

KHẢ NĂNG TẠO CÂY TỪ PHÔI VÔ TÍNH VÀ BƯỚC ĐẦU ÁP DỤNG KỸ THUẬT GIÂM CÀNH *EX VITRO* TRONG NHÂN GIỐNG CÂY TIÊU (*Piper nigrum* L.)

Tô Thị Nhã Trâm¹, Hồ Ngọc Hân¹, Nguyễn Thị Kim Linh¹, Hoàng Văn Cường²,
Hoàng Xuân Chiến², Lê Đình Đôn¹, Dương Tấn Nhựt^{2*}

¹Trường Đại học Nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Email*: duongtannhut@gmail.com

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 20.09.2014

TÓM TẮT

Với mục đích tạo cây tiêu sạch bệnh, cung cấp nguồn giống khỏe mạnh cho người dân trồng tiêu, chúng tôi đã áp dụng các kỹ thuật tạo phôi vô tính và giâm cành *ex vitro* trong nhân giống cây tiêu, bước đầu xây dựng quy trình tạo cây tiêu sạch virus. Kết quả thu được cho thấy môi trường MS có bổ sung 0,05 mg/l TDZ kết hợp với 1,0 mg/l IBA cho tỉ lệ tạo phôi cao nhất (73,2%) và môi trường MS có bổ sung 3 mg/l BA cho tỉ lệ tạo chồi cao nhất (66,7%) từ mô sẹo lá tiêu sau 60 và 28 ngày nuôi cấy, theo thứ tự. Đối với cành giâm từ cây *ex vitro*, chế độ tưới nước 6 lần/ngày cho khả năng tạo rễ tốt nhất. Ở giai đoạn vườn ươm, cây tiêu giâm cành được phun sương 3 lần/ngày có tỉ lệ sống và sinh trưởng tốt nhất.

Từ khóa: BA, giâm cành, *Piper nigrum* L., sự phát sinh phôi, TDZ.

Application of Somatic Embryogenesis and *Ex Vitro* Stem Cutting Technology in Propagation of *Piper nigrum* L.

ABSTRACT

This study examined the application of somatic embryogenesis and *ex vitro* stem cutting techniques for production of high quality and virus-free *Piper nigrum* planting materials. The results indicated that MS medium supplemented with 0.05 mg/l TDZ and 1.0 mg/l IBA was best for embryo induction with a rate of 73.2% and MS medium containing 3 mg/l BA gave the highest rate of shoot formation (66,7%) from leaf callus after 60 and 28 days of culture, respectively. Cuttings taken from *ex vitro* plants produced healthy root system when watered 6 times daily. Plants raised from these cuttings thrived best when misted 3 times a day.

Keywords: BA, cutting, embryogenesis, *Piper nigrum* L., TDZ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây tiêu (*Piper nigrum* L.) là cây gia vị được ưa chuộng khắp mọi nơi trên thế giới, đây cũng là một trong những mặt hàng xuất khẩu trọng yếu, mang lại nhiều lợi nhuận cho người nông dân Việt Nam. Nhiều vùng ở nước ta có khí hậu thích hợp cho phát triển cây tiêu. Tuy nhiên, mùa mưa tập trung và mùa nắng kéo dài là những điều kiện rất thuận lợi cho sâu bệnh phát triển, làm giảm năng suất, sản lượng và phẩm chất hạt

tiêu. So với các loại rầy, rệp sáp, tuyến trùng thì bệnh tiêu điên, thối rễ, rụng đốt do virus gây ra là nguy hiểm hơn, ảnh hưởng lớn đến năng suất hạt cây tiêu. Trước đây, tiêu thường được nhân giống bằng các phương pháp truyền thống như: chiết, ghép, giâm cành hoặc bằng hạt. Tuy nhiên, các phương pháp nhân giống này cho hệ số nhân thấp, cây giống khi đem trồng dễ mang theo mầm bệnh, ảnh hưởng lớn đến sản xuất. Vì vậy, nghiên cứu nhân giống vô tính cây tiêu bằng phương pháp nuôi cấy mô có thể mở ra nhiều

triển vọng vì cho hệ số nhân cao, tạo ra các cây giống sạch bệnh có tiềm năng năng suất và phẩm chất tốt như các cây mẹ đã được chọn lọc (true-to-type). Trên thế giới, đã có một số công trình nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây tiêu thông qua nuôi cấy phôi từ đỉnh chồi và đốt thân (Philip et al., 1992; Bhat et al., 1995; Joseph et al., 1996; Nair and Gupta, 2005). Với mục đích nghiên cứu tạo cây tiêu sạch bệnh cũng như nâng cao năng suất, phẩm chất và sản lượng cho cây tiêu, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tạo phôi và chồi từ lá tiêu, bước đầu tái sinh cây con từ chồi *in vitro* và tìm hiểu những yếu tố nâng cao chất lượng các cây *ex vitro* và cảnh giâm từ cây *ex vitro* trong vườn ươm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nguồn mẫu của nghiên cứu này là lá của cây tiêu (*Piper nigrum* L.) nuôi cấy *in vitro*.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tạo mô sẹo từ lá tiêu *in vitro*

Các mẫu lá cây tiêu *in vitro* được cắt thành những mẫu nhỏ (0,4 x 0,4cm) được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 3 mg/l BA (mặt dưới lá tiếp xúc với môi trường), các mẫu cấy được nuôi trong tối 2 tuần, khi những vết cắt bắt đầu xuất hiện mô sẹo, chuyển mẫu ra điều kiện ánh sáng nhẹ (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) để mô sẹo tiếp tục phát triển. Các mô sẹo này được sử dụng làm nguồn mẫu cho nghiên cứu tạo phôi vô tính.

2.2.2. Tạo phôi từ mô sẹo

Khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng phát sinh phôi vô tính từ mô sẹo cây tiêu *in vitro*

Các mẫu mô sẹo cây tiêu được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau nhằm tìm ra môi trường thích hợp nhất cho quá trình phát sinh phôi vô tính từ mô sẹo.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ tạo phôi vô tính (%) sau 60 ngày nuôi cấy.

2.2.3. Tạo chồi từ mô sẹo

Khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng phát sinh chồi từ mô sẹo cây tiêu *in vitro*

Các mẫu mô sẹo cây tiêu được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau nhằm tìm ra môi trường thích hợp nhất cho quá trình phát sinh chồi từ mô sẹo.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%) sau 30 ngày nuôi cấy.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy của hai thí nghiệm trên đây là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose, 9 g/l agar và các chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau tùy thuộc vào từng thí nghiệm. Tất cả môi trường được điều chỉnh về pH 5,7 - 5,8 trước khi đi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1atm trong 30 phút.

Điều kiện nuôi cấy: ánh sáng huỳnh quang với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 55 - 60%.

Các thí nghiệm trên đây được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, ba lần lặp lại, mỗi nghiệm thức cấy 3 bình, mỗi bình cấy 4 mẫu.

2.2.4. Giâm cành từ cây *ex vitro*

Khảo sát ảnh hưởng của chế độ tưới nước đến khả năng sống sót, sinh trưởng và phát triển của cành giâm cây tiêu có nguồn gốc *in vitro*

Các chồi cây tiêu được tạo thành từ thí nghiệm tạo chồi được cấy sang môi trường MS để tạo cây hoàn chỉnh. Sau 8 tuần nuôi cấy, cây con được trồng ngoài vườn ươm. Sau 24 tuần, vào sáng sớm hoặc chiều mát, chọn những cây khỏe, có cành tước dài, cao khoảng 35 - 40cm để cắt thành các đoạn, mỗi đoạn có 2 đốt thân. Ngâm các đoạn cắt này vào dung dịch NAA 20ppm khoảng 15 - 20 phút. Sau đó giâm cành vào các chậu đất.

Cành giâm được chăm sóc với các chế độ tưới khác nhau: phun sương (3 và 6 lần/ngày) và tưới ướt đầm 3 lần/ngày.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống của cành giâm (%), chiều cao chồi mới (cm), số lá mới, số rễ, chiều dài rễ (cm).

2.3. Xử lý số liệu

Xử lý số liệu thu được bằng cách phân tích ANOVA sử dụng phần mềm Statgraphics 7.0 với phép thử Duncan ở mức $P \leq 0,05$ (Duncan, 1995).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng phát sinh phôi vô tính cây tiêu *in vitro*

Sau 60 ngày nuôi cấy, ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến sự phát sinh phôi vô tính từ mô sẹo cây tiêu được thể hiện ở bảng 1. Kết quả thu được cho thấy, các chất điều hòa khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến sự phát sinh phôi từ mô sẹo cây tiêu; trong đó, TDZ giữ vai trò quan trọng.

Kết quả thu được cho thấy, tỷ lệ tạo phôi vô tính cao hơn khi môi trường có bổ sung TDZ; trong đó, tỷ lệ tạo phôi vô tính là cao nhất khi các mẫu mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,05 mg/l TDZ và 1 mg/l IBA (Bảng 1, Hình 1a₅). Môi trường không bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng không xuất hiện sự phát sinh phôi vô tính từ mô sẹo.

Bên cạnh rất nhiều kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật thì phát sinh phôi vô tính là một phương pháp đầy hứa hẹn để cải thiện giống cây trồng. Sự phát sinh phôi vô tính là một cách thức phát sinh hình thái để khảo sát những cơ chế ở mức phân tử và biệt hóa tế bào (Benelli et al., 2001). Ngoài ra, sự phát sinh phôi vô tính

cũng cung cấp một phương pháp khả quan để tạo hạt nhân tạo và là một công cụ hữu ích cho di truyền và bảo quản chất mầm (Litz and Gray, 1995). Sự phát sinh phôi vô tính và tái sinh cây con *in vitro* đã tạo ra nhiều thuận lợi hơn so với phương pháp nhân giống truyền thống (Wang and Bhalla, 2004) như làm giảm thời gian để tạo cây hoàn chỉnh, ngoài ra còn có tác dụng là giảm thiểu tối đa những biến dị di truyền (Fuentes et al., 2000).

TDZ là một chất điều hòa sinh trưởng được biết như là một hợp chất thay thế vừa có hoạt tính của auxin vừa có hoạt tính của cytokinin cần thiết cho sự phát sinh phôi vô tính (Gill et al., 1993). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ phôi thu được cao hơn khi môi trường nuôi cấy có bổ sung TDZ. Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu về tạo phôi vô tính trước đây: TDZ kích thích sự phát sinh phôi vô tính *in vitro* ở cây thuốc lá (Gill and Saxena, 1993), cây phong lữ (Visser et al., 1992), cây đậu phụng (Murthy et al., 1995).

Trong đa số các nghiên cứu về phát sinh phôi vô tính thì auxin, đặc biệt là 2,4-D thường được sử dụng nhiều nhất để kích thích sự hình thành phôi (Umehara and Kamada, 2005; Gumerova et al., 2003). Trong một số trường hợp như ở lúa (Gairi and Rashid, 2004) và *Cucumis melo* L. (Kintzios et al., 2002), việc tiền xử lý với 2,4-D trong 2 hoặc ba ngày rất hiệu quả để kích thích sự phát sinh phôi thứ cấp và tiếp tục được duy trì trong một năm trên môi trường

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo phôi vô tính, quan sát sau 60 ngày nuôi cấy

Thí nghiệm	Nồng độ chất kích thích sinh trưởng (mg/l)						Tỷ lệ tạo phôi vô tính (%) theo thời gian (ngày)		
	BA	2,4D	NAA	Kinitine	TDZ	IBA	20	40	60
P0	0	0	0	0	0	0	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
P1	3	1	0	0	0	0	16,8 ^b	24,1 ^b	30,0 ^b
P2	0	0	1	1	0	0	30,0 ^c	40,2 ^c	45,0 ^c
P3	1	1	0	0	0	0	30,0 ^c	45,0 ^d	49,8 ^d
P4	0	0	0	0	0,05	1	40,2 ^d	54,7 ^f	73,2 ^f
P5	0	0	0	0	0,5	1	40,2 ^d	49,8 ^e	65,9 ^e

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép phân tích Duncan.

cơ bản. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, khả năng kích thích sự phát sinh chồi vô tính của 2,4-D không cao so với các chất điều hòa sinh trưởng khác (Bảng 1, Hình 1a₁₋₆).

Như vậy, môi trường MS có bổ sung 0,05 mg/l TDZ và 1 mg/l IBA là môi trường thích hợp cho sự phát sinh chồi vô tính từ mô sẹo của cây tiêu.

3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng tạo chồi tiêu *in vitro*

Sau 3 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy, sự phát sinh chồi từ mô sẹo khác nhau khi môi trường bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau ở các nồng độ khác nhau. Tỷ lệ tạo chồi cao ở các nghiệm thức K0, K1, K2 và K3, các môi trường còn lại hầu như ức chế sự phát sinh chồi từ mô sẹo.

Sau 4 tuần nuôi cấy, môi trường có bổ sung 3 mg/l BA là thích hợp nhất cho sự phát sinh chồi với tỷ lệ phát sinh chồi là cao nhất (66,7%). Các mô sẹo nuôi cấy trên hai môi trường ở nghiệm thức K4 và K6 hầu như không phát sinh chồi, các mẫu mô sẹo đều bị đen một số chồi xuất hiện trước đó đều chết (Bảng 2, Hình 1b_{5,7}). Điều này có thể là do nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng quá cao, không thích hợp cho sự sinh trưởng của mẫu cây tiêu.

Kết quả thu được cũng cho thấy, BA ở nồng độ cao kích thích sự phát sinh chồi từ mô sẹo

của cây tiêu trong 3 tuần nuôi cấy đầu tiên. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ phát sinh chồi cao ở môi trường có bổ sung BA ở nồng độ thấp hơn, các nồng độ BA cao dần ức chế sự phát sinh chồi (Bảng 1).

Trong thời gian gần đây, TDZ được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô do hoạt tính auxin và cytokinin cao hơn hẳn so với các auxin và cytokinin thông thường. Kharwar (2003) đã thu được một số lượng lớn chồi bất định khi nuôi cấy các mẫu khác nhau của giống *Lens culinaris* Medik trên môi trường có bổ sung TDZ và kết quả cho thấy rằng nồng độ TDZ ở nồng độ thấp sẽ kích thích quá trình tái sinh chồi tốt hơn ở nồng độ cao. Trong nghiên cứu này, TDZ được sử dụng ở các nồng độ cao cũng hạn chế khả năng phát sinh chồi từ mô sẹo và cho tỷ lệ phát sinh chồi thấp hơn so với các môi trường bổ sung BA.

Như vậy, từ kết quả thu được cho thấy môi trường MS có bổ sung 3 mg/l BA thích hợp nhất cho sự phát sinh chồi từ mô sẹo cây tiêu sau 4 tuần nuôi cấy.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của chế độ tưới nước đến khả năng sống sót, sinh trưởng và phát triển của cành giâm

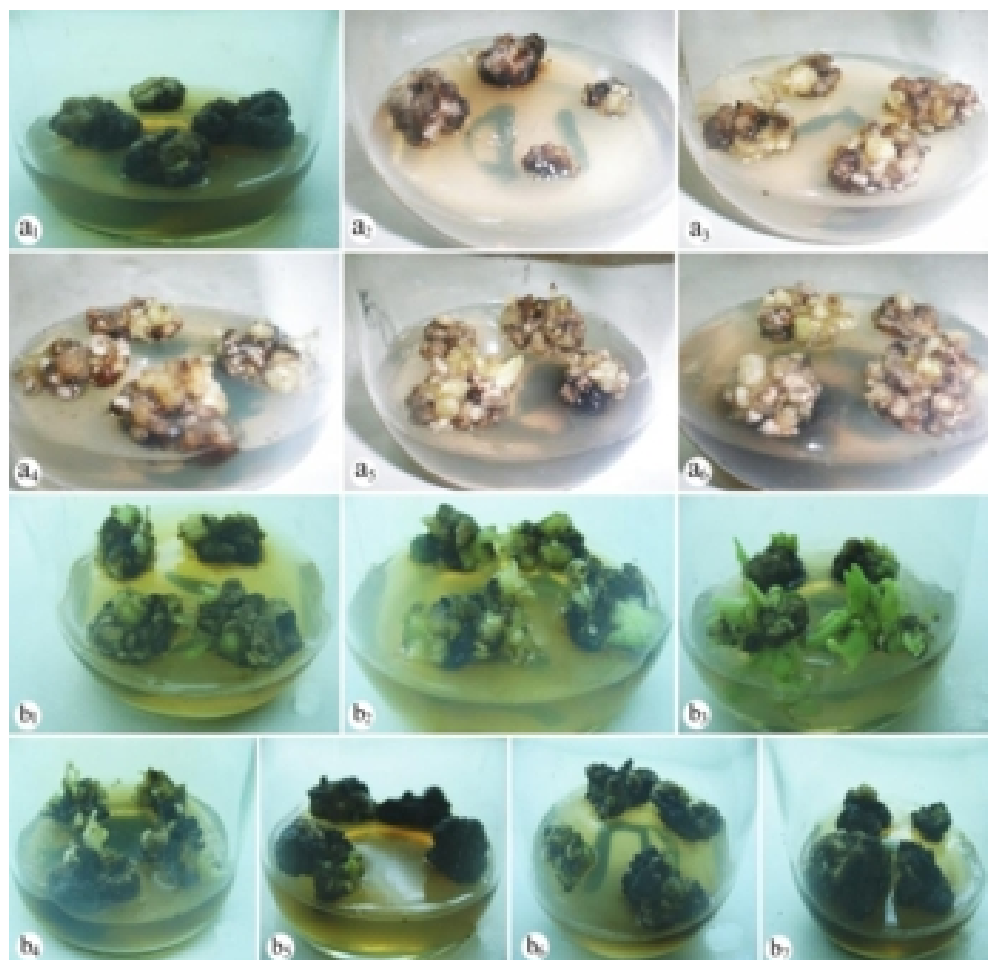
Cây tiêu nuôi cấy *in vitro* được chuyển ra vườn ươm đạt tỷ lệ cây sống cao (100%) sau 4 tuần trồng. Các cây này sau đó được sử dụng để cắt các đoạn giâm (Hình 2 a₁₋₃).

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo chồi từ mô sẹo của cây tiêu

Nghiệm thức	Nồng độ chất kích thích sinh trưởng (mg/l)			Tỷ lệ tạo chồi (%) theo thời gian (tuần)		
	BA	IBA	TDZ	2	3	4
K0	3	0	0	16,7 ^c	33,3 ^b	66,7 ^e
K1	10	1	0	16,7 ^c	50,0 ^c	50,0 ^d
K2	20	1	0	33,3 ^e	66,7 ^d	50,0 ^d
K3	1	10	0	25,0 ^d	50,0 ^c	25,0 ^c
K4	1	20	0	0,0 ^a	8,3 ^a	0,0 ^a
K5	0	1	1	16,7 ^c	8,3 ^a	8,3 ^b
K6	0	1	2	8,3 ^b	8,3 ^a	0,0 ^a

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép phân tích Duncan.

Khả năng tạo cây từ phôi vô tính và bước đầu áp dụng kỹ thuật giâm cành *ex vitro* trong nhân giống cây tiêu (*Piper nigrum* L.)



Hình 1. Sự phát sinh phôi vô tính và chồi từ mô sẹo cây tiêu *in vitro*

Ghi chú: a₁, a₂, a₃, a₄, a₅, a₆: Sự hình thành phôi vô tính từ mô sẹo cây tiêu sau 60 ngày nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (tương ứng với các nghiệm thức P0 - P5). b₁, b₂, b₃, b₄, b₅, b₆, b₇: Sự hình thành chồi từ mô sẹo cây tiêu sau 4 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (tương ứng với các nghiệm thức K0 - K6).

Cành giâm lúc mới cắt khỏi thân cây mẹ chưa có rễ nên khả năng hút nước từ trong đất rất kém; trong khi đó, các bộ phận phía trên mặt đất vẫn tiến hành quá trình thoát hơi nước, gây ra sự thiếu bão hòa nước trong cành giâm làm cành bị héo. Nếu hiện tượng này kéo dài

trong 3 ngày đầu giâm cành thì cành sẽ bị mất nước, không có khả năng ra rễ và sẽ chết khoảng sau 7 ngày giâm. Vì vậy, đối với công tác giâm cành, việc tưới nước để giữ ẩm độ bề mặt lá, hạn chế sự thoát hơi nước là khâu quan trọng nhất, đảm bảo tỉ lệ cành giâm sống cao.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chế độ tưới đến tỉ lệ sống của cây tiêu giâm cành

Nghiệm thức	Tỉ lệ sống (%) ở các thời điểm theo dõi			
	10 ngày	20 ngày	30 ngày	40 ngày
Tưới ướt đầm 3 lần/ngày	82,2 ^a	80,0 ^a	80,0 ^a	80,0 ^a
Tưới phun sương 3 lần/ngày	84,4 ^a	82,2 ^a	81,7 ^a	81,7 ^a
Tưới phun sương 6 lần/ngày	93,9 ^b	93,3 ^b	93,3 ^b	93,3 ^b

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép phân tích Duncan.

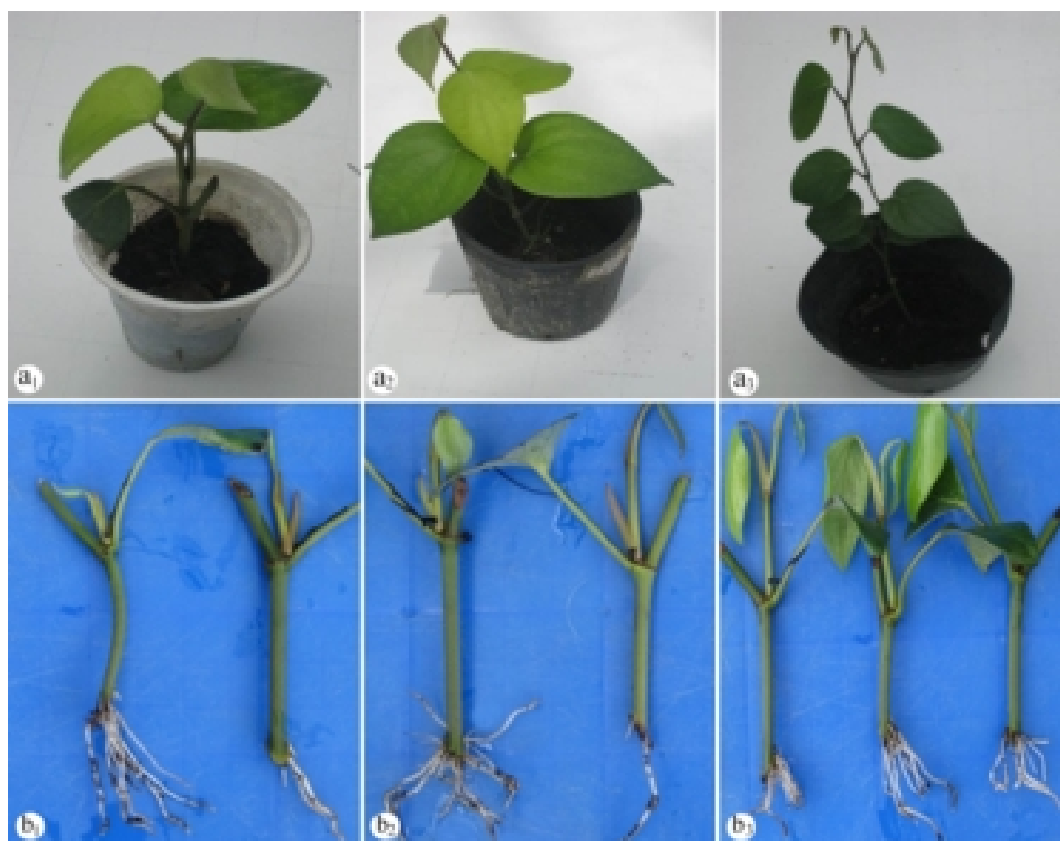
Bảng 4. Ảnh hưởng của chế độ tưới nước đến sự sinh trưởng và phát triển của cành giâm sau 40 ngày trồng

Nghiem thức	Số lá mới	Chiều cao chồi mới (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
Tưới đẫm 3 lần/ngày	1,17 ^a	3,46 ^a	8,98 ^a	5,64 ^a
Phun sương 3 lần/ngày	1,18 ^a	3,67 ^a	9,28 ^a	5,92 ^a
Phun sương 6 lần/ngày	1,98 ^b	4,19 ^b	10,31 ^b	8,47 ^b

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a,b...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép phân tích Duncan.

Kết quả bảng 3 cho thấy, chế độ phun sương 6 lần/ngày cho tỉ lệ cành giâm sống cao hơn so với 2 chế độ tưới còn lại. Sau 10 ngày giâm cành cho thấy tỷ lệ sống sót có sự khác biệt giữa các chế độ tưới. Ở 20 ngày và 30 ngày sau khi giâm, số cành giâm sống có giảm nhưng không đáng kể. 40 ngày sau giâm, số cành giâm sống đã dần ổn định. Trong đó, chế độ tưới nước phun sương 6 lần/ngày có tỉ lệ cành giâm sống cao nhất

(93,3%), chế độ tưới nước ở dạng ướt đẫm 3 lần/ngày có tỉ lệ cành giâm sống thấp nhất (80%). Chế độ tưới nước ở dạng phun sương rất thích hợp cho cành giâm mau ra rễ và đâm chồi mới, hạn chế lượng nước ứ đọng trong các chậu chứa cành giâm, các mầm bệnh ít tồn tại, do đó tỷ lệ cành giâm sống cao. Bên cạnh đó, chế độ tưới nước ở dạng phun sương 6 lần/ngày làm cành giâm luôn được giữ ẩm, không bị khô so với



Hình 2. Sự sinh trưởng của cây tiêu ngoài vườn ươm và sự ra rễ của các cành giâm

Ghi chú: a₁, a₂, a₃: Sự sinh trưởng của cây tiêu ngoài vườn ươm (sau 4, 12 và 30 tuần trồng trong vườn ươm). b₁, b₂, b₃: Sự ra rễ của các cành giâm cây tiêu sau 40 ngày với các chế độ tưới khác nhau (Tưới ướt đẫm 3 lần/ngày; tưới phun sương 3 lần/ngày; tưới phun sương 6 lần/ngày).

chế độ tưới nước ở dạng phun sương 3 lần/ngày nên số cành giâm sống nhiều hơn (Bảng 3). Đối với chế độ tưới nước ở dạng ướm dầm 3 lần/ngày, số cành giâm sống ít do lượng nước ứ đọng trong các chậu chứa cành giâm khá nhiều làm cành giâm bị úng nước, lâu ngày sẽ chết; đồng thời cũng tạo điều kiện tốt cho các loại nấm phát triển, làm giảm sự đâm chồi mới; trong khi đó các lá già vẫn tiến hành thoát hơi nước dẫn đến sự thiếu hụt nước trong cành làm cành giâm bị héo nhanh, suy yếu dần và chết. Sau 40 ngày giâm cành, chồi mới trên các cành giâm đã vươn cao và phát triển mạnh, các lá mới cũng đã hình thành và dần to lên, biểu hiện sức sống mạnh mẽ, dễ dàng thích nghi khi đem ra vườn trồng. Kết quả thu được cho thấy thấy các cành giâm khi được tưới nước ở dạng phun sương 6 lần/ngày có số lá mới nhiều nhất (1,98 lá) và chiều cao chồi mới cao nhất (4,19cm); ngược lại, chế độ tưới nước ở dạng ướm dầm 3 lần/ngày cho số lá mới ít nhất (1,17 lá) và chiều cao chồi mới thấp nhất (3,46cm) (Bảng 4, Hình 2 b₁₋₃).

Cành giâm muốn duy trì sự sống và phát triển thì trước tiên phải có rễ. Rễ giúp cành đứng vững, bám chặt vào đất, đồng thời cũng giúp hút nước, chất dinh dưỡng từ đất. Tiêu là loại cây có rễ chùm nên sau thời gian giâm, cành giâm càng mọc nhiều rễ thì cây phát triển càng mạnh, có sức sống cao. Do đó, ngoài việc ngâm cành giâm trong NAA lúc đầu để kích thích ra rễ thì chế độ tưới nước cũng rất cần thiết, tạo môi trường ẩm ướt giúp cành giâm mau ra rễ và tốt nhất là tưới ở dạng phun sương.

Kết quả bảng 4 cho thấy, chế độ tưới nước ở dạng phun sương 6 lần/ngày cho số rễ mới và chiều dài rễ cao hơn so với 2 chế độ tưới còn lại. Trong đó, chế độ tưới nước ở dạng phun sương 6 lần/ngày có số rễ mới nhiều nhất (10,31 rễ) và chiều dài rễ cũng dài nhất (8,47cm), chế độ tưới nước ở dạng ướm dầm 3 lần/ngày có số rễ mới ít nhất (8,98 rễ) và chiều dài rễ ngắn nhất (5,64cm) (Hình 2 b₁).

4. KẾT LUẬN

Các kết quả thu được cho thấy, môi trường MS có bổ sung 0,05 mg/l TDZ và 1 mg/l IBA là

môi trường thích hợp nhất cho sự tạo phôi vô tính từ mô sẹo cây tiêu. Trong khi đó, môi trường MS có bổ sung 3 mg/l BA cho tỉ lệ phát sinh chồi từ mô sẹo cao nhất.

Cành giâm được tưới nước phun sương 6 lần/ngày có tỷ lệ sống, sinh trưởng và phát triển tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M. and Rugini E. (2001). Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). J. Hort. Sci. Biot., 76: 112-119.
- Bhat S.P., Chandel K.P.S. and Malik S.K. (1995). Plant regeneration from various explants of cultivated piper species. Plant Cell Rep., 14: 398-402.
- Duncan D.B. (1995) Multiple range and multiple F test. Biometrics 11: 1-42.
- Fuentes S.R.L., Calheiros M.B.P., Manetti-Filho J. and Vieira L.G.E. (2000). The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 60: 5-13.
- Gairi A. and Rashid A. (2004). TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 76: 29-33.
- Gill R. and Saxena P.K. (1993). Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: Induction by TDZ of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. Plant Cell Rep., 12: 154-159.
- Gill R., Gerrath J.M. and Saxena P.K. (1993). High-frequency direct somatic embryogenesis in thin layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*). Can. J. Bot., 71: 408-413.
- Gumerova E.A., Galeeva E.I., Chuyenkova S.A. and Remyantseva N.I. (2003). Somatic embryogenesis and bud formation on cultured *Fagopyrum esculentum* hypocotyls. Russian J. Plant Physiol., 50: 640-645.
- Joseph B., Joseph D. and Philip V.J. (1996). Plant regeneration from somatic embryos in black pepper. Plant Cell Tiss. Organ. Cult., 47: 87-90.
- Kharwar K.M. (2003) Effects of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. Turk. J. Bot., 28: 421-426.
- Kintzios S., Sereti E., Bluchos P., Drossopoulos J.B., Kitsaki C.K. and Liopa-Tsakalidis A. (2002). Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita*

- pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Rep., 21: 1-8.
- Litz R.E. and Gray D.J. (1995). Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World J. Microbiol. Biotechnol., 11: 416-425.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473-479.
- Murthy B.N.S., Murch S.J. and Saxena P.K. (1995). Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. Plant Physiol., 94: 268-276.
- Nair R.R. and Gupta S.D. (2006). High-frequency plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in black pepper (*Piper nigrum* L.). Plant Cell Rep., 24: 699-707.
- Philip V.J., Joseph D., Triggs G.S. and Dickinson N.M. (1992). Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn) through shoot tip cultures. Plant Cell Rep., 12: 41-44.
- Umehara M. and Kamada H. (2005). Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. Plant Biot., 22: 253-260.
- Visser C., Qureshi J.A., Gill R. and Saxena P.K. (1992). Morpho-regulatory role of thidiazuron substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in *Geranium* hypocotyl cultures. Plant Physiol., 99: 1704-1707.
- Wang Y.H. and Bhalla P.L. (2004). Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian fan flower, *Scaevola aemula* R. Br. Plant Cell Rep., 22: 408-414.