

XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY HỒ TIÊU SẠCH BỆNH BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

Nguyễn Thị Mai¹, Nguyễn Thị Thúy Ngọc¹,
Trần Thị Hoàng Anh¹, Trương Văn Tân¹,
Chu Thị Phương Loan¹, Nguyễn Thị Thu Thủy¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên nhằm xây dựng quy trình nhân giống cây hồ tiêu sạch bệnh bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Sau 60 ngày vào mẫu, tỷ lệ tạo mẫu sạch từ đỉnh sinh trưởng đạt cao nhất (68,40%) khi có sự kết hợp giữa chất khử trùng HgCl₂ (0,2%) với Nano bạc (0,3%). Các chất điều hòa sinh trưởng BA, IBA, IAA và nước dừa non với các nồng độ khác nhau được bổ sung vào môi trường nuôi cấy MS đã kích thích khả năng bật chồi, nhân chồi và ra rễ của cây hồ tiêu *in vitro*. Tỷ lệ mẫu bật chồi cao nhất (86,67%) trên môi trường MS bổ sung BA (2 mg/l) kết hợp với IBA (0,2 mg/l). Sau 3 tháng nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA (0,5 mg/l) kết hợp với nước dừa non (150 ml/l) đã làm gia tăng số lượng chồi/mẫu (6 - 7 chồi/mẫu). Việc kết hợp giữa IAA (0,4 mg/l) với than hoạt tính (1 g/l) đã giúp cây hồ tiêu *in vitro* hình thành rễ tốt nhất sau 60 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: Cây hồ tiêu, nuôi cấy mô tế bào, quy trình nhân giống

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ sinh học của nuôi cấy mô tế bào trong bốn thập niên qua đã đạt nhiều thành tựu nổi bật trong các lĩnh vực như: nuôi cấy tế bào trong môi trường lỏng, sản xuất hóa thực phẩm trong ống nghiệm, đặc biệt là lĩnh vực tái sinh cây từ nuôi cấy tế bào đã góp phần to lớn trong việc cải thiện chất lượng và số lượng cây giống của các loại cây trồng nói chung, trong đó có cây hồ tiêu.

Hiện nay, cây hồ tiêu được nhân giống chủ yếu bằng phương pháp giâm hom từ cành thân hoặc cành lươn. Tuy nhiên, thực tế sản xuất cho thấy, việc nhân giống hồ tiêu bằng phương pháp truyền thống đã bộc lộ nhiều hạn chế, nhất là khi có dịch bệnh bùng phát thì khả năng khống chế nguồn bệnh từ cây mẹ là rất khó, ảnh hưởng đến chất lượng cây giống. Do đó, để góp phần sản xuất hồ tiêu bền vững, năm 2018 - 2020, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên đã tiến hành nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học nuôi cấy mô tế bào trong nhân giống cây hồ tiêu nhằm xây dựng quy trình nhân giống cây hồ tiêu sạch bệnh đáp ứng yêu cầu sản xuất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống hồ tiêu Vĩnh Linh do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển cây hồ tiêu thuộc Viện khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên cung cấp.

- Môi trường MS, chất điều hòa sinh trưởng (BA, IBA, IAA), nước dừa non, than hoạt tính.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của Clorua thủy ngân và Nano bạc đến khả năng tạo mẫu sạch

Chồi ngọn của giống tiêu Vĩnh Linh được khử trùng bằng dung dịch thủy ngân clorua (HgCl₂) và nano bạc với các nồng độ khác nhau. Thời gian khử trùng: 10 phút đối với HgCl₂ và 30 phút đối với Nano bạc. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 2 yếu tố, yếu tố 1 là clorua thủy ngân (0,1%; 0,2%) và yếu tố 2 là nano bạc (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%); gồm 8 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 15 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu. Mẫu chồi ngọn sau khi khử trùng được rửa lại bằng nước cất vô trùng, dùng dao mổ tách lấy đỉnh sinh trưởng và cấy lên môi trường MS (MuraShige and Skoog, 1962), agar 10 g/l, đường sacharose 30 g/l. Thời gian theo dõi: 60 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu nhiễm (nhiễm nấm và nhiễm khuẩn) (%); Tỷ lệ mẫu sạch (%); Tỷ lệ mẫu sạch và sống (%).

2.2.2. Ảnh hưởng của BA và IBA đến khả năng bật chồi và phát sinh hình thái chồi của đỉnh sinh trưởng

Các đỉnh sinh trưởng sạch và sống (không bị nhiễm nấm và khuẩn, mẫu xanh) được cấy lên môi trường MS, bổ sung BA và IBA với các nồng độ khác nhau. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 2 yếu tố, yếu tố 1 là BA (1 mg/l; 2 mg/l) và yếu tố 2 là IBA (0 mg/l; 0,2 mg/l; 0,4 mg/l; 0,6 mg/l); gồm 8 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 15 bình, 3 lần lặp lại, mỗi bình cấy 1 mẫu. Thời gian theo dõi: 90 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian đỉnh sinh trưởng bật chồi (ngày); Tỷ lệ mẫu bật chồi (%); Chiều dài chồi (cm).

¹ Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên

2.2.3. Ảnh hưởng của BA và nước dừa non đến khả năng nhân chồi của cây hồ tiêu trong điều kiện in vitro

Đốt thân và đốt ngọn của cây hồ tiêu *in vitro* được cấy lên môi trường MS bổ sung BA và nước dừa non với các nồng độ khác nhau. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 2 yếu tố, yếu tố 1 là BA (0,5 mg/l; 1,0 mg/l) và yếu tố 2 là nước dừa non (0 ml/l; 100 ml/l; 150 ml/l; 200 ml/l); gồm 8 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 5 bình, 3 lần lặp lại, mỗi bình cấy 5 mẫu. Thời gian theo dõi: 90 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi/mẫu (chồi); chiều dài chồi (cm); Số đốt/chồi (đốt).

2.2.4. Ảnh hưởng của IAA và than hoạt tính đến khả năng ra rễ của cây hồ tiêu trong điều kiện in vitro

Chồi ngọn có 2 - 3 đốt tương đương với 2 - 3 lá của cây hồ tiêu *in vitro* được cấy lên môi trường MS bổ sung IAA với các nồng độ khác nhau kết hợp hoặc không kết hợp với than hoạt tính. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 2 yếu tố, yếu tố 1 là IAA có 3 nồng độ (0,2 mg/l; 0,4 mg/l; 0,6 mg/l) và yếu tố 2 là than hoạt tính có 2 nồng độ (0 g/l; 1 g/l); gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 5 bình, 3 lần lặp lại, mỗi bình cấy 5 mẫu. Thời gian theo dõi: 60 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ chồi ra rễ (%); Số rễ/chồi (rễ); Chiều dài rễ (cm).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1 năm 2018 đến tháng 12 năm 2019 tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của Clorua thủy ngân và Nano bạc đến khả năng tạo mẫu sạch

Đối với cây hồ tiêu, việc khử trùng mẫu để tạo nguồn vật liệu sạch ban đầu cho quá trình nuôi cấy *in vitro* gặp rất nhiều khó khăn. Theo Choi và cộng tác viên (2009), Nano bạc thuộc nhóm vật liệu mới với đặc tính vật lý và sinh học đáng chú ý như hoạt tính kháng vi sinh vật. Dung dịch nano bạc có hiệu quả kháng khuẩn, kháng nấm và kháng *virus* (Nomiya *et al.*, 2004). Mặt khác, Nano bạc không gây độc và không gây kích ứng đối với người. Do đó, trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng Nano bạc để khử trùng mẫu chồi ngọn của giống hồ tiêu Vĩnh Linh.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch

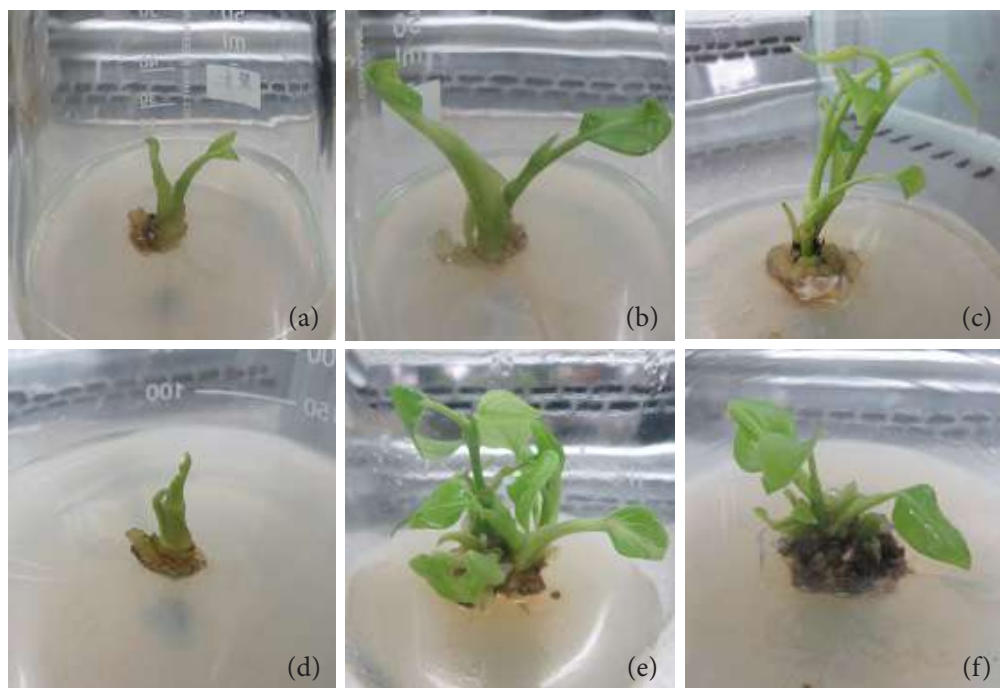
Nghiệm thức	Chất khử trùng		Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu sạch và sống (%)
	Thủy ngân Clorua	Nano bạc			
1	0,1	0,0	92,59 a	7,41 g	6,17 g
2	0,1	0,1	70,37 c	29,63 e	25,18 e
3	0,1	0,3	52,10 d	47,90 d	40,25 d
4	0,1	0,5	43,95 e	56,05 c	45,18 c
5	0,2	0,0	81,23 b	18,77 f	14,07 f
6	0,2	0,1	45,43 e	54,57 c	50,12 b
7	0,2	0,3	23,45 f	76,55 b	68,40 a
8	0,2	0,5	12,35 g	87,65 a	42,96 cd
ANOVA					
Yếu tố Thủy ngân Clorua			**	**	**
Yếu tố Nano bạc			**	**	**
Yếu tố Thủy ngân Clorua × Yếu tố Nano bạc			**	**	**
CV (%)			1,72	1,92	3,19

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$ hoặc không có sự khác biệt. Các chữ số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD.

Kết quả bảng 1 cho thấy, có ảnh hưởng tương tác giữa thủy ngân clorua ($HgCl_2$) và nano bạc đến tỷ lệ mẫu sạch cũng như tỷ lệ mẫu sạch và sống. Trong đó, nghiệm thức 7 cho tỷ lệ mẫu sạch và sống đạt cao nhất (68,40%), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các công thức còn lại. Nghiệm thức 8 có tỷ lệ mẫu sạch đạt cao, tuy nhiên khi xử lý mẫu với chất khử trùng có nồng độ cao thì mẫu bị chết nhiều, do đó đã làm giảm tỷ lệ mẫu sạch và sống xuống còn 42,96%. Có sự khác biệt thống kê rõ giữa việc sử dụng $HgCl_2$ đơn lẻ với việc kết hợp giữa $HgCl_2$ và nano bạc trong khử trùng mẫu hồ tiêu. Điều này cho thấy, có tác động tích cực của việc kết hợp $HgCl_2$ và nano bạc lên khả năng tạo mẫu sạch đối với chồi hồ tiêu.

3.2. Ảnh hưởng của BA và IBA đến khả năng bật chồi và phát sinh hình thái chồi của đỉnh sinh trưởng

Cytokinin khi kết hợp với auxin sẽ giúp sự tăng trưởng chồi non và khởi phát sự tạo mới mô phân sinh ngọn chồi từ nhu mô (Gaspar *et al.*, 2003). Kết quả khảo sát ở bảng 2 cho thấy, thời gian mẫu bật chồi dao động từ 45 - 60 ngày trên tất cả các nghiệm thức thí nghiệm.



Hình 1. Đỉnh sinh trưởng bật chồi trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

Ghi chú: (a): MS + BA (1 mg/l); (b): MS + BA (1 mg/l) + IBA (0,2 mg/l); (c): MS + BA (1 mg/l) + IBA (0,4 - 0,6 mg/l); (d): MS + BA (2 mg/l); (e): MS + BA (2 mg/l) + IBA (0,2 mg/l); (f): MS + BA (2 mg/l) + IBA (0,4 - 0,6 mg/l)

Bảng 2. Khả năng phát sinh hình thái chồi của đỉnh sinh trưởng trên môi trường bổ sung BA và IBA

Nghiem thức	Nồng độ chất ĐHST (mg/l)		Thời gian mẫu bật chồi (ngày)	Tỷ lệ mẫu bật chồi (%)	Chiều dài chồi (cm)	Đặc điểm chồi
	BA	IBA				
1	1,00	0,00	45 - 60	52,35 e	5,24 bc	+++
2	1,00	0,20	45 - 60	68,15 bc	5,94 ab	+++
3	1,00	0,40	45 - 60	65,19 c	4,66 cd	++
4	1,00	0,60	45 - 60	58,77 d	3,55 de	++
5	2,00	0,00	45 - 60	66,91 bc	6,41 ab	+++
6	2,00	0,20	45 - 60	86,67 a	7,16 a	+++
7	2,00	0,40	45 - 60	72,34 b	3,89 d	++
8	2,00	0,60	45 - 60	55,56 de	2,63 e	+
ANOVA						
Yếu tố BA				**	**	
Yếu tố IBA				**	**	
Yếu tố BA × Yếu tố IBA				**	**	
CV (%)				3,3	9,7	

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,01$ hoặc không có sự khác biệt. Các chữ số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD. (+): Chồi ngắn, phát triển kém, phát sinh nhiều mô sẹo dưới gốc; (++) : Chồi phát triển trung bình, phát sinh mô sẹo dưới gốc; (+++) : Chồi phát triển tốt.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: Có ảnh hưởng tương tác giữa BA và IBA đến khả năng bật chồi và phát sinh hình thái chồi trong nuôi cấy *in vitro* cây hồ tiêu. Sau 12 tuần nuôi cấy, trên môi trường bổ sung BA, nồng độ 2 mg/l và IBA nồng độ 0,2 mg/l (CT6),

tỷ lệ mẫu bật chồi (86,67%) và chiều dài chồi (7,16 cm) đạt cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các công thức khác. Môi trường nuôi cấy bổ sung 1 mg/l BA, tỷ lệ mẫu bật chồi là 52,35%, khi tăng nồng độ BA lên 2 mg/l thì tỷ lệ mẫu bật chồi tăng

lên 66,91%; Kết quả này khác với kết quả nghiên cứu của Thái Xuân Du và cộng tác viên (2013), khi bổ sung 1 mg/l BA vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ mẫu bật chồi đạt 67,50%, tuy nhiên khi tăng nồng độ BA lên 2 mg/l thì tỷ lệ mẫu bật chồi giảm còn 25,85%. Như vậy, tùy vào điều kiện nuôi cấy và nguồn mẫu nuôi cấy mà cho kết quả khác nhau.

Trên môi trường bổ sung 0,4 - 0,6 mg/l IBA, các chồi có xu hướng tạo nhiều mô sẹo dưới gốc, do đó đã ảnh hưởng đến khả năng phát triển của chồi.

3.3. Ảnh hưởng của BA và nước dừa non đến khả năng nhân chồi của cây hồ tiêu trong điều kiện *in vitro*

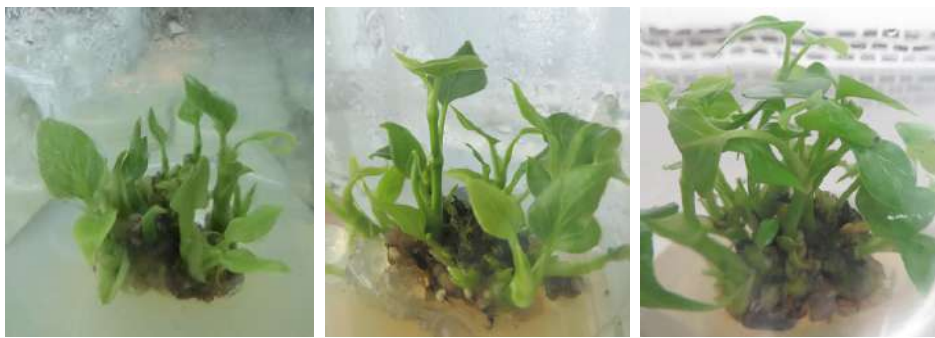
Các chồi *in vitro* tái sinh từ đỉnh sinh trưởng được cắt thành đốt và cấy lên môi trường MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA và nước dừa non với các nồng độ khác nhau.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, có ảnh hưởng tương tác giữa BA và nước dừa non đến khả năng nhân chồi của cây hồ tiêu *in vitro*, trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA và 150 ml nước dừa non (CT 3) có số chồi hình thành/mẫu đạt cao nhất (trung bình là 7,73 chồi), tiếp đến là CT 6 (6,49 chồi/mẫu), tuy nhiên, chiều dài chồi và số đốt/chồi ở CT 3 thấp hơn so với CT 6, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các công thức còn lại.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA và nước dừa non đến khả năng nhân chồi của cây hồ tiêu *in vitro*

Công thức	BA (mg/l)	Nước dừa (ml/l)	Số chồi/mẫu	Chiều dài chồi (cm)	Số đốt/chồi	Đặc điểm chồi
1	0,5	0,0	3,24 f	3,55 f	2,85 f	++
2	0,5	100	5,40 c	5,39 c	4,04 c	++
3	0,5	150	7,73 a	6,09 c	5,55 b	+++
4	0,5	200	4,70 d	4,44 e	3,85 d	++
5	1,0	0,0	5,23 c	4,63 d	3,53 e	++
6	1,0	100	6,49 b	7,27 a	6,58 a	+++
7	1,0	150	5,29 c	5,49 c	4,05 c	++
8	1,0	200	3,78 e	2,72g	2,31 g	+
ANOVA						
Yếu tố BA			**	**	**	
Yếu tố nước dừa			**	**	**	
Yếu tố BA × Yếu tố nước dừa			**	**	**	
CV (%)			1,36	1,59	1,28	

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,01$ hoặc không có sự khác biệt. Các chữ số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD. (+): Chồi phát triển kém, lá xanh nhạt; (++) : Chồi phát triển trung bình, lá xanh đậm; (+++) : Chồi phát triển tốt, lá xanh đậm.



Hình 2. Cụm chồi của cây hồ tiêu *in vitro* phát triển trên môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (0,5 mg/l) và nước dừa non 150 ml/l

3.4. Ảnh hưởng của IAA và than hoạt tính đến khả năng ra rễ của cây hồ tiêu trong điều kiện *in vitro*

Giai đoạn tạo rễ là giai đoạn quyết định đến tỷ lệ sống của cây khi ra vườn ươm. Cây có bộ rễ khỏe mạnh sẽ dễ dàng thích nghi với điều kiện của môi trường.

Chồi *in vitro* có 2 - 3 đốt được cấy lên môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng IAA và than hoạt tính để khảo sát khả năng tạo rễ và phát triển thành cây hoàn chỉnh. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy tỷ lệ chồi tạo rễ đạt $\geq 95\%$ trên tất cả các môi trường nuôi cấy.

Theo Moura và cộng tác viên (2008), than hoạt tính có khả năng làm giảm quá trình oxy hóa của các mô. Ngoài ra, than hoạt tính còn được sử dụng trong giai đoạn cuối cùng của quá trình vi nhân giống để tạo rễ và huấn luyện cây trước khi đưa ra ngoài tự nhiên. Trên cơ sở đó, chúng tôi đã bổ sung 1 g/l than hoạt tính vào môi trường tạo rễ. Kết quả cho thấy, trên môi trường MS bổ sung 0,4 mg/l IAA kết hợp với 1 g/l than hoạt tính khả năng tạo rễ của chồi là tốt nhất (cây cứng, có bộ rễ khỏe, lá xanh đậm).

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất IAA và than hoạt tính đến khả năng ra rễ của cây hồ tiêu *in vitro*

Nghiệm thức	IAA (mg/l)	Than hoạt tính (g/l)	Tỷ lệ (%) chồi ra rễ	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Đặc điểm rễ
1	0,2	0,0	95,77 b	3,67 c	1,97 b	Rễ khỏe
2	0,4	0,0	98,33 a	4,89 bc	2,10 b	Rễ khỏe
3	0,6	0,0	100,00 a	6,11 ab	2,3 b	Rễ khỏe
4	0,2	1,0	100,00 a	4,67 c	2,03 b	Rễ khỏe
5	0,4	1,0	100,00 a	6,89 a	2,73 ab	Rễ khỏe
6	0,6	1,0	100,00 a	6,22 a	3,77 a	Rễ khỏe
ANOVA						
Yếu tố IAA			**	**	**	
Yếu tố than hoạt tính			**	**	**	
Yếu tố IAA × Yếu tố than hoạt tính			**	**	**	
CV (%)			0,75	9,01	9,5	

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,01$ hoặc không có sự khác biệt. Các chữ số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD.



Hình 3. Khả năng ra rễ của cây hồ tiêu *in vitro* trên các môi trường nuôi cấy

(a) MS + IAA (0,2 mg/l); (b): MS + IAA (0,4 mg/l); (c): MS + IAA (0,6 mg/l); (d): MS + IAA (0,2 mg/l + 1 g/l than hoạt tính); (e): MS + IAA (0,4 mg/l + 1 g/l than hoạt tính); (f): MS + IAA (0,6 mg/l + 1 g/l than hoạt tính).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- Sự kết hợp giữa chất khử trùng Nano bạc (0,3%, thời gian khử trùng 30 phút) và HgCl₂ (0,2%, thời gian khử trùng 10 phút) cho tỷ lệ tạo mẫu sạch và sống cao nhất (68,40%).

- Tỷ lệ mẫu bật chồi đạt cao nhất (86,67%) sau 3 tháng nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung chất kích thích sinh trưởng BA (2 mg/l) kết hợp với IBA (0,2 mg/l).

- Môi trường MS bổ sung BA (0,5 mg/l) kết hợp với nước dừa non (150 ml/l) hoặc BA (1mg/l) kết hợp với nước dừa non (100 ml/l) cho khả năng tạo cụm chồi tốt nhất và số chồi/cụm đạt trung bình 6 - 7 chồi.

- 100% chồi hình thành rễ và tái sinh cây hoàn chỉnh, có bộ rễ khỏe trên môi trường MS bổ sung chất kích thích sinh trưởng IAA (0,4 mg/l) kết hợp với than hoạt tính (1 g/l).

4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện hiện quy trình sản xuất cây hồ tiêu sạch bệnh ở quy mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Thái Xuân Du, Nguyễn Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Kim Loan, Trần Trọng Tuấn, Hoàng Thị Phòng,

Trương Thị Trúc Hà, Đỗ Đăng Giáp, 2013. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và lớp mỏng tế bào trong vi nhân giống cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) giống Vinh Linh. Trong *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2013*. NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ.

Choi O., Clevenger T.E., Deng B., Surampalli RY, Ross L., Hu Z., 2009. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Res.*, 43: 1879 - 1886.

Gaspar T., Kevers C., Faivre-Rampant O., Crèvecoeur M., Penel C., Gerppin H. and Dommes J., 2003. Changing concept in plant hormone action. *In Vitro Cell Dev. Pl.*, 39 (2): 85-106.

Moura Elisa Ferreira. Menezes Iimaria Campos de. Lemos Oriel Filgueira de, 2008. Cytokinin concentration and activated charcoal on black pepper micropropagation. *Ciencia Rural. Santa Maria* 38 (1): 72-76.

Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Nomiya K., Yoshizawa A., Tsukagoshi K., Kasuga N.C., Hirakawa S., Watanabe J., 2004. Synthesis and structural characterization of silver (I), aluminium (III), and cobalt (II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitio) showing noteworthy biology activities. Action of silver (I)-oxygen bonding complexes on the activities. *J. Inorganic Biochem.*, 98: 46-60.

Building of propagation procedure for free disease black pepper by tissue culture

Nguyen Thi Mai, Nguyen Thi Thuy Ngoc,
Tran Thi Hoang Anh, Truong Van Tan,
Chu Thi Phuong Loan, Nguyen Thi Thu Thuy

Abstract

This study was conducted at the Central Highlands Agricultural and Forestry Science Institute (WASI) in order to build a propagation procedure for free disease black pepper by tissue culture. The results showed that the ratio of clean samples from shoots reached highest (68.4%) when combining HgCl₂ (0.2%) with Silver Nano (0.3%) after 60 days of sampling. In addition, different concentrations of growth regulators BA, IBA, IAA and young coconut juice were added to the MS culture medium stimulated the generation of shoot and root *in vitro*. The highest rate of shooting (86.67%) was found on MS medium supplemented with BA (2 mg/l) and IBA (0.2 mg/l). After 3 months of sampling, the appropriate MS medium supplemented with BA (0,5 mg/l) and young coconut juice (150 ml/l) increased the number of shoots produced from each sample (6 - 7 shoots/sample). After 60 days of culturing, the medium contained IAA (0.4 mg/l) and activated carbon (1g/l) produced best rooting from explants.

Keywords: Black pepper, tissue culture, propagation procedure

Ngày nhận bài: 10/3/2020
Ngày phản biện: 17/3/2020

Người phản biện: TS. Đỗ Trung Bình
Ngày duyệt đăng: 23/3/2020