

## BUƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* MỘT SỐ GIỐNG HỒ TIÊU (*PIPER NIGRUM* L.) SẠCH VIRUT

ĐOÀN THỊ ÁI THUYỀN, THÁI XUÂN DU, ĐỖ ĐĂNG GIÁP

*Viện Sinh học nhiệt đới*

NGUYỄN TĂNG TÔN

*Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam*

Trong những năm gần đây, việc tăng diện tích trồng hồ tiêu ở các địa phương đã dẫn tới tình trạng cây hồ tiêu bị bệnh, trong đó có bệnh do virus gây ra. Kết quả điều tra tình hình bệnh virus ở hồ tiêu tại một số tỉnh miền Đông Nam Bộ cho thấy có 42-93% vườn hồ tiêu có triệu chứng nhiễm virus biểu hiện trên lá và cây như đốm hoa lá, nhăn phiến lá, xoắn mép lá, tóp ngọn, cây lùn dị dạng,... [3, 6]. Virus được phát hiện trong mẫu lá hồ tiêu là các virus **ToMV** (tobacco mosaic virus), **PVX** (potato virus X), **PVY** (potato virus Y) và **CMV** (cucumber mosaic virus) [2, 3].

Đã có một số công trình nghiên cứu nhân giống cây hồ tiêu kháng bệnh *Phytophthora* bằng kỹ thuật tái sinh chồi từ nuôi cấy rễ, đoạn thân, cuống và mảnh lá của cây *Piper columbrinum* L.; hoặc tái sinh cây từ phôi soma, đỉnh sinh trưởng của *Piper nigrum* cv. Karimunda, Panniyur-1; hoặc từ nuôi cấy mô sẹo của *Piper longum* L. [1, 4, 5, 7] nhưng chưa có công trình nghiên cứu ở Việt Nam về nhân giống cây hồ tiêu sạch virus.

Nội dung chính của bài báo này là nghiên cứu khả năng loại bỏ mầm bệnh nội sinh trong mẫu cấy hồ tiêu bởi sử dụng một số chất kháng sinh; ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự hình thành chồi, tái sinh chồi, cây từ mô sẹo ở các đốt cấy cũng như sử dụng kỹ thuật ELISA để xác định giống sạch virus trong nhân giống *in vitro* một số giống hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) được trồng ở các tỉnh miền Nam Việt Nam.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các giống hồ tiêu được nghiên cứu là các

giống được trồng phổ biến tại các tỉnh miền Đông Nam Bộ do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam cung cấp, gồm các giống: Vinh Linh (Việt Nam); Lada Belangtoeng (Indônêxia); Karimunda (Ấn Độ).

Cây hồ tiêu được trồng trong bầu đất tại vườn ươm của Viện Sinh học nhiệt đới. Sau 2-3 tuần, cây ra chồi non. Cắt các chồi có chiều dài từ 2-3cm và các cành có từ 5-6 đốt. Các chồi được rửa sạch và sát trùng bằng cồn 70<sup>0</sup>. Mẫu cấy được khử trùng bề mặt bằng dung dịch tẩy javel khoảng 30-40 phút hoặc 0,1% HgCl<sub>2</sub>-10 phút hoặc kết hợp với sử dụng chất kháng sinh 0,5% xefotaxin từ 1-24 giờ.

Các chồi non vô trùng được nuôi cấy trên môi trường Murashige and Skoog, 1962 (MS) có bổ sung 6-benzylaminopurin-BA (0-5,0 mg/l), indole-3-butyric axit-IBA (0-1,0 mg/l) hoặc thidiazuron-TDZ (0-0,22 mg/l) để tạo chồi. Để nghiên cứu sự tái sinh chồi từ mô sẹo, chúng tôi bổ sung BA (0-10 mg/l), IBA (0,5 mg/l) và kinetin (0,5 mg/l) vào môi trường nuôi cấy.

Đối với môi trường tạo rễ, chúng tôi sử dụng các chồi lớn dài 3-4cm có từ 2-3 cặp lá cấy trên môi trường MS có khoáng đa lượng giảm một nửa và bổ sung axit-1-naphthalen axêtic NAA (0,2-0,5 mg/l) hoặc than hoạt tính.

Tất cả các mẫu cấy được đặt trong điều kiện phòng nuôi cấy ở nhiệt độ 27°C-29°C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng: 12-14 giờ/ngày.

Để kiểm tra mẫu sạch virus, các giống hồ tiêu được giám định bằng kỹ thuật ELISA trước và sau khi nuôi cấy *in vitro* đối với các loại virus ToMV, PVX, PVY và CMV.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Sử dụng chất kháng sinh trong quá trình khử trùng mẫu cấy

Hồ tiêu là một cây lâu năm, có nhiều mầm bệnh nội sinh như nấm, khuẩn nằm bên trong mô. Bởi vậy, một trong những vấn đề quan trọng đầu tiên cần giải quyết trong nuôi cấy *in vitro* hồ tiêu là phải loại bỏ hoàn toàn mầm bệnh nội sinh đó. Các phương pháp khử trùng bề mặt thông thường đều không thành công trong việc khử trùng cây hồ tiêu.

Nguyên liệu ban đầu là các chồi mới hình thành của cây giống được trồng cách ly trong nhà lưới và phun thuốc trừ nấm bệnh, đã qua kiểm tra virut.

Qua thực nghiệm cho thấy các mẫu qua xử lý ngay cả khi sử dụng các chất có khả năng diệt mầm bệnh bề mặt cao như 0,1-1% $\text{HgCl}_2$  (từ 5-10 phút), mẫu cấy vẫn bị nhiễm trở lại sau một thời gian nuôi cấy. Do đó, nếu chỉ sử dụng các chất khử trùng bề mặt như nước tẩy javel hoặc  $\text{HgCl}_2$ , đều không cho kết quả khả quan; toàn bộ mẫu sẽ bị nhiễm sau một thời gian dài nuôi cấy.

Để mẫu được vô trùng hoàn toàn, chúng tôi đã kết hợp sử dụng một số chất kháng sinh như: penicillin, streptomycin và xefotaxin. Trong đó, xefotaxin vừa có tác dụng diệt khuẩn, nấm bên ngoài và vừa diệt được các mầm bệnh nội sinh trong mẫu cấy.

Các bước khử trùng mẫu cấy lần lượt được thực hiện như sau: mẫu sau khi sát trùng bằng cồn 70%, được xử lý trong nước tẩy javel (10%)-15 phút. Sau đó ngâm trong dung dịch 0,1%  $\text{HgCl}_2$ -10 phút. Bước kế tiếp là lắc trong dung dịch 0,5% xefotaxin trên máy lắc từ 1-24 giờ. Sau mỗi bước, mẫu đều được rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng.

Tuy nhiên, các mẫu đã qua khử trùng sau 20-45 ngày vẫn có thể bị tái nhiễm trở lại tại những vị trí tiếp xúc với môi trường nuôi cấy do mầm bệnh nội sinh còn trong mẫu.

Để làm giảm sự tái nhiễm khuẩn mẫu cấy, chúng tôi bổ sung 0,5% xefotaxin trong môi trường nuôi cấy ban đầu. Sau đó, cấy truyền mẫu qua môi trường không có chất kháng sinh để tạo chồi mới. Như vậy, mẫu là những chồi non phát sinh từ mẫu vô trùng và không có khả năng tái nhiễm trở lại.

Với phương pháp khử trùng mẫu trên, chúng

tôi có thể nhận được 25-30% số mẫu sạch hoàn toàn mầm bệnh nội sinh.

### 2. Ảnh hưởng của vị trí đốt cấy và các chất điều hoà sinh trưởng thực vật (ĐHSTTV) lên khả năng hình thành chồi hồ tiêu

Sau khi được vô trùng 20 ngày, các đốt hồ tiêu bắt đầu đâm chồi mới. Chồi dài 5-6cm được cắt thành các đốt dài khoảng 2cm. Mỗi đốt mang một cặp lá được cấy trên môi trường MS có bổ sung các chất ĐHSTTV khác nhau. Sau 3-4 tuần nuôi cấy, từ nách lá xuất hiện chồi mới.

Qua theo dõi ảnh hưởng của vị trí đốt cấy lên khả năng hình thành chồi, chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt rõ rệt về khả năng này ở các loại đốt. Ở đốt ngọn, hầu như không xuất hiện chồi mới, ngay cả ở nồng độ BA cao (5 mg/l). Đốt giữa và đốt gốc dễ dàng tạo chồi mới hơn, số chồi mới hình thành có thể tới 4-6 chồi/đốt (bảng 1). Trong đó, sự tạo chồi mới ở đốt gốc là nhiều hơn so với đốt ngọn và đốt giữa.

Khi nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp các chất ĐHSTTV, chúng tôi nhận thấy, ở các môi trường chỉ bổ sung BA, khả năng tạo chồi thấp ở tất cả các đốt cấy. Thậm chí với nồng độ BA cao (> 5 mg/l) hoặc TDZ ở nồng độ 0,02-0,22 mg/l, chồi hình thành cũng ít hơn so với công thức có bổ sung NAA hoặc IBA. Không phải nồng độ xytokinin và auxin cao quyết định sự tạo chồi ở mẫu cấy mà là tỷ lệ thích hợp giữa xytokinin/auxin sẽ làm tăng khả năng tạo chồi ở hồ tiêu. Trong các thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy ở nồng độ BA = 2 mg/l, IBA = 0,5 mg/l số chồi được hình thành ở đốt giữa và đốt gốc cao nhất. Điều này chứng tỏ, khi bổ sung một lượng xytokinin và auxin thích hợp, sẽ làm tăng rõ rệt số chồi hình thành ở đốt cấy. Khi bổ sung thêm NAA hoặc IBA trong môi trường tạo chồi với nồng độ 0,5-1,0 mg/l làm tăng khả năng hình thành mô sẹo ở các gốc cấy. Ở nồng độ auxin (NAA, IBA) cao ( $\geq 1,0$  mg/l), mô sẹo càng nhiều và ức chế sự hình thành chồi của mẫu cấy (bảng 1). Tuy nhiên, chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt về tính chất ở các mô sẹo hình thành từ ở hai loại auxin này, mô sẹo hình thành từ môi trường có IBA có màu vàng nhạt, cứng và dễ phát sinh chồi bất định hơn so với mô sẹo được hình thành trong môi trường bổ sung NAA có màu trắng, xốp.

Khả năng tạo chồi từ đốt cây ở các nghiệm thức

Xytokinin (mg/l)	Auxin (mg/l)	TDZ (mg/l)	Số lượng chồi và mức độ mô sẹo hình thành						
			Đốt ngọn		Đốt giữa		Đốt gốc		
			Chồi	Mô sẹo	Chồi	Mô sẹo	Chồi	Mô sẹo	
<b>BA</b>	<b>IBA</b>								
2,0	0		1	-	1-2	-	2	-	
<b>2,0</b>	<b>0,5</b>		<b>1-2</b>	-	<b>4-5</b>	+	<b>5-6</b>	++	
2,0	1,0		1	-	2	+	2-3	+++	
5,0	0		1	-	2	-	2	-	
5,0	0,5		1	+	2	+	2	+	
5,0	1,0		1	+	2	-	-	+++	
	<b>NAA</b>								
2,0	0,25		1	+	1	+	2	+	
2,0	0,5		1	++	1-2	++	0-1	++	
2,0	0,1		1	++	0	+++	0	+++	
		0,02	1	-	1-2	-	2-3	-	
		0,20	1	-	2-3	-	3-4	-	

Ghi chú: Mức độ hình thành mô sẹo: -: không hình thành; +: ít; ++: trung bình; +++: nhiều.

### 3. Ảnh hưởng của các chất ĐHSTTV lên khả năng biệt hoá chồi từ mô sẹo

Các mô sẹo hình thành từ nuôi cấy đốt thân được dùng làm nguyên liệu cho nghiên cứu khả năng biệt hoá chồi từ mô sẹo của cây hồ tiêu.

Qua các thí nghiệm biệt hoá chồi từ mô sẹo, chúng tôi nhận thấy tính chất của mô sẹo có phản ứng khác nhau đối với các chất ĐHSTTV trên cây hồ tiêu.

Môi trường MS có bổ sung BA (5 mg/l), Kin (0,5 mg/l) và IBA (0,5 mg/l) thích hợp nhất cho khả năng biệt hoá chồi từ mô sẹo. Ở tổ hợp môi trường này, tỷ lệ mô sẹo tạo chồi và số chồi trên một mẫu cấy lớn nhất (10,3 chồi/mẫu).

Môi trường với nồng độ BA cao (>5 mg/l) hoặc bổ sung TDZ đều gây ức chế khả năng biệt hoá chồi từ mô sẹo; một số chồi được hình thành nhưng tỷ lệ chồi bị dị dạng rất lớn và chồi kém phát triển khi cấy truyền qua môi trường tạo cây

con hoàn chỉnh (bảng 2).

### 4. Tạo rễ

Trong các thực nghiệm tạo rễ cho cây hồ tiêu, chúng tôi sử dụng môi trường 1/2 MS có bổ sung NAA (0,1-1,0 mg/l) hoặc IBA (0,5-1,0 mg/l). Ở những thí nghiệm có bổ sung NAA, sau 15 ngày nuôi cấy cho thấy: trong môi trường có nồng độ NAA thấp (0,1-0,2 mg/l) rễ hình thành khoảng 2-3 rễ/chồi; với những nồng độ NAA cao hơn (0,5-1,0 mg/l) số rễ hình thành rất nhiều, từ 10-15 rễ/chồi, tuy nhiên rễ thường rất ngắn, kém phát triển và ở dưới gốc chồi hình thành các khối mô sẹo. Nồng độ NAA càng cao, khối mô sẹo càng nhiều và gây ức chế sự phát triển của rễ. Đối với môi trường có IBA, sự tạo rễ cũng xảy ra, tuy số lượng rễ ít hơn nhưng rễ phát triển mạnh hơn so với môi trường có NAA. Tuy nhiên, Philip V. P et al. (1992) đã sử dụng môi trường 1/2 MS có chứa nồng độ NAA cao (1 mg/l) để tạo rễ giống hồ tiêu Panniyur-1, Karimunda. Như vậy, sự ra rễ của cây hồ tiêu in

vitro thích hợp ở môi trường 1/2MS có bổ sung NAA (0,1-0,2 mg/l).

### 5. Kiểm tra giống hồ tiêu sạch virus bằng kỹ thuật ELISA

Để xác định các giống hồ tiêu hoàn toàn

sạch virus, chúng tôi đã tiến hành lấy mẫu kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA ở 3 giai đoạn: trước khi đưa vào nuôi cấy, giai đoạn nhân chồi *in vitro* và sau khi đưa cây con ra vườn ươm. Kết quả xác định giống sạch virus được trình bày ở bảng 3.

Bảng 2

Khả năng biệt hoá chồi từ mô sẹo của cây hồ tiêu ở các nghiệm thức

Xytokinin (mg/l)		Auxin (mg/l)	TDZ (mg/l)	% mẫu tạo chồi	Số chồi/mẫu	Nhận xét
<b>BA</b>	<b>Kin</b>	<b>IBA</b>				
0	0	0		0	0	- Không hình thành chồi từ mô sẹo, mẫu cấy sẽ dần dần hoá nâu và chết.
2,0	0,5	0,5		56,3	3,6	- Nhiều mô sẹo bị hoá nâu, không có khả năng biệt hoá chồi. - Một số mẫu tạo thể chồi, nhưng không phát triển được thành chồi hoàn chỉnh.
3,0	0,5	0,5		100	9,7	- Tạo nhiều chồi từ mô sẹo. - Chồi phát triển hoàn chỉnh, chồi lớn hơn các môi trường khác. - Tái tạo chồi mới nhiều từ mẫu mô sẹo ở những lần cấy truyền tiếp theo.
<b>5,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>		<b>100</b>	<b>10,3</b>	- Mô sẹo ít bị hoá nâu và chết. - Mô sẹo tạo nhiều chồi mới, chồi phát triển thành chồi hoàn chỉnh nhiều. - Khả năng tạo chồi ở những lần cấy truyền tiếp theo của mẫu mô sẹo cao.
10,0	0,5	0,5		5,7	0,8	- Mô sẹo bị hoá nâu và chết rất nhiều. - Có thể tạo chồi nhưng khả năng phát triển thành chồi hoàn chỉnh rất thấp.
			0,5	47,1	2,0	- Tạo chồi yếu. - Mô sẹo bị hoá nâu và chết dần dần
			1,0	48,3	2,6	- Chồi bị dị dạng ở lá và thân.
			1,5	52,2	1,5	- Tạo chồi từ mô sẹo, nhưng không phát triển thành chồi hoàn chỉnh

### III. KẾT LUẬN

1. Sử dụng chất kháng sinh xêfotaxin (0,5%) kết hợp với các phương pháp khử trùng bề mặt, không những loại bỏ được các nguồn

lây nhiễm bên ngoài mà còn có tác dụng diệt được các mầm bệnh nội sinh bên trong mẫu hồ tiêu.

2. Môi trường MS có bổ sung BA = 2,0 mg/l, IBA = 0,5 mg/l thích hợp nhất cho quá

trình tạo chồi từ đốt ở cây hồ tiêu, trong đó khả năng tạo chồi ở những đốt càng gần gốc càng cao.

3. Sử dụng kỹ thuật ELISA là cần thiết để xác định giống sạch virus trong quy trình nhân giống *in vitro* cây hồ tiêu.

4. Khả năng hình thành chồi từ mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS có BA = 5,0 mg/l, IBA = 0,5 mg/l và Kin = 0,5 mg/l.

5. Cây hồ tiêu dễ dàng tạo rễ trên môi trường 1/2 MS có bổ sung NAA ở nồng độ thấp (0,1-0,2 mg/l).

Bảng 3

Xác định giống sạch virus PVX, PVY, CMV, ToMV bằng kỹ thuật ELISA

Tên giống	PVX		PVY		CMV		ToMV	
	OD	KL	OD	KL	OD	KL	OD	KL
<b>Trước khi nuôi cấy</b>								
Vĩnh linh	0,160	-	0,304	-	0,364	-	0,145	-
Lada	0,146	-	0,297	-	0,329	-	0,153	-
Tiêu gốc ghép	0,151	-	0,291	-	0,281	-	0,130	-
<b>Chồi cây in vitro</b>								
Vĩnh linh	0,143	-	0,296	-	0,240	-	0,121	-
Lada	0,114	-	0,301	-	0,251	-	0,121	-
Karimunda	0,144	-	0,337	-	0,241	-	0,145	-
Tiêu gốc ghép	0,146	-	0,246	-	0,285	-	0,139	-
<b>Cây con 5 tháng tuổi ngoài vườn ươm</b>								
Vĩnh linh	0,152	-	0,339	-	0,299	-	0,143	-
Lada	0,161	-	0,359	-	0,337	-	0,140	-
Karimunda	0,152	-	0,321	-	0,350	-	0,145	-
Tiêu gốc ghép	0,148	-	0,297	-	0,237	-	0,135	-
<b>Đối chứng</b>	1,200	+	1,706	+	0,539	+	0,566	+

Ghi chú: OD: trị số OD; KL: kết luận; -: không có virus; + : có virus.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bhat S., Chandel K. P. S., Malik S. K.**, 1995: Plant Cell Rep., 14: 398-402.
2. **Bysov A. S.**, 2001: Virus and viral diseases of black pepper (*Piper nigrum* L.) in condition of closed ground and tropical, subtropical agrocenoses. The thesis for obtaining PhD degree. Kyiv National University, Kyiv.
3. **Đoàn T. A. T, Thái X. D và cs.**, 1999-2000: Bước đầu nghiên cứu chuẩn đoán bệnh virus cây Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) tại một số tỉnh miền Đông Nam Bộ. Tuyển tập Công trình nghiên cứu KHCN., 189-195.
4. **Joseph B., Joseph D.**, 1996: Plant Cell Tiss. Org., 41(1): 87-90.
5. **Kellar S. M., Krishnamurthy K.**, 1998: Plant Cell Rep., 17(9): 721-725.
6. **Nguyen T. T., Boico A. L. et al.**, 2001: Virus and viral disease of black Ppepper (*Piper nigrum* L.) in South East of Viet Nam. III International Conference "Bioresocuri and Viruses", Kyiv, Ucraina.
7. **Philip V. P et al.**, 1992: Plant Cell Rep., 12: 41-44.



**Hình.** Nhân giống *in vitro* cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) sạch virút

1. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng; 2. Biệt hoá chồi từ mô sẹo; 3. Tạo cụm chồi từ đốt thân; 4. Cây con hoàn chỉnh cấy từ cụm chồi; 5. Cây con *in vitro* sau 3 tuần ngoài vườn ươm

## **PRELIMINARY STUDY ON THE MICROPROPAGATION IN VITRO OF BLACK PEPPER (*PIPER NIGRUM* L.)**

**DOAN THI AI THUYEN, THAI XUAN DU, DO DANG GIAP, NGUYEN TANG TON**

### **SUMMARY**

The plant regeneration from the single node or the callus culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) was described. Various combinations of media, growth regulators and explant sterilization were compared. Problems, probably caused by endogenous pathogens associated with tissue exudated, often occurred during the establishment of culture. The method to sterilize the black pepper plants using antibiotic agent such as cefotaxin was described.

For the shoot initiation and the establishment, the optimal concentration of black pepper growth was BA 2mg/l, IBA 0.5 mg/l. The high concentrations of BA (5-10 mg/l) had no effect on the shoot regeneration from callus and the development of lateral branches.

The MS medium containing BA 5.0 mg/l, Kin 0.5 mg/l and IBA 0.5 mg/l was the best medium for the subsequent growth and the shoot regeneration from callus under the current condition.

Shoots were rooted on 1/2 MS medium containing NAA 0.1-0.2 mg/l. In vitro plants were then transferred to pots in the nursery house. After 8-10 weeks, the plants with height of 20-25 cm were transferred to field for testing.

*Ngày nhận bài: 20-10-2004*