

Xây dựng quy trình kỹ thuật ươm và chăm sóc cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) giai đoạn sau *in vitro*

Nguyễn Thị Mai¹, Trương Hồng¹, Nguyễn Hắc Hiên², Ninh Thị Thảo^{3*}

¹Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, 53 Nguyễn Lương Bằng, xã Hòa Thắng, TP Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam

²Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật tỉnh Đắk Lắk, 11 Hùng Vương, phường Tự An, TP Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam

³Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, phố Ngõ Xuân Quảng, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/9/2021; ngày chuyển phản biện 6/9/2021; ngày nhận phản biện 4/10/2021; ngày chấp nhận đăng 8/10/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả cho thấy, việc huấn luyện cây hồ tiêu *in vitro* bằng cách đặt bình nuôi cây đầy kín nắp trong vườn ươm 2 tuần đã làm tăng tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây. Các cây *in vitro* cần phải đạt khối lượng 0,7-0,9 g trước khi được trồng vào bầu ươm cây chứa giá thể với tỷ lệ đất đỏ bazan:phân bò:xơ dừa:trấu hun là 5:2:2:1. Bón phân NPK nồng độ 0,2% xen kẽ với phân bón lá Nupe 0,2% định kỳ 2 tuần/lần giúp cây hồ tiêu sinh trưởng tốt và đạt tiêu chuẩn xuất vườn sau khoảng 5 tháng. Kết quả nghiên cứu đã thiết lập được quy trình kỹ thuật ươm và chăm sóc cây giống hồ tiêu sau giai đoạn *in vitro*, góp phần hoàn thiện quy trình sản xuất cây giống hồ tiêu bằng phương pháp vi nhân giống.

Từ khoá: hồ tiêu, *in vitro*, *Piper nigrum* L., Vĩnh Linh, vườn ươm.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Chiếm hơn 40% về sản lượng và gần 60% thị phần xuất khẩu hồ tiêu của thế giới, Việt Nam luôn giữ vị thế số một thế giới về sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu [1]. Cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) hay còn gọi là cây tiêu thuộc họ hồ tiêu (Piperaceae), là cây trồng chủ lực của nước ta, với diện tích khoảng hơn 130 nghìn ha, tập trung chủ yếu ở vùng Đông Nam Bộ và Tây Nguyên do điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng phù hợp. Mặc dù có lợi thế lớn so với nhiều nước sản xuất hồ tiêu trên thế giới, nhưng sản xuất hồ tiêu hiện nay ở nước ta chưa thật sự bền vững do nhiều nguyên nhân, trong đó chất lượng cây giống không đảm bảo là một trong những yếu tố gây nhiều trở ngại.

Trong tự nhiên, cây hồ tiêu có thể được nhân giống bằng hạt hoặc giâm hom từ cành thân, cành lươn và cành quả. Các phương pháp nhân giống truyền thống này thường có hệ số nhân giống thấp, thời gian dài, phụ thuộc vào điều kiện thời tiết, cây giống có thể mang các mầm bệnh và không đồng nhất về mặt di truyền nếu nhân bằng hạt [2]. Để khắc phục các hạn chế này, phương pháp nhân giống *in vitro* là một giải pháp hiệu quả vì cho hệ số nhân giống cao, cây giống tạo ra hoàn toàn sạch bệnh, đồng nhất về kiểu hình và có thể sản xuất được ở quy mô lớn [3]. Nghiên cứu đầu tiên về nhân giống *in vitro* cây hồ tiêu được công bố vào năm 1984, sử dụng vật liệu ban đầu gồm chồi nách, lá, cuống lá và đoạn thân [4]. Từ đó đến nay, đã có nhiều báo cáo việc sản xuất thành công cây hồ tiêu *in vitro* từ các nguồn vật liệu khác nhau [5-10]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về kỹ thuật trồng và chăm sóc cây hồ tiêu *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm lại rất hạn chế với chỉ hai báo cáo duy nhất. Cụ thể, V.M. Verma (2019) [11] thực hiện thí nghiệm chuyển cây hồ

tiêu *in vitro* giống Sri Lanka ra trồng ở điều kiện vườn ươm trên giá thể đất trộn với vermiculite (tỷ lệ 1:1) cho tỷ lệ cây sống đạt 68%. X. Meng và cs (2021) [2] sử dụng đất bùn, đất cát, xơ dừa (tỷ lệ tương ứng 1:1:2) làm giá thể tiếp nhận cây hồ tiêu *in vitro* với tỷ lệ cây sống đạt 89,6% [2]. Cũng theo 2 nghiên cứu này, các cây hồ tiêu *in vitro* cần được ươm trong nhà lưới 7-10 tháng mới đạt tiêu chuẩn xuất vườn [2, 11].

Những năm gần đây, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình nhân nhanh *in vitro* cây hồ tiêu Vĩnh Linh giai đoạn phòng thí nghiệm, cho hệ số nhân giống cao, các cây con *in vitro* sinh trưởng, phát triển tốt, sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền [10]. Để hoàn thiện quy trình sản xuất cây giống hồ tiêu bằng phương pháp nhân giống *in vitro*, cần thiết phải xác định được các điều kiện ươm và chăm sóc cây ở giai đoạn vườn ươm. Các cây *in vitro* khi chuyển từ môi trường vô trùng với đầy đủ các điều kiện phát triển tối ưu sang môi trường tự nhiên có nhiều biến động về điều kiện sống, dễ làm cây mất nước, héo khô, cho tỷ lệ cây sống thấp, cây sinh trưởng phát triển kém [12]. Mặt khác, thời gian sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong vườn ươm trước khi xuất vườn khá dài [2, 11], nên nhu cầu dinh dưỡng của cây là rất cao. Do vậy, các yếu tố như tiêu chuẩn cây *in vitro*, biện pháp huấn luyện cây trước khi đưa ra trồng ở vườn ươm, giá thể trồng cây và bổ sung dinh dưỡng cho cây thông qua phân bón phải được khảo sát. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng quy trình kỹ thuật sau giai đoạn *in vitro* cho cây hồ tiêu Vĩnh Linh, góp phần hoàn thiện quy trình vi nhân giống cây hồ tiêu chất lượng cao.

*Tác giả liên hệ: Email: ntthao@vnua.edu.vn

Establishment of an acclimatization protocol for pepper (*Piper nigrum* L.) plantlets post-*in vitro* stage

Thi Mai Nguyen¹, Hong Truong¹, Hac Hien Nguyen²,
Thi Thao Ninh^{3*}

¹Western Highlands Agriculture and Forestry Science Institute,
53 Nguyen Luong Bang Street, Hoa Thang Commune,
Buon Ma Thuot City, Dak Lak Province, Vietnam

²Dak Lak Crop Production and Plant Production Branch,
11 Hung Vuong Street, Tu An Ward, Buon Ma Thuot City, Dak Lak Province, Vietnam

³Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture,
Ngo Xuan Quang Street, Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 1 September 2021; revised 4 October 2021; accepted 8 October 2021

Abstract:

This study was conducted with the aim of determining the factors that affect the growth and development of *in vitro*-derived pepper plantlets variety Vinh Linh in greenhouse. The results indicated that gradual adaptation of *in vitro* plantlets to *ex vitro* environment by placing enclosed plantlets-containing culture vessels in greenhouse for 2 weeks improved the survival and growth of pepper plantlets upon transfer to acclimatization substrate. The plantlets were required to reach the weight of 0.7-0.9 g before transplanting into nursery bags containing substrate that was red soil:cow dung:coconut husk:rice husk (5:2:2:1). Alternative application of NPK 0.2% and foliar fertilizer Nupe 0.2% every 2 weeks positively affected plant growth and the plants were ready for transplanting into the field after about 5 months. The research results establish an acclimatization protocol for pepper plantlets post-*in vitro* stage that helps to complete the protocol for pepper production using micropropagation method.

Keywords: greenhouse, *in vitro*, pepper, *Piper nigrum* L., Vinh Linh.

Classification number: 4.1

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Cây hồ tiêu Vinh Linh *in vitro* sinh trưởng phát triển tốt, có chiều cao 3,5-5,5 cm, 3-5 lá, bộ rễ khoẻ mạnh và có nhiều hơn 4 rễ.

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 6/2019 đến tháng 12/2020 tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.

2.2. Điều kiện thí nghiệm và kỹ thuật chăm sóc

Các thí nghiệm được tiến hành trong nhà lưới có mái che mưa hoàn toàn và lưới đen giảm 50% cường độ ánh sáng, nhiệt độ dao động trong khoảng 27-30°C, độ ẩm 55-60%.

Ngoài yếu tố thí nghiệm, các kỹ thuật chăm sóc như tưới nước hay phòng trừ sâu bệnh được thực hiện giống nhau ở tất cả các nghiệm thức. Để giữ ẩm và cung cấp dinh dưỡng cho cây sau khi chuyển ra trồng ở vườn ươm, phương pháp tưới nước phun sương được áp dụng 2 lần/ngày, phân bón lá Nupe 0,2% được bổ sung sau 2 tuần trồng khi cây đã bén rễ và bón định kỳ 2 tuần/lần để bổ sung các chất dinh dưỡng thiết yếu cho cây.

2.3. Phương pháp

Chuẩn bị giá thể: Giá thể được sử dụng có thành phần gồm đất đỏ bazan phối trộn với xơ dừa, trấu hun và phân bò hoai mục ở các tỷ lệ khác nhau. Đất đỏ bazan được hấp khử trùng ở điều kiện 121°C, 1 atm, 30 phút. Giá thể trước khi sử dụng được xử lý nấm bệnh bằng thuốc Aliette (Aliette Fosetyl Aluminium 800 WG), liều dùng 0,3 kg/m³ giá thể, đảm bảo độ ẩm 55-60%, sau đó phủ nilon và ủ trong 30 ngày nhằm hạn chế nguồn bệnh.

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố, lặp lại 3 lần, mỗi lần 30 cây. Cụ thể như sau:

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*: Cây giống hồ tiêu *in vitro* có chiều cao 4,5-5,5 cm và 4-5 lá được huấn luyện để thích nghi với điều kiện tự nhiên bằng cách chuyển bình nuôi cây đầy kín nắp ra nhà lưới và để trong 0, 7, 14, 21 và 30 ngày. Cây con *in vitro* sau đó được rửa sạch agar dưới vòi nước chảy, loại bỏ lá già và trồng vào khay ươm cây kích thước 40×60 cm, có 70 lỗ, đường kính lỗ 5 cm, chiều sâu lỗ 5 cm. Giá thể sử dụng gồm đất đỏ bazan, xơ dừa theo tỷ lệ 1:1. Đánh giá thí nghiệm sau 4 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ cây sống sót (%), chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) và chiều dài rễ (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của khối lượng cây đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*: Cây giống hồ tiêu *in vitro* có chiều cao 3,5-5,5 cm và 3-5 lá sau huấn luyện trong nhà lưới 14 ngày được rửa sạch agar, thấm khô bằng giấy thấm và cân khối lượng để chia thành 3 nhóm: 0,4-0,6 g/cây, 0,7-0,9 g/cây và 1,0-1,2 g/cây. Các cây hồ tiêu *in vitro* sau đó được trồng vào khay ươm cây có thông số và chứa loại giá thể tương tự với thí nghiệm trước. Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ cây sống sót (%), chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) và chiều dài rễ (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể bầu ươm đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*: Cây giống hồ tiêu *in vitro* có chiều cao 4,5-5,5 cm và 4-5 lá sau huấn luyện trong nhà lưới 14 ngày được trồng vào túi bầu ươm cây có kích thước 12×22 cm chứa giá thể với 5 nghiệm thức khác nhau gồm: đất đỏ bazan, đất đỏ bazan:phân bò tỷ lệ 1:1, đất đỏ bazan:phân bò:xơ dừa tỷ lệ 7:2:1, đất đỏ bazan:phân bò:trấu hun tỷ lệ 7:2:1, đất đỏ bazan:phân bò:xơ dừa:trấu hun tỷ lệ 5:2:2:1. Đánh giá thí nghiệm sau 8 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ cây sống sót (%), chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) và chiều dài rễ (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của phân bón NPK đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm: Cây giống hồ tiêu *in vitro* có chiều cao 4,5-5,5 cm và 4-5 lá sau huấn luyện trong nhà lưới 14 ngày được trồng vào túi bầu ươm cây có kích thước 12×22 cm chứa giá thể với tỷ lệ đất đỏ bazan:phân bò:xơ dừa:trấu hun là 5:2:2:1. Bổ sung phân bón lá Nupe 0,2% sau khi trồng 2 tuần và bổ sung phân bón rễ NPK (NPK đầu trâu 16:16:8) sau trồng 4 tuần. 4 nồng độ NPK được khảo sát gồm 0,1, 0,2, 0,3 và 0,4%. Phân bón Nupe 0,2% và NPK được bổ sung xen kẽ, 2 tuần bón một loại phân. Ở nghiệm thức đối chứng, phân bón Nupe 0,2% được sử dụng thay thế phân bón NPK. Đánh giá thí nghiệm sau 20 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), chiều dài rễ (cm), hàm lượng chất diệp lục (CCI - Chlorophyll content index), khối lượng tươi (g) và khối lượng khô (g).

Tính kết quả:

Chiều cao gia tăng và số lá mới: là hiệu số của chiều cao/số lá của cây đo đếm tại thời điểm kết thúc thí nghiệm và chiều cao/số lá của cây đo đếm tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm.

Chiều dài lá: được đo từ đầu mút của lá đến phần tiếp giáp với cuống lá; chiều rộng lá được đo tại điểm lá có chiều rộng lớn nhất ở tất cả các lá hoàn chỉnh thứ 2 tính từ ngọn xuống.

Chiều dài rễ: được đo từ cổ rễ đến đỉnh sinh trưởng của chóp rễ dài nhất.

Hàm lượng diệp lục tổng số trong lá: được đo bằng máy CCM-200 plus. Đo ở lá thứ 2 từ ngọn xuống, đo tại 5 điểm khác nhau trên lá, sau đó lấy giá trị trung bình.

Khối lượng tươi của cây: được xác định bằng cách cân trọng lượng toàn bộ cây sau khi đã loại bỏ hoàn toàn môi trường hoặc giá thể dưới vòi nước và thấm khô bằng giấy thấm.

Khối lượng khô của cây: được xác định sau khi mẫu cây được sấy ở nhiệt độ 105°C cho đến khi khối lượng không đổi.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và SAS 9.0.

4. Kết quả và bàn luận

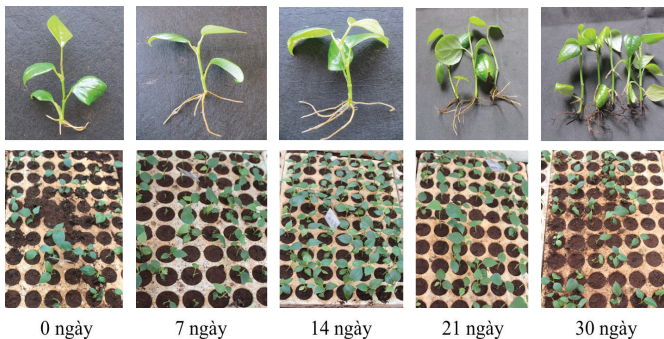
4.1. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện cây *in vitro* trong điều kiện vườn ươm đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây

Tạo điều kiện cho cây nuôi cấy mô làm quen dần với môi trường tự nhiên bên ngoài trước khi tách khỏi điều kiện *in vitro*, giúp cây cứng cáp, khỏe mạnh thông qua giai đoạn huấn luyện có ý nghĩa với rất nhiều đối tượng cây trồng [13-16]. Kết quả bảng 1 cho thấy, huấn luyện cây trong vườn ươm đã cho hiệu quả tích cực đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*. Cụ thể, cây hồ tiêu *in vitro* trồng trực tiếp vào giá thể không qua giai đoạn huấn luyện sau 4 tuần cho tỷ lệ sống (32,8%), chiều cao cây gia tăng (0,2 cm) và số lá mới (1,03) thấp, chiều dài (2,37 cm) và chiều rộng lá (1,53 cm) nhỏ, rễ ngắn (2,91 cm). Tỷ lệ cây sống (91,97%) và các chỉ tiêu tăng trưởng đạt cao nhất ghi nhận được ở nghiệm thức huấn luyện cây trong 14 ngày (bảng 1). Ở nghiệm thức huấn luyện cây trong 7 ngày hoặc trong thời gian dài (21-30 ngày) cho tỷ lệ cây sống (42,60-72,93%), chiều cao cây gia tăng (0,33-0,56 cm) và chiều dài rễ (3,64-4,28 cm) thấp hơn so với nghiệm thức huấn luyện cây trong 14 ngày mặc dù vẫn cho kết quả tốt hơn đối chứng. Nguyên nhân có thể là do thời gian 7 ngày chưa đủ để cây thích ứng với điều kiện tự nhiên, trong khi đó quan sát thực tế cho thấy, các cây *in vitro* ở các nghiệm thức huấn luyện trong 21-30 ngày có bộ rễ bị nâu hoặc đen, nhiều rễ tơ bị chết, các lá vàng xuất hiện ở phần gốc cây (hình 1). Điều này có thể giải thích là do để đạt tiêu chuẩn đưa ra ngoài điều kiện vườn ươm, các cây hồ tiêu *in vitro* đã được duy trì trên môi trường ra rễ 45-60 ngày [10], việc kéo dài thời gian huấn luyện thêm 21-30 ngày làm nguồn dinh dưỡng trong bình nuôi cây bị cạn kiệt, ảnh hưởng đến chất lượng bộ rễ và sinh trưởng của cây. Hiện tượng kéo dài thời gian nuôi cấy *in vitro* trên môi trường ra rễ trước khi đưa ra thích nghi ngoài vườn ươm gây ảnh hưởng không tốt đến tỷ lệ cây sống cũng được quan sát ở một số cây khác như ba kích [17], bách bộ [18].

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần trồng.

Thời gian huấn luyện (ngày)	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)
0	32,80 ^c	0,20 ^c	1,03 ^a	2,37 ^c	1,53 ^c	2,91 ^c
7	64,93 ^c	0,47 ^c	1,07 ^a	3,47 ^b	2,37 ^b	4,28 ^b
14	91,97 ^a	0,87 ^a	1,17 ^a	4,73 ^a	2,87 ^a	5,44 ^a
21	72,93 ^b	0,56 ^b	1,03 ^a	3,77 ^b	2,39 ^b	3,97 ^b
30	42,60 ^d	0,33 ^d	1,03 ^a	3,43 ^b	2,33 ^b	3,64 ^b
CV (%)	4,18	7,02	8,64	7,50	5,16	6,80

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác nhau giữa các nghiệm thức, $p < 0,05$; CV: hệ số biến thiên.



Hình 1. Cây hồ tiêu *in vitro* sau thời gian huấn luyện (hàng trên) và trong vườn ươm sau 4 tuần trồng (hàng dưới) tương ứng với các khoảng thời gian huấn luyện khác nhau.

Như vậy, thời gian huấn luyện cây hồ tiêu *in vitro* trong vườn ươm thích hợp nhất là 14 ngày. Tương tự với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ sống của keo lá tràm *in vitro* tăng đáng kể nếu cây con trong bình nuôi được huấn luyện ở vườn ươm trong 14 ngày [13]. Trong khi đó, cây nguru tất *in vitro* yêu cầu 10 ngày [14], lan hoàng thảo kền yêu cầu 7 ngày [15] và gừng cần 4 ngày [16] huấn luyện ở vườn ươm để nâng cao tỷ lệ sống cũng như tăng khả năng sinh trưởng của cây. Có thể thấy, mỗi một đối tượng cây trồng khác nhau yêu cầu thời gian huấn luyện trong vườn ươm là hoàn toàn khác nhau.

4.2. Ảnh hưởng của khối lượng cây hồ tiêu *in vitro* đến khả năng sinh trưởng của cây giai đoạn vườn ươm

Theo lý thuyết, các cây *in vitro* hoàn chỉnh, có đầy đủ thân, lá và rễ đều có thể đưa ra trồng ở vườn ươm [19]. Song trên thực tế, nếu đưa cây *in vitro* chưa đạt đủ các tiêu chuẩn cụ thể ra trồng, cây sinh trưởng yếu ngay từ giai đoạn đầu và không thể phục hồi để sinh trưởng tốt ở các giai đoạn sau. Bên cạnh chiều cao, số lá và rễ thì khối lượng cây là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá tiêu chuẩn của cây *in vitro* trước khi đưa ra trồng ở vườn ươm.

Kết quả theo dõi sau 6 tuần trồng được trình bày ở bảng 2 cho thấy, tỷ lệ cây sống và tốc độ sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* tăng tỷ lệ thuận với khối lượng ban đầu. Các cây có khối lượng nhỏ (0,4-0,6 g/cây), khi trồng ra vườn ươm cho tỷ lệ sống sót (76,30%), chiều cao cây gia tăng (0,43 cm), số lá mới (1,23 lá) và chiều dài rễ (4,03 cm) đạt được thấp nhất. Kết quả bảng 2 và hình 2 cho thấy, 2 chỉ tiêu phản ánh diện tích lá (liên quan trực tiếp đến quá trình quang hợp và sự tích lũy chất hữu cơ trong cây) là chiều dài và chiều rộng lá ở các cây hồ tiêu có khối lượng ban đầu 0,4-0,6 g/cây (tương ứng đạt 2,53 và 1,23 cm) cũng thấp hơn so với các cây có khối lượng lớn (0,7-1,2 g/cây), tương ứng đạt 3,13-3,33 và 2,23-2,47 cm. Những cây hồ tiêu *in vitro* có khối lượng 0,7-0,9 g/cây khi trồng ở vườn ươm cho tỷ lệ sống cao (90,37%), các chỉ tiêu sinh trưởng tốt, nhưng sự sai khác không có ý nghĩa thống kê so với những cây có khối lượng lớn hơn (1,0-1,2 g/cây).

Bảng 2. Ảnh hưởng của khối lượng cây đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong vườn ươm sau 6 tuần trồng.

Khối lượng cây (g/cây)	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)
0,4-0,6	76,30 ^c	0,43 ^c	1,23 ^b	2,53 ^b	1,23 ^b	4,03 ^b
0,7-0,9	90,37 ^a	0,87 ^b	1,90 ^a	3,13 ^a	2,23 ^a	6,87 ^a
1,0-1,2	91,13 ^a	1,00 ^a	2,03 ^a	3,33 ^a	2,47 ^a	7,10 ^a
CV (%)	5,98	5,32	7,48	10,12	8,12	5,71

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác nhau giữa các nghiệm thức, $p < 0,05$; CV: hệ số biến thiên.



Hình 2. Cây hồ tiêu *in vitro* sinh trưởng sau 6 tuần trên giá thể đất và xơ dừa (tỷ lệ 1:1) tương ứng với khối lượng cây ban đầu khác nhau.

Nghiên cứu của L.T.T. Hang (2015) [20] trên cây hoa chuông cho thấy, khối lượng cây giống *in vitro* ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây trong giai đoạn vườn ươm và khối lượng cây tối thiểu cần phải đạt được là 0,6-0,9 g/cây. Để đảm bảo cho cây hồ tiêu *in vitro* thích nghi và sinh trưởng tốt ở giai đoạn vườn ươm, đồng thời rút ngắn thời gian nuôi cây trong phòng thí nghiệm, chúng tôi đề xuất lựa chọn các cây giống hồ tiêu *in vitro* có khối lượng 0,7-0,9 g/cây, tương ứng với chiều cao cây khoảng 4,5-5,5 cm, có 4-5 lá và ≥ 4 rễ/cây, cây sinh trưởng mạnh, thân mập, lá dày và xanh.

4.3. Ảnh hưởng của giá thể bầu ươm đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây giống hồ tiêu *in vitro*

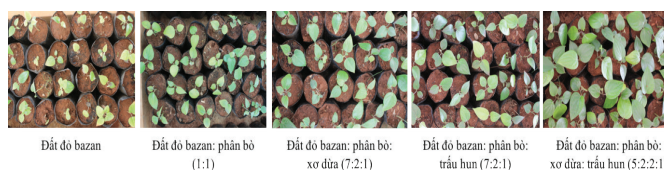
Giá thể không chỉ giúp cây bám rễ, đứng vững mà còn tích trữ nước và chất dinh dưỡng để cung cấp cho cây, đồng thời còn ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ sống cũng như sự tăng trưởng của cây. Do vậy, xác định được giá thể tiếp nhận cây thích hợp có ý nghĩa quyết định đến thành công của quy trình nhân giống *in vitro*. Trong thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của một số giá thể bầu ươm cây đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*. Các nghiệm thức giá thể được lựa chọn khảo sát trong thí nghiệm này thỏa mãn các tiêu chí đảm bảo độ thông thoáng và chứa lượng chất dinh dưỡng nhất định, cho tỷ lệ cây sống cao, sinh trưởng tốt, đồng thời có giá thành rẻ để tối ưu hiệu quả kinh tế.

Kết quả sau 8 tuần theo dõi cho thấy, khi sử dụng giá thể bầu ươm cây với thành phần 100% đất đỏ bazan cho tỷ lệ cây hồ tiêu *in vitro* sống (43,81%) cũng như các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây là thấp nhất (bảng 3). Bổ sung các thành phần chất độn bầu như phân bò, xơ dừa, trấu hun đã làm tăng tỷ lệ sống của cây hồ tiêu *in vitro* (64,53-86,72%), đồng thời sự gia tăng về chiều cao, số lá, chiều dài và chiều rộng lá, chiều dài rễ cũng cao hơn. Trong các giá thể khảo sát, giá thể bầu ươm gồm đất đỏ bazan, phân bò, xơ dừa và trấu hun (tỷ lệ 5:2:2:1) cho tỷ lệ cây sống (86,72%), chiều cao cây gia tăng (2,93 cm), số lá mới (2,59 lá/cây), chiều dài lá (5,4 cm), chiều rộng lá (3,25 cm) và chiều dài rễ (8,95 cm) đạt cao nhất. Mặt khác, các cây trồng trên giá thể này phát triển tốt, cây cao, lá to, dày và có màu xanh đậm (hình 3). Điều này có thể giải thích là do xơ dừa và trấu hun tạo nên độ thông thoáng cho giá thể, giúp cây hút nước và dinh dưỡng thuận lợi, phân bò hoại mục bổ sung độ mùn và dinh dưỡng trong khi trấu hun giúp cây hạn chế được nấm bệnh.

Bảng 3. Ảnh hưởng của giá thể bầu ươm đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* sau 8 tuần trồng.

Giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)
Đất đỏ bazan	43,81 ^d	0,42 ^d	1,07 ^c	3,27 ^b	1,16 ^c	5,37 ^c
Đất đỏ bazan: phân bò (1:1)	64,53 ^c	1,82 ^c	2,37 ^b	5,23 ^a	2,89 ^b	7,37 ^b
Đất đỏ bazan: phân bò: xơ dừa (7:2:1)	77,67 ^b	1,96 ^b	2,46 ^b	5,31 ^a	3,21 ^a	7,95 ^b
Đất đỏ bazan: phân bò: trấu hun (7:2:1)	75,00 ^b	1,88 ^{bc}	2,42 ^b	5,23 ^a	3,21 ^a	7,79 ^b
Đất đỏ bazan: phân bò: xơ dừa: trấu hun (5:2:2:1)	86,72 ^a	2,93 ^a	2,59 ^a	5,40 ^a	3,25 ^a	8,95 ^a
CV (%)	4,98	3,62	5,17	3,89	5,30	4,68

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác nhau giữa các nghiệm thức, $p < 0,05$.



Hình 3. Cây hồ tiêu *in vitro* trên các giá thể khác nhau trong bầu ươm sau 8 tuần.

Đã có một số nghiên cứu khảo sát loại giá thể phù hợp để trồng cây hồ tiêu *in vitro* trên thế giới. V.M. Verma (2019) [11] sử dụng giá thể đất đã khử trùng trộn với vermiculite theo tỷ lệ 1:1 để trồng cây hồ tiêu *in vitro* trong vườn ươm có nhiệt độ dao động 26-28°C, độ ẩm 50-55%. Tuy nhiên, tỷ lệ cây sống sót ghi nhận sau 10 tuần trồng chỉ đạt 68%. Trong khi đó, theo nghiên cứu của X. Meng và cs (2021) [2], giá thể thích hợp nhất để trồng cây hồ tiêu *in vitro* là đất bùn, đất cát, xơ dừa (tỷ lệ 1:1:2) cho tỷ lệ cây sống đạt cao nhất là 89,6% khi được trồng ở vườn ươm với nhiệt độ 28-33°C, độ ẩm 95-99% [2]. Trong 5 loại giá thể khảo sát trong nghiên cứu này, giá thể gồm đất, phân bò, xơ dừa và trấu hun (tỷ lệ 5:2:2:1) là phù hợp nhất để trồng cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm.

4.4. Ảnh hưởng của phân bón NPK đến khả năng sinh trưởng của cây giống hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm

Thời gian sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm trước khi xuất vườn khá dài, nên nhu cầu dinh dưỡng của cây là rất cao. Phân Nupe phát triển bởi Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên là một sản phẩm phân bón lá chuyên dùng cho cây hồ tiêu; tuy nhiên, theo quan sát của chúng tôi trong quá trình trồng và chăm sóc cây hồ tiêu, nếu chỉ sử dụng phân bón lá Nupe thì cây sinh trưởng, phát triển chậm, lá có màu xanh nhạt và có những biểu hiện của thiếu dinh dưỡng khoáng đa lượng. Để hạn chế vấn đề này, bổ sung dinh dưỡng đa lượng thêm cho cây hồ tiêu ở giai đoạn vườn ươm thông qua phân bón rễ là cần thiết.

Kết quả sau 20 tuần theo dõi cho thấy, bổ sung phân bón NPK (16:16:8) có hiệu quả rõ rệt đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm. Khi chỉ sử dụng phân bón lá Nupe 0,2%, cây tăng thêm chiều cao 7,96 cm và 4,23 lá mới, chiều dài và chiều rộng lá đạt tương ứng 4,1 và 3,5 cm, chiều dài rễ đạt 9,07 cm. Bổ sung phân bón NPK đã làm tăng đáng kể các chỉ số về tăng trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm. Cụ thể, chiều cao cây tăng thêm dao động 9,67-17,60 cm, số lá mới đạt 3,87-5,93 lá, chiều dài và chiều rộng lá lần lượt đạt 8,67-11,2 và 5,90-7,77 cm, chiều dài rễ là 16,81-19,73 cm. Các chỉ tiêu tăng trưởng đạt cao nhất ở nghiệm thức bón phân NPK 0,2 và 0,3% (bảng 4).

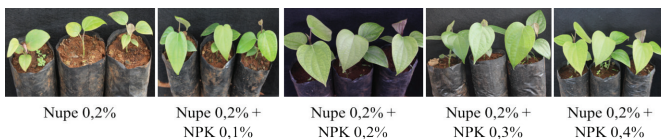
Bảng 4. Ảnh hưởng của phân bón NPK đến khả năng sinh trưởng của cây giống hồ tiêu *in vitro* giai đoạn vườn ươm sau 20 tuần trồng.

Phân bón	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Hàm lượng diệp lục (CCI)	Khối lượng tươi (g/cây)	Khối lượng khô (g/cây)
Nupe 0,2% (đối chứng)	7,96 ^d	4,23 ^c	4,10 ^c	3,50 ^c	9,07 ^c	16,42 ^d	3,44 ^d	0,25 ^d
NPK 0,1%	10,84 ^b	5,00 ^b	10,70 ^a	6,07 ^b	17,23 ^b	41,40 ^b	7,65 ^{bc}	0,60 ^b
Nupe 0,2%	17,60 ^a	5,93 ^a	11,20 ^a	7,77 ^a	19,73 ^a	45,93 ^a	8,50 ^a	0,72 ^a
NPK 0,3%	16,93 ^a	5,90 ^a	10,87 ^a	7,47 ^a	18,32 ^a	44,42 ^a	8,30 ^{ab}	0,69 ^a
NPK 0,4%	9,67 ^c	3,87 ^c	8,67 ^b	5,90 ^b	16,81 ^b	29,80 ^c	7,47 ^c	0,51 ^c
CV (%)	2,89	4,08	5,67	9,02	7,60	3,81	5,78	4,69

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác nhau giữa các nghiệm thức, $p < 0,05$.

Hàm lượng diệp lục là một trong những chỉ tiêu quyết định lớn đến khả năng quang hợp của cây trồng. Số liệu bảng 4 cho thấy, chỉ số hàm lượng chất diệp lục ghi nhận ở lá cây hồ tiêu được bón bổ sung phân NPK cao gấp 1,8-2,8 lần so với nghiệm thức đối chứng chỉ bón phân Nupe 0,2%. Trong các nghiệm thức bón phân NPK, chỉ số hàm lượng chất diệp lục trong lá cây hồ tiêu đạt cao nhất ở nghiệm thức bón NPK 0,2 và 0,3% (tương ứng 45,93 và 44,92), theo sau là nghiệm thức bón NPK 0,1% (41,40) và thấp nhất là nghiệm thức bón NPK 0,4% (29,80). Mặt khác, hai chỉ tiêu phản ánh khả năng tích lũy hợp chất hữu cơ gồm khối lượng tươi và khối lượng khô của cây hồ tiêu khi được bón bổ sung NPK cao hơn so với đối chứng cũng phản ánh đúng sự tăng trưởng của cây và hàm lượng chất diệp lục trong lá. Cụ thể, nghiệm thức bón bổ sung NPK 0,2 và 0,3% cho khối lượng tươi (8,50 và 8,30 g/cây) và khối lượng khô (0,72 và 0,69 g/cây) đạt được cao nhất, trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng, hai chỉ số này đạt được thấp nhất, tương ứng 3,44 và 0,25 g/cây (bảng 4).

Về mặt hình thái, cây hồ tiêu ở nghiệm thức đối chứng sinh trưởng chậm, cây nhỏ, lá bé, mỏng, có màu xanh nhạt hoặc hơi vàng, trong khi đó, cây hồ tiêu ở các nghiệm thức bổ sung NPK sinh trưởng mạnh, cây lớn, lá to, dày và có màu xanh đậm (hình 4).



Hình 4. Cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm khi được bón NPK ở các nồng độ khác nhau sau 12 tuần.

Nhìn chung, việc bón bổ sung NPK cho cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm có tác dụng tích cực đến sự sinh trưởng của cây, tuy nhiên tốc độ tăng trưởng của cây phụ thuộc vào nồng độ NPK sử dụng. Trong 4 nồng độ NPK khảo sát,

nồng độ cho hiệu quả cao nhất đối với sự trưởng của cây hồ tiêu là 0,2-0,3%, thấp hơn (0,1%) hay cao hơn (0,4%) đều cho hiệu quả kém hơn. Điều này có thể là do bón phân NPK ở nồng độ thấp (0,1%) chưa đủ đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của cây, trong khi đó bổ sung quá nhiều NPK (0,4%) làm nồng độ dịch đất cao hơn nồng độ dịch bào, kết quả cây không hút được nước bằng cơ chế thẩm thấu, gây ảnh hưởng tiêu cực đến sinh trưởng của cây.

Do các chỉ tiêu tăng trưởng của cây hồ tiêu giữa nghiệm thức bón phân NPK 0,2 và 0,3% không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê nên để tiết kiệm chi phí, chúng tôi đề xuất chế độ bón phân cho cây hồ tiêu *in vitro* là sử dụng phân bón lá Nupe 0,2% xen kẽ với NPK 0,2%. Với chế độ bón phân này, cây hồ tiêu *in vitro* sau khi trồng trong bầu ươm 5 tháng sẽ đạt các chỉ tiêu về sinh trưởng có thể xuất vườn như chiều cao ≥ 20 cm, có 8-10 lá, lá to và có màu xanh đậm, cây sinh trưởng khỏe mạnh (hình 5).



Hình 5. Cây hồ tiêu Vĩnh Linh nguồn gốc nuôi cấy mô trong bầu ươm trước khi xuất vườn.

5. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đề xuất quy trình kỹ thuật trồng cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro* giai đoạn vườn ươm như sau:

- Tiêu chuẩn cây giống hồ tiêu *in vitro* khi đưa ra vườn ươm đạt khối lượng tươi 0,7-0,9 g/cây, tương ứng với chiều cao 4,5-5,5 cm, 4-5 lá/cây, ≥ 4 rễ/cây, cây sinh trưởng mạnh, thân mập, lá dày và xanh.

- Huấn luyện cây *in vitro* làm quen với môi trường tự nhiên bằng cách đặt bình cây trong nhà lưới 14 ngày giúp cây đạt tỷ lệ sống cao nhất (91,97%) và sinh trưởng tốt.

- Giá thể bầu ươm cây hồ tiêu *in vitro* thích hợp nhất là đất đỏ bazan, phân bò, xơ dừa và trấu hun theo (tỷ lệ 5:2:2:1), cây sống đạt 86,72% và sinh trưởng tốt.

- Sử dụng phân bón rễ NPK (16:16:8) 0,2% xen kẽ với phân bón lá Nupe 0,2%, định kỳ 2 tuần/lần là chế độ bón phân thích hợp nhất cho cây hồ tiêu *in vitro* trồng trong bầu ươm.

- Cây hồ tiêu nguồn gốc nuôi cấy mô sau khi trồng 5 tháng trong bầu ươm sẽ đạt tiêu chuẩn xuất vườn như sau: cây có chiều cao ≥ 20 cm, 8-10 lá, lá to, xanh đậm, cây sinh trưởng khỏe mạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Hiep (2021), "Pepper market report for the second quarter of 2021", *VietnamBiz*, <https://mediacdn.vietnambiz.vn/171464876016439296/2022/1/26/bao-cao-thi-truong-ho-tieu-nam-2021-16431913548701959763039.pdf>, accessed 20 July 2021 (in Vietnamese).
- [2] X. Meng, Y. Wang, A.G. Watson (2021), "In vitro derived black pepper plants used to establish a plantation", *Journal of Horticulture*, **9**(4), pp.1-6.
- [3] P.K. Gupta, R. Timmis, A.F. Mascarenhas (1991), "Field performance of micropropagated forestry species", *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **27**, pp.159-164, DOI: 10.1007/BF02632210.
- [4] V.H. Mathews, P.S. Rao (1984), "In vitro responses of black pepper (*Piper nigrum*)", *Current Science*, **53**(4), pp.183-186.
- [5] J. Philip, D. Joseph, G.S. Triggs, et al. (1992), "Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures", *Plant Cell Reports*, **12**, pp.41-44, DOI: 10.1007/BF00232421.
- [6] A.P.G.B. Chandrasekara, Y.M.H.B. Yapabandara, P.A. Weerasinghe (2011), *In vitro propagation of locally selected black pepper (Piper nigrum L.)*, Proceeding of the Undergraduate Research Symposium, Rajarata University of Sri Lanka.
- [7] L. Hussain, S. Naz, H. Nazir, et al. (2011), "Tissue culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Pakistan", *Pakistan Journal of Botany*, **43**(2), pp.1069-1078.
- [8] K.N. Babu, M. Divakaran, G. Yamuna, et al. (2016), "Protocols for improvement of black pepper (*Piper nigrum* L.) utilizing biotechnological tools", *Methods in Molecular Biology*, **1391**, pp.367-385, DOI: 10.1007/978-1-4939-3332-7_26.
- [9] S. Khan, T.A. Banu, M. Islam, et al. (2017), "In vitro regeneration of *Piper nigrum* L.", *Bangladesh Journal of Botany*, **46**(2), pp.789-793.
- [10] N.T. Mai, N.T.T. Ngoc, T.T.H. Anh, et al. (2020), "Building of propagation procedure for free disease black pepper by tissue culture", *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **3**(112), pp.9-14 (in Vietnamese).
- [11] V.M. Verma (2019), "Black pepper: Health benefits, in vitro multiplication, and commercial cultivation", *Medicinal Plants*, pp.111-127, DOI: 10.1007/978-3-030-31269-5_5.
- [12] B.N. Hazarika (2003), "Acclimatization of tissue-cultured plants", *Current Science Association*, **85**(12), pp.1704-1712.
- [13] N.V. Viet, T.V. Ha, K.T. Ha, et al. (2019), "Application of in vitro culture techniques in propagating some strains of acacia melaleuca leaves (*Acacia auriculiformis*)", *Journal of Forestry Science and Technology*, **4**, pp.25-32 (in Vietnamese).
- [14] T.T. Thoi, N.T.H. Gam, L.T. Man (2019), "Research on in vitro propagation of burdock tree (*Achyranthes bidentate* Blume)", *Journal of Forestry Science and Technology*, **4**, pp.19-24 (in Vietnamese).
- [15] N.V. Viet (2017), "Applying in vitro culture techniques in propagating royal trumpet orchids (*Dendrobium lituiflorum* Lindley)", *Journal of Forestry Science and Technology*, **4**, pp.39-45 (in Vietnamese).
- [16] T.T. Duong, L.K. Tuong, P.T. Hanh (2019), "Research on in vitro plant care techniques for ginger variety G10 in nurseries", *Journal of Forestry Science and Technology*, **2**(99), pp.22-27 (in Vietnamese).
- [17] H.T. The, N.T.P. Thao, N.T. Thao, et al. (2013) "Process of in vitro propagation of Tricot plant (*Morinda officenalis* How)", *Journal of Science and Development*, **11**(3), pp.285-292 (in Vietnamese).
- [18] J. Palee, S. Dheeranupattana, A. Jatisatienr, et al. (2012), "Influence of plantlet age and different soilless culture on acclimatization of *Stemona curtisii* Hook.f.", *Asian Journal of Plant Sciences*, **11**(6), pp.294-299, DOI: 10.3923/ajps.2012.294.299.
- [19] U. Sharma, V. Kataria, N.S. Shekhawat (2017), "In vitro propagation, ex vitro rooting and leaf micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: A leguminous tree with medicinal values", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **23**(4), pp.969-977, DOI: 10.1007/s12298-017-0459-2.
- [20] L.T.T. Hang (2015), *Research on In Vitro Breeding Techniques and Planting of Bellflower (Sinningia Speciosa) in Thua Thien Hue Province*, Doctoral thesis in agriculture, Hue University of Agriculture and Forestry, Hue University (in Vietnamese).