giờ và chồi có màu cam toàn phần hoặc 1 phần. Sự khác biệt về kiểu hình màu trên phiến lá trên hoa chuông khi nuôi cấy trên cùng điều kiện *in vitro*, chứng tỏ có sự thay đổi trong vật chất di truyền của các mẫu hoa chuông sau khi xử lý đột biến bằng tác nhân EMS, dẫn đến sự thay đổi các protein sắc tố, tạo nên sự đa dạng về màu sắc trên thân và phiến lá của cây. EMS là hóa chất thường được dùng để xử lý, tạo đột biến nhằm kích thích, tìm ra đặc tính mới trên cây trồng (Altindal & Altindal, 2018). Từ kết quả của nghiên cứu này, cho thấy EMS là hóa chất thích hợp ứng dụng trong chọn và tạo giống trên hoa chuông. Kết

quả này tương tự các nghiên cứu của Vũ & Nguyễn (2013, tr. 1092-1100) trên cây cẩm chướng; Senapati & Rout (2008, tr. 218-222) trên cây hoa hồng; Devi & Mullainathan (2011, tr. 368-374) trên cây ớt.



Hình 5. Mẫu chồi xử lý EMS sau 120 ngày nuôi cấy
3.2. Xác định dấu NSPs của vùng ITS các mẫu tái sinh sau khi xử lý EMS

	410	420	430	440	450
Doi_Chung
EMS_NT4_(1h/0,8%)	TTCCCTTTGCA	AAAGTGGGTC	GAGTTGAGGG	GGCGGACATP	GGCCTCCTGT
EMS_NT6_(2h/0,2%)C.....
	460	470	480	490	500
Doi_Chung
EMS_NT4_(1h/0,8%)	GCTGTTCTTG	TGCGGCTGGC	CTAGATGTGA	TTCCTCATCG	ACAGATGTCA
EMS_NT6_(2h/0,2%)A.....
	510	520	530	540	550
Doi_Chung
EMS_NT4_(1h/0,8%)	CCACTAGCGG	TGGCTGGACC	CTTTCGGCGC	TGGAGTGACA	ATACTTGTCT
EMS_NT6_(2h/0,2%)	.G.....T..	...T.....	AA.....T..	..TT....G..	.AT.....

Hình 6. Vị trí các SNPs xuất hiện khi so sánh các dãy trình tự xử lý EMS so với mẫu đối chứng: A: Adenine; T: Thymine; G: Guanin; C: Cytosine; "." biểu thị vị trí không xuất hiện vị trí SNPs. Dấu "-" biểu thị nghiệm thức không ghi nhận được nucleotide

Từ kết quả xử lý EMS ở các nồng độ và thời gian khác nhau ghi nhận 6 NT có chồi tái sinh (các NT: 0,2; 0,4; 0,8 và 1,0% EMS trong 1 giờ và 0,2; 0,8% EMS trong 2 giờ), trong đó có 2 NT có hình thái chồi khác biệt nhiều nhất so với ĐC và có sức sống tốt là NT 0,8% EMS 1h và NT 0,2% EMS 2h (Hình 5). Các mẫu chồi tái sinh ở 2 NT trên được ly trích DNA và đọc trình tự vùng ITS cùng với mẫu đối chứng. Kết quả có 13 dấu SNPs được ghi nhận, gồm 12 SNPs xuất hiện ở mẫu xử lý EMS nồng độ 0,8% trong 1 giờ bao gồm các vị trí nucleotide số: 474, 501, 508, 514, 521, 522, 528, 533, 534, 542 và 543 và 1 SNPs ở mẫu xử lý EMS 0,2% trong 2 giờ tại vị trí 424 bp (Hình 5). EMS được nhiều báo cáo cho thấy khả năng làm phát sinh đột biến trong quá trình nuôi cấy mô (Jabeen & Mirza, 2004, tr. 340-345; Senapati & Rout, 2008, tr. 218-222), kết quả xử lý đột biến trong đề tài này một lần nữa

khẳng định tác dụng gây biến dị của hóa chất EMS qua việc ghi nhận sự xuất hiện của các dấu SNPs ở vùng bảo tồn ITS.

4. Kết luận

Xử lý đoạn thân với thời gian (1 và 2 giờ) và nồng độ EMS từ 0,2% đến 1,0% cho thấy, nồng độ EMS càng cao, thời gian xử lý mẫu càng dài thì tỷ lệ mẫu sống, phát sinh chồi càng giảm. Quan sát hình thái ghi nhận 02 NT tạo được kiểu hình khác biệt so với đối chứng và có sức sống tốt là NT 0,8% EMS trong 1 giờ và 0,2% EMS trong 2 giờ. Phân tích trình tự vùng ITS chồi từ 2 NT này đã phát hiện 13 dấu SNPs, trong đó, mẫu xử lý EMS 0,8% trong 1 giờ cho 12 SNPs ở vị trí (474, 501, 508, 514, 521, 522, 528, 533, 534, 542, 543) và EMS 0,2% trong 2 giờ có 1 SNPs ở vị trí 424. Từ kết quả nghiên cứu dựa trên hóa chất EMS đã khảo sát, xử lý mẫu cây với EMS 0,8% trong thời gian 1 giờ là phù hợp để cảm ứng đột biến mẫu cây cây hoa chuông với 12 dấu SNPs ghi nhận là cơ sở cho thấy triển vọng việc làm thay đổi kiểu gen của mẫu xử lý EMS so với đối chứng làm cơ sở cho việc chọn tạo giống mới.

Tài liệu tham khảo

Altindal, D., & Altindal, N. (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*, 8(4), 351-359.

Amini, M. (2014). Ethyl Methanesulphonate. In Philip Wexler (Editor), *Encyclopedia of Toxicology*, (522-524). Academic Press.

Devi, A. S., & Mullainathan, L.(2011). Genotoxicity effect of ethyl methanesulphonate on root tip cells of chilli (*Capsicum annum* L.). *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(4), 368-374.

Jabeen, N., & Mirza, B. (2004). Ethyl methanesulphonate induces morphological mutations in *Capsicum annum*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 6(2), 340-345.

Nguyễn, Q. T., Vũ, N. L., Nguyễn, X. T., Nguyễn, C. H., & Nguyễn, T. L. A. (2004). Nghiên cứu nhân nhanh cây hoa chuông (*Sinningia speciosa*). *Tap chí Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp*, 4, 239-244.

- Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, A6, 1-10.
- Sarmiento, F. B., Leigh, J. A., & Whitman, W. B. (2011). Chapter three-Genetic Systems for Hydrogenotrophic Methanogens. *Methods in Enzymology*, 494, 43-73.
- Senapati, S. K., & Rout, G. R. (2008). In vitro mutagenesis of rose with ethylmethanesulphonate (EMS) and early selection using RAPD markers. *Advances in Horticultural Science*, 22(3), 218-222.
- Trần, N. D. (2011). Sổ tay thực hành Sinh học phân tử. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. 169 trang.
- Vũ, H. H., & Nguyễn, T. L. A. (2013). 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.). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(8), 1092-1100.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *Academic Press*, 38, 317.
- Zaitlin, D. (2012). Intraspecific diversity in *Sinningia speciosa* (Gesneriaceae: Sinningieae), and possible origins of the cultivated florist's gloxinia. *AoB Plants*, pls039, 1-17.