

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SONEXAY RASPHONE

NGHIÊN CỨU GIỐNG HỒ TIÊU (*Piper spp.*)
KHÁNG *Meloidogyne incognita*
BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ Ở VIỆT NAM

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2024

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SONEXAY RASPHONE

NGHIÊN CỨU GIỐNG HỒ TIÊU (*Piper spp.*)
KHÁNG *Meloidogyne incognita*
BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ Ở VIỆT NAM

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PSG.TS. Trương Thị Hồng Hải
2. TS. Nguyễn Quang Cơ

HUẾ, 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan, các kết quả và số liệu được trình bày trong đề tài Luận án Tiến sĩ “Nghiên cứu giống hồ tiêu (*Piper spp.*) kháng *Meloidogyne incognita* bằng chỉ thị phân tử ở Việt Nam” là trung thực và chưa được công bố trong bất cứ công trình nào trước đây. Các bài báo khoa học được công bố với sự đồng ý của các đồng tác giả. Tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm về kết quả nghiên cứu này.

Tất cả sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận án đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận án đã được ghi rõ nguồn gốc.

Huế, tháng 01 năm 2024

Tác giả

SONEXAY RASPHONE

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận án này, em đã nhận được nhiều sự giúp đỡ quý báu và tạo điều kiện của nhiều tập thể và cá nhân:

Trước hết em xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Trương Thị Hồng Hải, TS. Nguyễn Quang Cơ và TS. Nguyễn Văn Phi Hùng đã trực tiếp hướng dẫn chu đáo, tận tình và hiệu quả trong suốt quá trình thực hiện luận án. Em xin được tỏ lòng biết ơn đối với thầy cô.

Xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới: Lãnh Sự Quán CHDCND Lào tại Đà Nẵng, Việt Nam; Phòng Hợp tác quốc tế và đào tạo, Đại học Huế; Phòng Đào tạo và Hợp tác quốc tế, Bộ môn Sinh học, Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng kỹ thuật Y sinh tiến tiến, Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế. Đặc biệt, em xin gửi lời cảm ơn đến sự hỗ trợ học phí từ dự án SSHEP (Lào) và sự hỗ trợ kinh phí thực hiện luận án từ Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Quốc gia (Việt Nam) (Mã số: ĐTĐL.CN - 08/20).

Cuối cùng em xin cảm ơn những người thân trong gia đình và bạn bè luôn là nguồn động viên to lớn, quan tâm và hỗ trợ về nhiều mặt.

Chân thành cảm ơn!

Huế, tháng 01 năm 2024

Nghiên cứu sinh

SONEXAY RASPHONE

KÝ HIỆU VIẾT TẮT

STT	Ký hiệu	Nội dung
1	A	Adenine
2	AD	Ấn Độ
3	ADDN	Giống hồ tiêu Ấn Độ trồng tại Đồng Nai
4	AFLP	Amplified fragment Length Polymorphism (Đa hình chiều dài đoạn khuếch đại)
5	AMP - PCR	Anchored Microsatellite Primed PCR (PCR với môi vi vệ tinh cố định)
6	ANOVA	Analysis of Variance (Phân tích đa hình)
7	ARP	Adventitious Root Production (Sự sản sinh rễ bất định)
8	ASAP	Allele Specific Associated Primers (Các môi liên kết đặc hiệu với alen)
9	DLS	Direct Label and Stain (Nhãn trực tiếp và vết bản)
10	BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Công cụ Tìm kiếm Đối chiếu Nội bộ Cơ bản)
11	bp	Base Pair (Cặp nucleotide)
12	BRBD	Braxin trồng tại Bình Dương
13	BSA	Bulked Segregant Analysis (Phân tích tách biệt hàng loạt)
14	BT	Branching Type (Dạng phân cành)
15	C	Cytosine
16	CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (Trình tự đa hình khuếch đại bị cắt)
17	CRD	Complete Block Design (Thiết kế khối hoàn chỉnh)
18	CTAB	Cetyl Ammonium Bromide
19	DAF - DNA	Amplification Fingerprinting – DNA (Khuếch đại dấu vân tay – DNA)
20	DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Điện di gel biến tính)
21	DHF	Dengue Hemorrhagic Fever (Sốt xuất huyết Dengue)
22	DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
23	dNTP	Deoxyribo Nucleotide Triphosphates
24	EB	Eppendorf buffer (Đệm Eppendorf)
25	ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme)
26	EST	Expressed Sequence Tags (Thẻ trình tự được biểu hiện)
27	<i>F. solani</i>	<i>Fusarium solani</i>
28	FAO	Food and Agriculture Organization (Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp)
29	FS	Fruit Shape (Dạng quả)
30	G	Guanine
31	Kb	Kilobyte
32	<i>H. seinhorsti</i>	<i>Hoplolaimus seinhorsti</i>
33	HC	Holding Capacity (Khả năng bám trụ)
34	CRD	Complete Randomized Design (Thiết kế ngẫu nhiên hoàn chỉnh)
35	HUIB	Hue University Institute of Biotechnology (Viện Công nghệ sinh

		học, Đại học Huế)
36	IISR	Indian Institute of Sugarcane Research (Viện nghiên cứu mía đường Ấn Độ)
37	IPCR	Inverse Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase nghịch đảo)
38	IPGRI	International Plant Genetic Resources Institute (Viện tài nguyên di truyền thực vật quốc tế)
39	IRYS	Irys System (Hệ thống Irys)
40	ISSR	Inter Simple Sequence Repeats (Chuỗi lặp lại đơn giản giữa)
41	ITS	Internal Transcript Spacer (Bộ đệm phiên mã bên trong)
42	KDL	Lampung Daun Kecil
43	LBH	Lateral Branch Habit (Tập tính ra cành bên)
44	LBS	Leaf Base Shape (Hình dạng gốc lá)
45	LDK	Lampung Daun Kecil
46	LDL	Lampung Daun Lebar
47	LLS	Leaf Lamina Shape (Hình dạng phiến lá)
48	LM	Leaf Margin (Mép lá)
49	LN	Lộc Ninh
50	MABC	Molecular - Assisted Backcrossing (Phân tử - lai chéo có hỗ trợ)
51	MAS	Molecular - Assisted Selection (Phân tử - Hỗ trợ lựa chọn)
52	matK	Megakaryocyte Associated Tyrosine Kinase (Tyrosine Kinase liên kết với Megakaryocyte)
53	Mb	Megabyte
54	MEGA X	Molecular Evolutionary Genetics Analysis X (Phần mềm phân tích di truyền tiến hóa phân tử phiên bản 10)
55	MgCl ₂	Magnesium chloride
56	Mi	<i>Meloidogyne incognita</i>
57	NCBI	National Center for Biotechnology Information (Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia)
58	ng	Nanogram
59	NGS	Next - Generation Sequencing (Giải trình tự thế hệ tiếp theo)
60	NNPTNT	Nông Nghiệp Phát Triển Nông Thôn
61	NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Hệ thống phân loại số và phân tích đa biến)
62	<i>P. nigrum</i> L.	<i>Piper nigrum</i> L.
63	PCA	Principal Components Analysis (Phân tích thành phần chính)
64	PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase)
65	PD	<i>Piper Devaricatum</i>
66	PGH	Plant Growth Habit (Kiểu sinh trưởng của cây)
67	PH	<i>Piper Hancie</i>
68	pH	Potential of Hydrogen (Tiềm năng của hydro)
69	PN	<i>Piper nigrum</i>
70	POPGEN	Population Genetics (Di truyền quần thể)
71	POS	Pubescence on Stem (Lông tơ trên thân cây)
72	PPN	Plant Parasitic Nematodes (Tuyến trùng ký sinh thực vật)
73	QTL	Quantitative Trait Locus (Locus tính trạng số lượng)

74	<i>R. similis</i>	<i>Radopholus similis</i>
75	RAM	Random Amplified Microsatellites (Vi vệ tinh khuếch đại ngẫu nhiên)
76	RAMP	Random Amplified Microsatellite Polymorphism (Đa hình vi vệ tinh khuếch đại ngẫu nhiên)
77	RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (Đa hình DNA khuếch đại ngẫu nhiên)
78	RCBD	Randomized Complete Block Design (Thiết kế khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên)
79	rcbL	Ribulose Bisphosphate Carboxylase
80	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn)
81	RKN	Root Knot Nematodes (Tuyến trùng nốt sùng)
82	RSP	Runner Shoot Production (Sự sinh chồi từ thân)
83	RT – PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược)
84	S – SAP	Sequence Specific Amplification Polymorphism (Đa hình khuếch đại trình tự đặc hiệu)
85	SAM PL	Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci (Khuếch đại có chọn lọc các locus đa hình vi vệ tinh)
86	SAS9.1.	Statistical Analysis System 9.1 (Hệ thống phân tích thống kê 9.1)
87	SCAR	Sequence Characterized Amplified Region (Vùng khuếch đại đặc trưng trình tự)
88	SDA	Strand Displacement Amplification (Chỉ thị nhân bản sợi thay thế)
89	SEDL	Sẻ trồng tại Đắc Lắc
90	SO	Spike Orientation (Hướng mọc của bông)
91	SR	Sri Lanka
92	SRDN	Sri Lanka trồng tại Đồng Nai
93	SRGL	Sri Lanka trồng tại Gia Lai
94	SS	Spike Shape (hình dạng bông)
95	S-SAP	Sequence Specific Amplification Polymorphism (Đa hình khuếch đại trình tự đặc hiệu)
96	SSCP	Single Stranded Conformation Polymorphism (Đa hình hình dạng sợi đơn)
97	SSI	Site Selected Insertion (Chèn vị trí chọn lọc)
98	SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism (Đa hình độ dài chuỗi đơn giản)
99	SSR	Simple Sequence Repeats (Chuỗi lặp lại trình tự đơn giản)
100	STMS	Sequence Tagged Microsatellite Site (Vị trí vi vệ tinh được gắn thẻ theo trình tự)
101	STR	Short Tandem Repeats (Chuỗi lặp lại song song ngắn)
102	STS	Sequence Tagged Sites (Các vị trí gắn thẻ trình tự)
103	T(U)	Thymine (Uracine)
104	TCVN	Tiêu Chuẩn Việt Nam
105	TH	Type of hermaphroditism (Hình dạng hoa)
106	QIA	Qatar Investment Authority (Cơ quan đầu tư Qatar)

107	TOV	Type of Veining (Kiểu gân lá)
108	ddRAD	Double Digest Restriction Associated DNA (DNA phối hợp cắt đôi nhờ men phân cắt hạn chế)
109	UBC	University of British Columbia (Đại học British Columbia)
110	UK	United Kingdom (Vương quốc Anh)
111	μ l	Microlite
112	UPGMA	Unweighted Pair Group Mean Average (Trung bình của nhóm cặp không có trọng số)
113	USD	United States Dollar (Đô la Mĩ)
114	VL	Vĩnh Linh
115	VNTR	Variable Number Tandem Repeat (Chuỗi lặp lại song song với tần số khác nhau)
116	WLB	Worm Lysis Buffer (Bộ đệm worm Lysis)
117	YOSTC	Young (emerging) Orthotropic Shoot Tip Colour (Màu đỉnh chồi cây con)

MỤC LỤC

Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn	ii
Ký hiệu viết tắt	iii
Mục lục.....	Error! Bookmark not defined.
Danh mục bảng	xi
Danh mục hình	xiii
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
1. Tính cấp thiết của đề tài	1
2. Mục tiêu của đề tài	Error! Bookmark not defined.
3. Tính mới của đề tài.....	3
Chương 1 TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	4
1.1. Cơ sở lý luận của đề tài	4
1.1.1. Sơ lược về tuyến trùng <i>Meloidogyne incognita</i>	4
1.1.1.1. Giới thiệu về tuyến trùng <i>M. incognita</i>	4
1.1.1.2. Phân loại tuyến trùng <i>M. incognita</i>	5
1.1.1.3. Tác hại của tuyến trùng <i>M. incognita</i>	6
1.1.1.4. Biện pháp xử lý tuyến trùng <i>M. incognita</i>	8
1.1.2. Sơ lược về cây hồ tiêu	9
1.1.2.1. Giới thiệu về cây hồ tiêu	9
1.1.2.2. Vai trò, tác dụng của cây hồ tiêu.....	10
1.1.2.3. Đặc điểm hình thái cây hồ tiêu.....	11
1.1.2.4. Phân bố của hồ tiêu	12
1.1.2.5. Các giống hồ tiêu đang sử dụng	13
1.1.2.6. Các phương pháp lai tạo giống hồ tiêu	15
1.1.3. Các phương pháp ghép áp dụng trên cây hồ tiêu	16
1.1.4. Chi thị phân tử.....	18
1.1.4.1. Định nghĩa của chi thị phân tử.....	18
1.1.4.2. Các loại chi thị phân tử	19
1.1.4.3. Vai trò của chi thị phân tử.....	21

1.2. Cơ sở thực tiễn của đề tài.....	23
1.2.1. Tình hình sản xuất hồ tiêu và sử dụng giống hồ tiêu trên thế giới và Việt Nam....	23
1.2.2. Tình hình bệnh tuyến trùng <i>Meloidogyne incognita</i> gây hại cây hồ tiêu trên thế giới và Việt Nam	25
1.2.3. Tình hình ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống kháng bệnh tuyến trùng ở cây hồ tiêu trên thế giới và ở Việt Nam.....	28
1.2.4. Tình hình lai tạo giống hồ tiêu kháng tuyến trùng trên thế giới và ở Việt Nam.....	29
1.2.5. Tình hình sản xuất và sử dụng cây ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng ở trên thế giới và ở Việt Nam.....	30
Chương 2 NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
2.1. Nội dung nghiên cứu.....	33
2.2. Vật liệu nghiên cứu	33
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	37
2.3.1. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu được thu thập ở Việt Nam	37
2.3.1.1. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng đặc điểm hình thái.....	37
2.3.1.2. Định danh các dòng/giống hồ tiêu đã thu thập bằng kỹ thuật sinh học phân tử.....	37
2.3.1.3. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng chỉ thị phân tử.....	39
2.3.2. Chọn lọc các dòng/giống hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng và chịu úng	39
2.3.2.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của tập đoàn hồ tiêu	39
2.3.2.2. Đánh giá khả năng chịu úng của một số dòng/giống hồ tiêu.....	41
2.3.3. Phát triển chỉ thị phân tử DNA liên kết với tính kháng tuyến trùng của cây hồ tiêu bằng phương pháp BSA	41
2.3.3.1. Nghiên cứu nhận diện chỉ thị phân tử liên kết với tính kháng tuyến trùng bằng phương pháp BSA	41
2.3.3.2. Nghiên cứu chuyển đổi chỉ thị RAPD thành chỉ thị SCAR.....	42

2.3.4. Đánh giá đặc điểm ra hoa của một số dòng/giống hồ tiêu loài <i>P. nigrum</i> L. và khả năng lai tạo với loài <i>P. divaricatum</i> kháng tuyến trùng nhằm tạo dòng/giống hồ tiêu mới	43
2.3.4.1. Khảo sát đặc điểm ra hoa của một số dòng/giống hồ tiêu	43
2.3.4.2. Bước đầu lai tạo các dòng/giống hồ tiêu.....	43
2.3.5. Chọn lọc gốc ghép kháng tuyến trùng và đánh giá khả năng ghép thành công trên gốc ghép kháng tuyến trùng đối với một số dòng/giống tiêu thương mại.....	44
2.3.5.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các gốc ghép hồ tiêu	44
2.3.5.2. Đánh giá khả năng ghép thành công và khả năng tiếp hợp của các tổ hợp ghép.....	45
2.3.5.3. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các tổ hợp ghép hồ tiêu	47
2.3.6. Đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của cây ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng trong điều kiện nhà màng	47
2.4. Phương pháp xử lý số liệu.....	47
Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	48
3.1. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn hồ tiêu được thu thập ở Việt Nam....	49
3.1.1. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng đặc điểm hình thái.....	49
3.1.2. Định danh các dòng/giống hồ tiêu đã thu thập bằng kỹ thuật sinh học phân tử.....	56
3.1.3. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng chỉ thị phân tử....	62
3.2. Chọn lọc các dòng/giống hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng và chịu úng .	70
3.2.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của tập đoàn hồ tiêu	70
3.2.2. Đánh giá khả năng chịu úng của một số dòng/giống hồ tiêu	71
3.3. Phát triển chỉ thị phân tử DNA liên kết với tính kháng tuyến trùng của cây hồ tiêu bằng phương pháp BSA	74
3.3.1. Nghiên cứu nhận diện chỉ thị phân tử liên kết với tính kháng tuyến trùng bằng phương pháp BSA.....	74
3.3.2. Nghiên cứu chuyển đổi chỉ thị RAPD thành chỉ thị SCAR.....	76
3.4. Đánh giá đặc điểm ra hoa của một số dòng/giống hồ tiêu loài <i>P. nigrum</i> L. và khả năng lai tạo với loài <i>P. divaricatum</i> kháng tuyến trùng nhằm tạo dòng/giống hồ tiêu mới.....	81
3.4.1. Đặc điểm ra hoa của các dòng/giống hồ tiêu	81
3.4.2. Kết quả lai tạo các tổ hợp lai với <i>P. divaricatum</i> (HUIB_PD36).....	84

3.5. Chọn lọc gốc ghép kháng tuyến trùng và đánh giá khả năng ghép thành công trên gốc ghép kháng tuyến trùng đối với một số dòng/giống tiêu thương mại	87
3.5.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các gốc ghép hồ tiêu	87
3.5.2. Đánh giá khả năng ghép thành công và khả năng tiếp hợp của các tổ hợp ghép	92
3.5.3. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các tổ hợp ghép hồ tiêu	104
3.6. Đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của cây ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng trong điều kiện nhà màng	108
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	113
1. Kết luận	113
2. Kiến nghị	113
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	114
TÀI LIỆU THAM KHẢO	115

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Danh sách 39 dòng/giống hồ tiêu được sử dụng trong nghiên cứu này...	33
Bảng 2.2: Danh sách môi UBC RAPD được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền	34
Bảng 3.1. Các chỉ tiêu theo dõi của các cây hồ tiêu đã thu thập	52
Bảng 3.2. Các đặc điểm di truyền dựa trên vùng gen ITSu1-4 của tập đoàn hồ tiêu	56
Bảng 3.3. Thành phần nucleotide trong vùng gen ITSu1-4 của quần thể hồ tiêu	56
Bảng 3.4. Kết quả đa hình DNA dựa trên vùng gen ITSu1-4 của quần thể hồ tiêu .	58
Bảng 3.5. Kết quả kiểm tra tính trung tính dựa trên vùng gen ITSu1-4 của quần thể hồ tiêu.....	59
Bảng 3.6. Môi RAPD sử dụng đánh giá đa dạng di truyền hồ tiêu	63
Bảng 3.7. Số băng DNA khuếch đại của các dòng/giống hồ tiêu với từng môi.....	65
Bảng 3.8. Kết quả khuếch đại của các dòng/giống hồ tiêu ở từng môi	66
Bảng 3.9. Các chỉ số đa dạng di truyền của quần thể theo từng môi RAPD.....	67
Bảng 3.10. Sàng lọc khả năng sống sót trong ngập úng	72
Bảng 3.11. Kết quả giải trình tự đoạn RAPD liên kết với tính kháng tuyến trùng ..	77
Bảng 3.12. Các môi được thiết kế cho phân tích SCAR	78
Bảng 3.13. Các giai đoạn phát triển của gié tiêu	82
Bảng 3.14. Tỷ lệ rụng gié và tỷ lệ đậu quả của các tổ hợp lai	85
Bảng 3.15. Số hạt thu được và số hạt nảy mầm của các tổ hợp lai	86
Bảng 3.16. Sinh trưởng chiều cao cây của các vật liệu gốc ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng <i>Meloidogyne incognita</i>	88
Bảng 3.17. Khả năng ra lá của các vật liệu gốc ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng <i>Meloidogyne incognita</i>	89
Bảng 3.18. Mật độ tuyến trùng <i>M. incognita</i> và tỷ lệ rễ bị nốt sần của các vật liệu gốc ghép	90
Bảng 3.19. Tỷ lệ vàng lá và mức độ gây hại do tuyến trùng <i>M. incognita</i> của các tổ hợp ghép.....	91
Bảng 3.20. Tỷ lệ ghép sống của các tổ hợp ghép	93

Bảng 3.21. Tăng trưởng chiều cao chồi của các tổ hợp ghép.....	95
Bảng 3.22. Tăng trưởng số lá của các tổ hợp ghép	97
Bảng 3.23. Sinh trưởng chiều cao chồi của các tổ hợp ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng <i>M. incognita</i>	105
Bảng 3.24. Khả năng ra lá của các tổ hợp ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng <i>M. incognita</i>	106
Bảng 3.25. Mật độ tuyến trùng <i>M. incognita</i> và tỷ lệ rễ bị nốt sưng của các tổ hợp ghép	107
Bảng 3.26. Tỷ lệ vàng lá của các tổ hợp ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng <i>M. incognita</i>	107
Bảng 3.27. Động thái tăng trưởng chiều cao của các tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng.....	109
Bảng 3.28. Động thái tăng trưởng số lá và màu sắc lá của các tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng.....	110
Bảng 3.29. Động thái tăng trưởng số đốt và màu sắc đốt của các tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng.....	111
Bảng 3.30. Động thái tăng trưởng số cành của các tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng	112

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Một số dòng/giống tiêu được trồng ở Việt Nam	14
Hình 2.1. Bao cách ly các gié với nhau	43
Hình 2.2. Đánh dấu hoa được chọn trước khi thụ phấn	43
Hình 2.3. Bao cách ly sau khi thụ phấn.....	43
Hình 2.4. Các bước trong kỹ thuật ghép nêm nổi ngọn	46
Hình 3.1. Kiểu gân lá của một số dòng/giống hồ tiêu	50
Hình 3.2. Các hình dạng và kích thước của lá và bông.....	50
Hình 3.3. Cây phát sinh loài hiển thị mối quan hệ di truyền của 39 dòng/giống dựa trên phân tích dữ liệu hình thái bằng phương pháp UPGMA và hệ số khoảng cách Euclidian	55
Hình 3.4. Các dấu hiệu mở rộng quần thể trong vùng ITSu1-4 hạt nhân	59
Hình 3.5. Mối quan hệ tiến hóa của các đơn vị phân loại dựa trên vùng gen ITSu1-4 trong nhân di truyền của quần thể hồ tiêu	61
Hình 3.6. Mạng lưới Haplotype của quần thể Pepper dựa trên vùng ITSu1-4.....	62
Hình 3.7. Kết quả tách chiết DNA tổng số của một số dòng/giống hồ tiêu.....	62
Hình 3.8. Sản phẩm PCR của các môi UBC#303, UBC#352, UBC#359, UBC#347 khuếch đại các dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PD36, HUIB_PH46, HUIB_PN84, HUIB_PN87, HUIB_PN114, HUIB_PN21, HUIB_PN27, HUIB_PN29, HUIB_PN34, HUIB_PN45, HUIB_PN47	64
Hình 3.9. Cây UPGMA thể hiện mối quan hệ di truyền của các 39 dòng/giống hồ tiêu.....	69
Hình 3.10. Tương quan giữa tỷ lệ cây có biểu hiện vàng lá và nốt sừng trên rễ.....	70
Hình 3.11. So sánh tỷ lệ cây có biểu hiện vàng lá và tỷ lệ cây có nốt sừng sau 4 tháng cấy <i>Meloidogyne incognita</i>	71
Hình 3.13. Sản phẩm PCR của 3 môi UBC#401, UBC#408, UBC#360 biểu hiện bằng đặc trưng cho 2 dòng dòng/giống hồ tiêu kháng (HUIB_PH30 (30), HUIB_PD36 (36)) so với 2 dòng/giống hồ tiêu không kháng tuyến trùng (HUIB_PN46 (46), HUIB_PN34 (34)).....	75

Hình 3.14. Kết quả khuếch đại của hai môi UBC#360 và UBC#408 đối với pool kháng (Rp), pool không kháng tuyến trùng (Sp) và các dòng/giống hồ tiêu tạo pool.	76
Hình 3.15. Kết quả khuếch đại 4 dòng/giống HUIB_PH30 (30), HUIB_PN36 (36), HUIB_PH46 (46), HUIB_PN70 (70) của các cặp môi SCAR.	78
Hình 3.16. Kết quả khuếch đại 2 dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PN70 của cặp môi 30-360F1R2 ở 5 nồng độ DNA khác nhau là 20; 10; 5; 0,5 và 0,05 ng/μL	79
Hình 3.17. Kết quả khuếch đại của cặp môi 30-360F1R2 với một số dòng/giống hồ tiêu trong tập đoàn hồ tiêu ở nhiệt độ gần môi là 60°C trong 15 giây, 35 chu kì phản ứng, 10 pmol môi, có bổ sung 0,33 mM dNTP, sử dụng nồng độ DNA 5-10 ng/μl.	80
Hình 3.18. Giai đoạn phân hóa mầm hoa của dòng/giống Sri Lanka (HUIB_PN97)	82
Hình 3.19. Giai đoạn gié xuất hiện của dòng/giống Vĩnh Linh (HUIB_PN27).....	82
Hình 3.20. Giai đoạn kéo dài gié của dòng/giống Lộc Ninh (HUIB_PN27)	82
Hình 3.21. Hạt lai của tổ hợp ♂HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97.....	86
Hình 3.22. Hạt lai nảy mầm của tổ hợp ♂HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97	86
Hình 3.23. Cây lai của tổ hợp ♂HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97	86
Hình 3.24. Hạt lai thu được của 2 tổ hợp ♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27 (trái) và ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27 (phải)	86
Hình 3.25. Hạt lai nảy mầm của tổ hợp ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27.....	86
Hình 3.26. Cây lai của tổ hợp ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27	86
Hình 3.27. Vi phẫu của ngọn ghép Vĩnh Linh (A), Lộc Ninh (B), Sri Lanka (C), Ấn Độ (D) và gốc ghép HUIB_PH30 (E), HUIB_PD36 (F), HUIB_PH46 (G).....	100
Hình 3.28. Khả năng tiếp hợp của vật liệu gốc ghép HUIB_PH30, HUIB_PD36, HUIB_PH46 với các ngọn ghép Vĩnh Linh (A), Lộc Ninh (B), Sri Lanka (C), Ấn Độ (D)	103

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Hồ tiêu (*Piper spp.*) là loại cây trồng có giá trị kinh tế lớn ở Việt Nam. Năm 2022, diện tích trồng hồ tiêu trên cả nước là 131,8 nghìn ha, xuất khẩu đạt 228,7 nghìn tấn hồ tiêu, với tổng kim ngạch xuất khẩu tăng 3,5% so với năm 2021. Việt Nam chiếm 40% sản lượng và 60% thị phần hồ tiêu toàn cầu, đồng thời luôn giữ vị thế số một thế giới về sản xuất và xuất khẩu (Hiệp, 2021; Mai và cs., 2021; Vietnambiz, 2023).

Ở Việt Nam giống hồ tiêu được trồng phổ biến trong sản xuất có thể phân thành ba nhóm là: tiêu lá nhỏ gồm tiêu Sẻ, Sẻ Đất đỏ, tiêu Vĩnh Linh, Tiêu Sơn, tiêu Di Linh, tiêu Phú Quốc, tiêu Nam Vang; tiêu lá trung bình thường nhập nội từ Madagascar, Ấn Độ và Indonesia như: giống tiêu Lada Belangtoeng, giống tiêu Karimunda, giống tiêu Kuching và giống tiêu Panniyur; tiêu lá lớn gồm có giống tiêu Sẻ Mỡ, tiêu Trâu Đất, trong ba nhóm được trồng phổ biến nhất là giống tiêu Lada Belangtoeng (Sùng, 2001; Cường và cs., 2021). Trong những năm gần đây, do tình hình biến đổi khí hậu kết hợp với việc phát triển cây hồ tiêu vượt quá định hướng và không theo qui hoạch nên tình hình sâu bệnh hại trên cây hồ tiêu xuất hiện ngày càng nhiều, trong đó có hai loại bệnh gây hại nghiêm trọng nhất là bệnh chết nhanh và bệnh chết chậm. Theo báo cáo của Cục Bảo vệ Thực vật đầu năm 2019, diện tích cây hồ tiêu bị chết lên tới hơn 10 nghìn ha, nguyên nhân chủ yếu là do bệnh gây hại, trong đó bệnh chết nhanh do nấm *Phytophthora* và bệnh chết chậm do tuyến trùng *Meloidogyne incognita* được xem là bệnh nguy hại nhất cho cây hồ tiêu.

Theo các nghiên cứu cũng như kinh nghiệm trồng hồ tiêu trên thế giới và ở Việt Nam, việc phòng trừ tuyến trùng gây hại trên cây hồ tiêu bằng các loại thuốc hóa học rất kém hiệu quả, gây tổn kém và ô nhiễm môi trường (Youssef & El - Nagdi, 2021). Bên cạnh đó, việc sử dụng các kỹ thuật luân canh với cây trồng và sử dụng nấm *Mycorrhizal arbuscular* (Mandou và cs., 2023) hay sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng trừ tuyến trùng cũng đã được công bố (Xuyên, 2000; Caillaud và cs., 2008; El - Nagdi & Youssef, 2015; El - Nagdi và cs., 2019; Mhatre và cs., 2019; Thuy và cs., 2019; Youssef & El - Nagdi, 2021; Lawal và cs., 2022; Burns và cs., 2023; Bhat và cs., 2023). Việc sử dụng ký sinh trùng trong phòng trừ tuyến trùng cũng được nghiên cứu (Rahanandeh, 2012; Mukhta & Pervaz, 2013;

Mukhta và cs., 2013; Saad và cs., 2022). Tuy nhiên, phương pháp có hiệu quả nhất để phòng trừ tuyến trùng là sử dụng các giống tiêu kháng bệnh bền vững (Eapen & Pandey, 2018; Ngọc và cs., 2021). Do đó, việc nghiên cứu chọn tạo giống tiêu kháng tuyến trùng là rất cần thiết cho sản xuất tiêu hiện tại và tương lai. Các giống địa phương được sử dụng trong các chương trình nhân giống do chúng có tiềm năng mang các tính kháng bệnh và sâu bệnh thực vật, cũng như cung cấp nguồn đa dạng di truyền cho nhân giống cây trồng (Nas và cs., 2023). Tuy nhiên, hồ tiêu là loài cây lâu năm, việc chọn tạo giống mới theo phương pháp truyền thống mất rất nhiều thời gian và công sức để chọn lọc được các giống mang các tính trạng mong muốn, đặc biệt là các tính trạng chống chịu được với các điều kiện thay đổi của môi trường sống.

Đã có nhiều công trình nghiên cứu về chọn tạo giống cây hồ tiêu có chất lượng, hiệu quả, năng suất cao. Trong đó, giống tiêu rừng Nam Mỹ (*Piper colubrinum*) và giống trầu không (*Piper betle*) có khả năng chống chịu khá tốt với nấm *Phytophthora capsici* và tuyến trùng *Meloidogyne incognita* (Hiền và cs., 2019) và có khả năng tiếp hợp tốt khi ghép với ngọn ghép là giống tiêu Vĩnh Linh (*Piper nigrum*) (Ngọc và cs., 2021).

Ngày nay với sự phát triển của ngành Công nghệ sinh học, công việc chọn tạo giống cây trồng mới đã trở nên thuận tiện và dễ dàng hơn, đặc biệt là sử dụng các kỹ thuật chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống có thể chọn lọc nhanh và chính xác các tính trạng mong muốn, rút ngắn thời gian, tăng năng suất, chọn tạo các giống theo mục tiêu một cách chính xác về mặt di truyền cũng như tiết kiệm công sức so với chọn tạo giống truyền thống (Tú và cs., 2018). Vì vậy, “**Nghiên cứu giống hồ tiêu (*Piper spp.*) kháng *Meloidogyne incognita* bằng chỉ thị phân tử ở Việt Nam**” là cấp thiết nhằm chọn lọc được dòng/giống hồ tiêu kháng tuyến trùng phục vụ công tác sản xuất hồ tiêu ổn định và bền vững. Trong nghiên cứu này, các giống hồ tiêu chịu úng cũng được chọn lọc để chọn ra các giống thích hợp với điều kiện thường xuyên ngập úng của Thừa Thiên Huế.

2. MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

2.1. Mục tiêu chung

Nghiên cứu được dòng/giống hồ tiêu (*Piper* spp.) kháng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* bằng chỉ thị phân tử ở Việt Nam.

2.2. Mục tiêu cụ thể

- Đánh giá được đa dạng di truyền của tập đoàn hồ tiêu thu thập ở Việt Nam
- Chọn được một số dòng/giống hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng *M. incognita* và chịu úng
- Phát triển được chỉ thị phân tử giúp nhận dạng tính kháng tuyến trùng của các dòng/giống hồ tiêu.
- Đánh giá được đặc điểm ra hoa của một số dòng/giống hồ tiêu loài *P. nigrum* L. và khả năng lai tạo với loài *P. divaricatum* kháng tuyến trùng nhằm tạo dòng/giống hồ tiêu mới cho Việt Nam
- Chọn lọc được một số tổ hợp ghép tiếp hợp tốt và có khả năng kháng tuyến trùng
- Đánh giá được khả năng sinh trưởng và phát triển của tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng trong điều kiện nhà màng.

3. TÍNH MỚI CỦA ĐỀ TÀI

- Định danh thành công và đánh giá được sự đa dạng di truyền bằng hình thái và chỉ thị phân tử của các dòng/giống hồ tiêu thu thập ở Việt Nam
- Chọn lọc được một dòng/giống hồ tiêu loài *Piper hancei* (HUIB_PH30) và một dòng/giống hồ tiêu loài *Piper devaricatum* (HUIB_PD36) có khả năng kháng tuyến trùng *M. incognita* và chịu úng tốt.
- Phát triển được chỉ thị phân tử SCAR 30 – 360F1R2 liên kết với tính kháng tuyến trùng của cây hồ tiêu.
- Đánh giá được đặc điểm ra hoa của dòng/giống hồ tiêu loài *P. nigrum* L. và khả năng lai yếu giữa loài *P. nigrum* L với loài *P. divaricatum* kháng tuyến trùng.
- Chọn lọc được hai tổ hợp ghép là tiêu HUIB_PH30 – tiêu Vĩnh Linh và tiêu HUIB_PD36 – tiêu Vĩnh Linh tiếp hợp tốt, có khả năng kháng tuyến trùng và sinh trưởng, phát triển tốt trong điều kiện nhà màng.

Chương 1

TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. CƠ SỞ LÝ LUẬN CỦA ĐỀ TÀI

1.1.1. Sơ lược về tuyến trùng *Meloidogyne incognita*

1.1.1.1. Giới thiệu về tuyến trùng *M. incognita*

Tuyến trùng thuộc chi *Meloidogyne* (Trinh và cs., 2019), họ Meloidogynidae, bộ Tylenchida, là một trong những mầm bệnh chính được tìm thấy ở nhiều loài khác nhau trên cây trồng (Sikandan và cs., 2020; Yang và cs., 2020). Chúng ảnh hưởng đến chất lượng và năng suất của các dòng/giống hồ tiêu. *M. incognita* về mặt kinh tế là một trong những loài tuyến trùng ký sinh thực vật quan trọng nhất trên thế giới do sự phân bố địa lý ngày càng tăng, phạm vi ký chủ rộng và khả năng gây bệnh của nó (Nas và cs., 2023).

Meloidogyne incognita là một trong những loài gây hại vì khả năng gây thiệt hại lớn, mức độ lây nhiễm 90% ở Brazil và Ấn Độ. Nó làm giảm sự phát triển của hồ tiêu ở Ấn Độ (Narayana và cs., 2018), Malaysia (Leong và cs., 2021) và Brazil (De Souza và cs., 2021). Tuyến trùng *M. incognita* là loài nội ký sinh bắt buộc sống hoàn toàn trong rễ cây. Chúng gây ra “tế bào khổng lồ” trong các mô mạch sau khi xâm nhập vào rễ cây (Jones & Goto, 2011). Quá trình xâm nhập của tuyến trùng gây gián đoạn lượng nước và chất dinh dưỡng qua rễ cây, các nốt sưng được coi là bể chứa thức ăn để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng ngày càng tăng của tuyến trùng cái trong giai đoạn sinh sản (Mhatre và cs., 2015).

Vòng đời của *Meloidogyne incognita* thường từ 32 - 42 ngày ở nhiệt độ 25 - 30°C (Campos và cs., 1990). Có khoảng 1000 trứng trong một bọc trứng của *M. incognita*. Nhiệt độ ảnh hưởng rất nhiều đến hoạt động của tuyến trùng *M. incognita* đặc biệt là lúc trứng nở. Trứng của *M. incognita* nở tốt nhất trong nước ở 25°C (Mustika, 1990). Vòng đời của tuyến trùng chúng bắt đầu từ trứng, sau đó là ba giai đoạn vị thành niên (thứ hai/J2, thứ ba/J3 và thứ tư/J4) cuối cùng phát triển thành con đực hoặc con cái trưởng thành (Moens, 2009). Vòng đời của các loài tuyến trùng ảnh hưởng nhất là 19 ngày đối với *M. arenaria*, 15 ngày đối với *M. incognita* và 17 ngày đối với *M. javanica* ở 30°C (Dávila - Negrón & Dickson, 2013). Theo tài liệu, *M. enterolobii* trưởng thành trong 24 - 28 ngày ở rễ ổi (*Psidium guajava*), trong khi ở rễ ớt xanh (*Capsicum* spp.) vòng đời của loài này được chỉ định là 28 ngày (Ashokkumar và cs., 2019; Marques và cs., 2020). Tuyến trùng *M. incognita* có số

lượng con cái nhiều hơn con đực, trứng được đẻ thành từng bao bọc và nở ra thành tuyến trùng non. Tuyến trùng *M. incognita* sinh sản đơn tính, mặc dù con đực thường tập hợp lại ở giai đoạn cuối để dẫn dụ con cái (Whitehead, 1997).

Các loại tuyến trùng *Radopholus similis*, *Trophotylenchulus piperis*, *M. piperi* và *M. incognita* tấn công rễ hồ tiêu (*Piper nigrum*) ở Ấn Độ. Tại Brazil, kết quả kiểm tra cho thấy *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *Xiphinema ifacolum*, *Hoplolaimus seinhorsti* ảnh hưởng đến sinh trưởng hồ tiêu. Chiều cao cây và sự phát triển rễ đều bị ức chế bởi tất cả các loài tuyến trùng, trong đó lá của cây vàng và còi cọc khi bị *H. seinhorsti* và *M. incognita* tấn công (De Souza và cs., 2021).

Tuyến trùng thuộc giống *Meloidogyne* là nhóm tuyến trùng nội ký sinh cố định gây sưng rễ, gây thiệt hại kinh tế và có mặt trên khắp thế giới. Chúng có khả năng tồn tại ở các vùng ôn đới (Rusique và cs., 2022). Ấu trùng tuổi 2 sau khi đã xâm nhập vào rễ sẽ di chuyển tấn công vào đỉnh sinh trưởng, làm phân hóa tế bào đỉnh sinh trưởng của đỉnh rễ và cư trú tại mô phân sinh, sau đó chúng tiết ra enzyme để gây biến đổi mô rễ và hình thành nên các nốt sưng dinh dưỡng cho tuyến trùng. Rễ cây sau khi bị nhiễm tuyến trùng sẽ bị tổn thương, rễ tạo thành các u cục làm cho vàng lá, còi cọc và gây chết. Chúng có tính đa dạng cao với hơn 111 loài có khả năng ký sinh trên nhiều loại cây trồng khác nhau, (Humphreys - Pereira và cs., 2014). Các loài tuyến trùng có phổ vật chủ rộng, có phạm vi phân bố rộng trên toàn cầu, đặc biệt là các vùng Nam, Trung Mỹ, Châu Phi và Châu Á trong đó có Việt Nam (Duyên và cs., 2016; Linh & Hợp, 2017). Ngoài ra, các cuộc thảo luận toàn diện hơn về sự tiến hóa, đa dạng và cơ chế lây nhiễm của tuyến trùng cũng đã được thực hiện (Smant và cs., 2018).

1.1.1.2. Phân loại tuyến trùng

Một số nghiên cứu trong nước về thành phần loài, số lượng quần thể, phạm vi ký chủ và biện pháp phòng ngừa đã được công bố. Theo Châu, N. N, có 5 loài tuyến trùng thuộc giống *Meloidogyne* được tìm thấy ở Việt Nam là *M. incognita*, *M. javanica*, *M. graminicola*, *M. cynariensis* và *M. arenaria*. Trong đó loài *M. incognita* ký sinh gây hại trên rất nhiều loại cây trồng khác nhau như: cà chua, thuốc lá, nghệ, gừng, tàu bay, cỏ, bí đỏ (Châu & Thanh, 2000).

Nghiên cứu của Xuyên, N. T, (2000) đã ghi nhận 3 loài *M. incognita*, *M. arenaria* và *M. javanica* là những loài gây hại phổ biến cho các loại cây trồng chủ yếu ở Hà Nội. Châu, N. N, (1995) nghiên cứu trên 6 loại cây thuộc tại Quảng Ninh: tàu bay (*Crassocephalum crepidioides*), râu mèo (*Orthosiphon stamineus*), nghệ

vàng (*Curcuma longa*), hoài sơn (*Dioscorea persimilis*), kim tiền thảo (*Desmodium styracifolium*) và kim ngân (*Lonicera japonica*) đã thu được 3 loại tuyến trùng là *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*. Tại Hải Dương đã nghiên cứu được 2 loài *Meloidogyne* trên cây cà rốt. Theo Châu, N. N, (Châu, 1995a), nghiên cứu thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật trên các vùng trồng rau tại Nam Định đã cho thấy sự hiện diện loài *M. arenaria* ký sinh trên 5 loại cây rau là chuối, lạc, bí, dưa chuột, dền com và *M. incognita* ký sinh trên 12 loại cây rau màu bao gồm cà rốt, rau muống, ngô, bí, dưa chuột, lạc, chuối, khoai lang, rau dền, rau ngót, cỏ.

Nghiên cứu về hồ tiêu tại Cam Lộ, Quảng Trị cho thấy trong số 12 giống tuyến trùng được phát hiện, *Meloidogyne* spp. là phổ biến nhất. Mật độ của chúng cao nhất vào tháng 2 (mưa nhiều, độ ẩm cao thích hợp cho chúng di chuyển, tìm kiếm thức ăn và sinh sản) và giảm mạnh vào tháng 10 (Hà và Tôn, 2011). Linh, L. T. M, (2019) đã phân tích 50 quần thể tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trong 17 loài cây chủ khác nhau ở Tây Nguyên và ghi nhận được 07 loài *Meloidogyne* là *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. graminicola*, *M. enterolobii*, *M. daklakensis* (loài mới) và *M. cynariensis* đã được công bố trước đó ở Lâm Đồng.

Tuyến trùng *Meloidogyne* thu được từ rễ cây tiêu dài Java là *Paratylenchus nanus*, *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis* và *Coslenchus cancellatus*. Tuyến trùng có quần thể cao nhất ở Saronggi là *P. nanus* với tổng số 165 tuyến trùng trên mỗi 10 g rễ (Aimanah & Munif, 2022).

1.1.1.3. Tác hại của tuyến trùng

Tuyến trùng gây giảm 15% sản lượng cây trồng hàng năm ước tính thiệt hại 100 - 157 tỷ USD trên toàn thế giới. Do mối quan hệ phức tạp giữa thực vật, tuyến trùng, sinh vật đất và đất nên rất khó thu thập dữ liệu về các tổn thất đến năng suất. Tuyến trùng là một trong những yếu tố hạn chế chính trong số các yếu tố gây stress sinh học, gây thiệt hại về năng suất lên tới 15 - 35% (Abd - Elgawad & Askary, 2015). Tuyến trùng đã được xác định là nguyên nhân chính khiến sản lượng cây hồ tiêu giảm (Thuy và cs., 2012). Bệnh chết chậm là do sự kết hợp của tuyến trùng và thiếu hụt dinh dưỡng ở nhiều vùng trồng tiêu (Naik và cs., 2017). Tuyến trùng xâm nhập kết hợp với các sinh vật gây bệnh thứ cấp như nấm và vi khuẩn làm gây hại đến cây trồng (Abd - Elgawad & Askary, 2018; Mitiku, 2018). Quan trọng hơn, chỉ 0,2% số cây trồng bị nhiễm bệnh được nghiên cứu để tìm ra cách khắc phục những tổn thất do tuyến trùng gây ra (Pervez & Eapen, 2015). Mối quan hệ của tuyến trùng *M. incognita* với cây tiêu lần đầu tiên được quan sát thấy vào năm 1918 (Butler,

1918). Tuyến trùng có tác động gây bệnh tổng hợp trên thực vật, làm cho cây bị héo và tăng sự ức chế dinh dưỡng. Sản lượng hồ tiêu giảm là do quá trình tổng hợp của tuyến trùng và nấm gây ra sự sụt giảm lớn về năng suất (Usman và cs., 2020).

Tuyến trùng *Meloidogyne* được biết đến là một trong những tác nhân gây hại chính của các vùng trồng rau, cây thuốc và các loại cây trồng khác. Trên hồ tiêu, nhóm tuyến trùng này là một nguyên nhân chính gây bệnh “chết chậm” và bệnh “chết nhanh” ở một số vùng trồng cây. Cụ thể là, chúng gây hoại tử rễ, vàng lá và tán cây chết trên cây hồ tiêu (Kumar và cs., 2018; Brooks, 2021).

Meloidogyne spp. có liên quan đến việc giảm sự phát triển của hồ tiêu ở Ấn Độ (Narayana và cs., 2018), Malaysia (Leong và cs., 2021) và Brazil (De Souza và cs., 2021). Mười con non trong điều kiện một cây/chậu có thể làm giảm 16% tốc độ tăng trưởng của hồ tiêu. Tại Brazil, kết quả kiểm tra cho thấy *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *Hoplolaimus seinhorsti*, *Xiphinema ifacolum* ảnh hưởng đến sinh trưởng của hồ tiêu. Chiều cao cây và sự phát triển của rễ đều bị ức chế bởi tất cả các loài tuyến trùng, nơi lá của cây còi cọc bị tấn công với *H. seinhorsti* và *M. incognita* gây vàng lá (De Souza và cs., 2021).

Tuyến trùng (*M. incognita* và *Radopholus similis*) có thể kết hợp với các nấm *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *P. capsici* và rệp sáp (*Pseudococcus* spp.) để gây bệnh. Tuyến trùng *M. incognita*, rệp sáp sẽ đục vết thương ở rễ, từ đó tạo điều kiện cho các loại nấm dễ xâm nhập qua vết thương. Biểu hiện ban đầu của cây tiêu là sinh trưởng rất chậm, lá dần chuyển sang màu vàng, sẽ rụng dần từ dưới gốc lên ngọn, gốc và rễ bị thối (Tôn và cs., 2015).

Theo Winoto-s, R, ở Sarawak, Malaysia, bệnh vàng lá với biểu hiện lá mất diệp lục, cây còi cọc và có triệu chứng thiếu dinh dưỡng nghiêm trọng là do sự kết hợp giữa nấm *Fusarium solani* và *M. incognita*. Trong điều kiện khô hạn và đất nghèo dinh dưỡng sẽ làm cho triệu chứng bệnh tăng thêm (Winoto-s, 1972). *Meloidogyne* spp. là một trong những nguyên nhân chính gây ra bệnh vàng lá và làm giảm năng suất cây hồ tiêu (Quyên và cs., 2019). Ở các quốc gia trồng tiêu trên thế giới, tuyến trùng *Meloidogyne* spp là tác nhân gây thiệt hại rất lớn.

Ở nhiều vùng nông nghiệp trên thế giới, tuyến trùng đã gây ra tác hại lớn đến sản xuất nông nghiệp. Tuyến trùng thuộc hai chi *Meloidogyne* và *Pratylenchus* là nguy hiểm nhất, chúng làm giảm năng suất và chất lượng cây trồng, gián tiếp gây ra thiệt hại kinh tế đáng kể (Sikandan và cs., 2020; Yang và cs., 2020). *M. incognita*, *M. piperi*, *Rhadopholus similis* và *Holicotylenchus* spp. thường phá hoại rễ hồ tiêu ở

Kerala (Nisha và cs., 2019; Subila & Suseela Bhai, 2020) với *M. incognita* là loài phổ biến nhất (Ravindra và cs., 2013).

1.1.1.4. Biện pháp quản lý tuyến trùng

Tuyến trùng làm giảm tốc độ tăng trưởng, năng suất và chất lượng. Con non ở giai đoạn thứ hai xâm nhập vào rễ vật chủ và tạo nên những vị trí nốt sùng do tuyến trùng tiết ra protein tác động. *Meloidogyne incognita* có thể được kiểm soát bằng thuốc diệt nấm mốc, chất kiểm soát sinh học, tinh dầu thực vật và các giống cây trồng kháng bệnh đang phát triển.

Biện pháp phòng trừ tuyến trùng là trộn Ethoprophos với đất đóng bầu. Khi bệnh xuất hiện, sử dụng các hóa chất bảo vệ thực vật. Cytokinin pha nồng độ 0,1% tưới quanh gốc, Thiophanate - Methyl nồng độ 0,1% phun đều lên cây trồng, Benomyl 17% + Zineb 53% ở nồng độ 0,1% phun lên cây để phòng trừ nấm bệnh (Tôn và cs., 2015). Thuốc diệt tuyến trùng không còn được phép sử dụng hoặc bị cấm ở nhiều nơi trên thế giới vì các nguy cơ môi trường, độc đối với con người và các sinh vật khác, cũng như hạn chế đến quá trình nhân giống hồ tiêu (Desaeger và cs., 2020; Hassanin và cs., 2020). Các nhà nghiên cứu đang tập trung tìm kiếm các giải pháp thay thế phù hợp cho thuốc diệt nematode để quản lý hiệu quả *M. incognita*. Tuy nhiên, việc quản lý *M. incognita* hiệu quả và tiết kiệm vẫn còn là một thách thức lớn (Subedi và cs., 2020).

Các hợp chất tự nhiên thân thiện với môi trường có thể có hoạt tính diệt tuyến trùng, bao gồm các peptide có hoạt tính sinh học (Saad và cs., 2020a; El - Saadony và cs., 2021a; El - Saadony và cs., 2021b; Saad và cs., 2020a), chiết xuất polyphenolic (Saad và cs., 2020b; Saad và cs., 2021a; Saad và cs., 2021b), tinh dầu (El - Tarabily và cs., 2021, Abd El - Hack và cs., 2022; Alagawany và cs., 2021) và vật liệu nano (El - Saadony và cs., 2021c; EL - Ashry và cs., 2022).

Kiểm soát sinh học là một giải pháp thay thế hiệu quả về chi phí và chấp nhận được về mặt môi trường, cũng như bảo vệ cây trồng an toàn hơn để chống lại sự xâm nhiễm của tuyến trùng (Mhatre và cs., 2019). Trong đó, khả năng sinh vật bên trong đất bị ức chế, hiệu quả của mầm bệnh, vi khuẩn nội sinh và cơ hội quản lý sinh học đối với *Meloidogyne* spp và các yếu tố gây căng thẳng khác là rất cao (Hallmann và cs., 2009; Desoky và cs., 2020b). Do đó, việc sử dụng các biện pháp tự nhiên này an toàn hơn, thân thiện với môi trường và hiệu quả hơn so với các công thức hóa học và hạn chế sự lây lan của dịch bệnh (El - Saadony và cs., 2020; Swelum và cs., 2020). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng nhiều vi sinh vật như vi

khuẩn và nấm, có thể được sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học chống lại tuyến trùng trong nhiều loại cây trồng (Rahanandeh và cs., 2012; Mukhtar và cs., 2013).

Trichoderma, *Mycorrhizal* và nấm nội sinh là những loại nấm sợi chính được sử dụng để kháng tuyến trùng. Chúng có thể làm giảm thiệt hại do tuyến trùng ký sinh trên thực vật bằng cách tạo ra các enzym ly giải, kháng sinh và ký sinh. Chúng giảm thiểu sự cạnh tranh về không gian và tài nguyên bằng cách tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng và nước, hoặc bằng cách sửa đổi hình thái rễ và/hoặc các tương tác vùng rễ, giúp ích cho sự phát triển của cây trồng. Nấm sợi có thể tạo ra tính kháng tuyến trùng bằng cách kích hoạt cơ chế bảo vệ thực vật qua trung gian hormone (axit salicylic và jasmonic, strigolactones). Thay đổi quá trình vận chuyển các thành phần bảo vệ hóa học hoặc tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp và enzym cũng có thể tăng khả năng phòng vệ của thực vật. Sử dụng nấm sợi chống lại tuyến là một chiến lược kiểm soát sinh học đầy hứa hẹn trong nông nghiệp (Lawal và cs., 2022).

Có nhiều loài nấm có khả năng tiêu diệt tuyến trùng đã được thử nghiệm như: *Dactylella oviparasitica*, *Arthrobotrys oligospora*, *Monacrosporium gepgyropagum*, *Verticillium chlamydosporium*. Đặc biệt, khi phối hợp giữa nấm với vi khuẩn *Pasteuria penetrans* thì hiệu quả phòng trừ *M. incognita* tăng lên rõ rệt (Xuyên, 2000; Lawal và cs., 2022; Burns và cs., 2023). Trong số các loại nấm ký sinh, nấm *Paecilomyces* spp. nhận được nhiều sự quan tâm và chú ý nhất do tính ký sinh cao của nó tiềm năng và khả năng phòng trừ tuyến trùng ký sinh thực vật. Chủng *Paecilomyces* sp. trong nghiên cứu thì có hiệu lực cao trong việc ức chế sự nở trứng và khả năng gây chết cao đối với *M. incognita* (Caillaud và cs., 2008).

1.1.2. Sơ lược về cây hồ tiêu

1.1.2.1. Giới thiệu về cây hồ tiêu

Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) là loài cây thân leo lâu năm thuộc họ Piperaceae, có nguồn gốc từ Ấn Độ, sau đó được du nhập đến các nước nhiệt đới Châu Á, Châu Mỹ như Indonesia, Việt Nam, Brazil,... Hồ tiêu thường được gọi là vua của các loại gia vị được sử dụng nhiều nhất trên thế giới (Khew và cs., 2020; Dongare và cs., 2023). Bên cạnh đó hồ tiêu còn được sử dụng trong y học để chữa trị một số bệnh như cảm cúm, xung huyết, viêm khớp,...(Wang và cs., 2017). Hồ tiêu đã được du nhập vào Đông Dương từ thế kỷ XVII. Đến thế kỷ XVIII, hồ tiêu bắt đầu phát triển mạnh khi một số người Trung Hoa di dân vào Campuchia và được đưa vào Đồng bằng Sông Cửu Long qua ngõ Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang. Sau đó chúng phát triển sang các tỉnh ở miền Trung như Quảng Trị, Thừa Thiên Huế,...(Tân, 2001).

Hồ tiêu là cây trồng có giá trị kinh tế cao và diện tích ngày càng được mở rộng. Tuy nhiên, việc mở rộng diện tích đã và đang gặp nhiều khó khăn do sâu bệnh hại. Theo đánh giá của các nhà khoa học, bệnh vàng lá chết chậm trên hồ tiêu do sự kết hợp giữa tuyến trùng *Meloidogyne* spp và nấm *Fusarium* spp gây ra (Koshy và cs., 2005).

Giống với hầu hết các loại thực vật hạt kín khác, chu kỳ sống của hồ tiêu bắt đầu dưới dạng các bào tử đực và cái. Các bào tử đực và cái này tạo ra nhị và nhụy để tham gia vào quá trình sinh sản hữu tính. Sự tạo giao tử có kích thước cực nhỏ và phát triển bên trong hoa dưới dạng vi bào tử (phấn hoa) hoặc đại bào tử (noãn). Các vi bào tử (nhị chứa phấn hoa) được giải phóng và có nhiều cách khác nhau để đến đầu nhụy của hoa (chính nó hoặc của cây khác). Hạt phấn sau khi nảy mầm sẽ theo ống nhụy đến kết hợp với noãn để phát triển thành hợp tử trong túi phôi. Khi túi phôi này phát triển, nó sẽ được bao bọc bởi bầu hoa. Điều này tạo thành một lớp vỏ hạt trên phôi và dẫn đến hạt được bao phủ. Hạt giống này cuối cùng sẽ được giải phóng khỏi cây và có thể được phát tán nhờ các loại chim ăn quả hoặc thậm chí là gió. Sau khi đến vùng đất màu mỡ gần đó, hạt giống này có khả năng nảy mầm và hình thành cây mới.

Piper nigrum không thể không tồn tại đơn độc mà thay vào đó phụ thuộc rất nhiều vào các sinh vật khác trong môi trường xung quanh để hỗ trợ, sinh sản và di chuyển. Là một loại dây leo thân gỗ, hồ tiêu sinh trưởng và phát triển bằng cách leo lên các cấu trúc thẳng đứng lớn hơn gần đó, thường là các thân cây và mặt đá gần đó. Phát triển theo chiều dọc là điều cần thiết để thu được lượng ánh sáng mặt trời tối đa và tránh bị lấn át bởi các thực vật cạnh tranh gần đó (Haggerty và Crosse, 2011)

1.1.2.2. Vai trò, tác dụng của cây hồ tiêu

Tiêu là loại cây trồng lâu năm, có giá trị kinh tế cao. Các ứng dụng của chúng là:

- Chất gia vị: Hồ tiêu đã trở thành gia vị phổ biến trên thế giới, với vị cay, nóng, mùi thơm hấp dẫn nên rất thích hợp trong chế biến món ăn.
- Trong y dược: tiêu có tác dụng kích thích tiêu hóa, giúp ăn ngon miệng do có piperin, tinh dầu và nhựa có mùi thơm, nóng, cay. Ngoài ra, tiêu còn có tác dụng làm ấm bụng, dùng với gừng để chữa tiêu chảy, ói mửa khi ăn món ăn lạ, dùng với hành lá trong cháo giúp giải cảm,... Tuy nhiên, nếu dùng quá nhiều, có thể gây táo bón, viêm đường tiêu, kích thích niêm mạc dạ dày, gây sốt và tiểu ra máu.
- Trong công nghiệp hương liệu: piperin ở hạt tiêu được thủy phân thành acid piperic và piperidin. Sau đó, oxy hóa acid piperic bằng permanganate kali (KMnO_4) để thu nhận piperonal (heliotropin nhân tạo) có mùi hương tương tự heliotropin và coumarin, dùng để thay thế các hương liệu trong công nghiệp nước hoa.

- Trừ côn trùng: dịch chiết từ hồ tiêu xay từng được tẩm vào da trong khi thuộc để tránh côn trùng phá hoại, nhưng từ khi xuất hiện các thuốc hóa học công dụng nhanh và rẻ tiền thì tiêu không còn được sử dụng trong lĩnh vực này (Hòa, 2001).

Cây tiêu rất phổ biến trong các hệ thống y học cổ truyền do tính chất dược lý đa dạng của chúng và ít tác dụng phụ. *Piper nigrum* L. chứa một alkaloid cay nồng "Piperine" được biết là có nhiều tác dụng dược lý như làm tăng tác dụng của nhiều loại thuốc và chất dinh dưỡng bằng cách ức chế các enzym chuyển hóa khác nhau. *P. nigrum* L. và "Piperine" ức chế các hoạt động dược lý đa dạng như hạ huyết áp, chống kết tập tiểu cầu, chất chống oxy hóa, chống khối u, chống hen, giảm đau, chống viêm, chống tiêu chảy, chống co thắt, chống trầm cảm, điều hòa miễn dịch, các hoạt động chống co giật, chống tuyến giáp, kháng khuẩn, kháng nấm, bảo vệ gan, diệt côn trùng và ấu trùng (Damanhour & Ahmad, 2014).

Hàm lượng tinh dầu và các chất chuyển hóa thứ cấp, chẳng hạn như flavonoid, alkaloid và saponin trong cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.), được biết là có tác dụng trừ sâu, giúp phòng trừ bệnh sốt xuất huyết ở Indonesia (Qurota'ayun và cs., 2022).

1.1.2.3. Đặc điểm hình thái cây hồ tiêu

Dưới đây là đặc điểm hình thái của loài *Piper nigrum* đã trưởng thành với đầy đủ các bộ phận sinh trưởng và sinh sản.

❖ **Hệ thống rễ:** Thường gồm từ 3 - 6 rễ cái và một chùm rễ phụ ở dưới mặt đất, trên đốt thân có rễ bám. Để rễ cái ăn sâu, cây chịu hạn tốt và rễ phụ phát triển tốt, hút được nhiều chất dinh dưỡng thì phải thường xuyên cải tạo đất được tơi xốp, tăng hàm lượng mùn. Chỉ cần úng nước 12 - 24 giờ thì bộ rễ cây tiêu đã bị tổn thương đáng kể và có thể dẫn tới việc hư thối, dây tiêu có thể bị chết dần.

- Rễ cọc: Cây hồ tiêu trồng bằng hạt sẽ có rễ cọc đâm sâu xuống đất đến 2,5 m, với nhiệm vụ chính là hút nước.

- Rễ cái: làm nhiệm vụ chính là hút nước. Đối với cây tiêu trồng bằng giâm cành, sau khi trồng được 1 năm, các rễ cái có thể ăn sâu đến 2 m.

- Rễ phụ: Các rễ phụ mọc thành chùm rất dày đặc, phát triển theo chiều ngang, phân bố nhiều nhất ở độ sâu 15 - 40 cm, làm nhiệm vụ hút nước và hút chất dinh dưỡng trong đất để nuôi cây. Rễ tiêu thuộc loại háo khí, không chịu được ngập úng.

- Rễ bám: Mọc ra từ các đốt thân ở trên cao, làm nhiệm vụ chính là giúp cây tiêu vươn lên cao nhờ bám vào choái, vách tường,... Khả năng hút nước và hút chất dinh dưỡng của rễ bám rất kém, gần như không đáng kể (Hòa, 2001; Nam & Loang, 2001).

❖ **Thân, cành, lá:** Tiêu là thuộc loại thân thảo mềm dẻo, phân thành nhiều đốt, mỗi đốt có một lá đơn, hình trái tim, mọc cách. Ở nách lá có các chồi ngủ có thể phát sinh thành các cành tược, cành lươn, cành ác (cành cho trái) tùy theo giai đoạn phát triển của cây tiêu.

- Cành tược (cành vượt): phát sinh từ mầm nách ở các cây tiêu dưới 1 tuổi. Đối với cây trưởng thành, cành tược phát sinh từ các mầm nách của cành thân chính phía dưới thấp của trụ tiêu, và thường là cành cấp 1. Chúng có góc phân cành nhỏ (dưới 45°), mọc tương đối thẳng, sinh trưởng mạnh, dùng để giâm cành nhân giống.

- Cành lươn: Cành phát sinh từ mầm nách gần sát gốc của bộ khung thân chính ở tiêu trưởng thành. Đặc trưng của cành lươn là có dạng bò sát đất và lóng rất dài. Cành lươn cũng được dùng để nhân giống với tuổi thọ dài, năng suất cao nhưng tỷ lệ sống thấp và cây thường ra hoa chậm hơn so với cành tược.

- Cành cho trái (cành ác hoặc cành ngang): là những cành mang trái, thường phát sinh từ mầm nách của cây tiêu hơn 1 năm tuổi. Chúng có góc phân cành lớn, mọc ngang, độ dài cành thường nhỏ hơn 1 m, cành khúc khuỷu, lóng rất ngắn và đa số là cành cấp 2 trở lên. Nếu đem giâm thì cành cũng ra rễ, cho trái rất sớm. Nhưng nếu lóng đốt không có hoặc rất ít rễ bám thì cây phát triển chậm, không leo mà chỉ mọc thành bụi, cây mau cỗi và năng suất thấp (Hòa, 2001; Nam & Loang, 2001).

❖ **Hoa, quả:** Cây tiêu ra hoa dạng hoa hình gié, treo lủng lẳng, dài 7 - 12 cm tùy theo giống tiêu và điều kiện chăm sóc. Trên gié hoa có trung bình 20 - 60 hoa, xếp thành hình xoắn ốc và là hoa lưỡng tính hoặc đơn tính. Trái tiêu là loại trái hạch, không cuống và mang 1 hạt hình cầu. Từ khi ra hoa đầy đủ cho đến khi trái chín kéo dài từ 7 - 10 tháng chia thành 3 giai đoạn sau:

- Hoa tự xuất hiện đầy đủ đến khi hoa nở thụ phấn: 1 - 1,5 tháng.

- Thụ phấn, phát triển trái (4 - 5,5 tháng): Giai đoạn này tiêu lớn nhanh về kích thước và trái đạt độ lớn tối đa. Giai đoạn này tiêu cần nước và dinh dưỡng nhất.

- Trái chín (2 - 3 tháng): Ở giai đoạn này hạt bắt đầu phát triển, đạt đường kính tối đa. Trái tiêu thường chín tập trung vào tháng 1 - 2 trong năm, đôi khi kéo dài đến các tháng 4 - 5 do các lứa hoa trễ và tùy theo giống (Hòa, 2001; Nam & Loang, 2001).

1.1.2.4. Phân bố của hồ tiêu

Cây hồ tiêu có nguồn gốc từ Ấn Độ, sau đó được du nhập đến các nước nhiệt đới như Brazil, Indonesia, Malaysia, Thái Lan, Sri Lanka và Việt Nam. Ngày nay, mặc dù cây hồ tiêu có thể được tìm thấy ở hầu hết các nước nhiệt đới, nhưng vùng sản xuất hồ tiêu chính chỉ tập trung ở một số nước Nam Á, Đông Nam Á và Brazil.

Hồ tiêu được trồng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới như Ấn Độ, Brazil, Indonesia, Malaysia, Sri Lanka, Việt Nam và Trung Quốc (Xuyên và cs., 2019).

Theo Subha, S. P, hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) được trồng khoảng 137.378 ha ở Ấn Độ, với năng suất được đánh giá là 61.000 tấn trong năm 2019 - 2020 (Subha & Balamurugan, 2020). Karnataka sản xuất phần lớn hồ tiêu ở Ấn Độ, nơi được đánh giá cung cấp khoảng 30 nghìn tấn tiêu hàng năm (Statista, 2021).

Mười giống hồ tiêu quan trọng đã được xác minh là Semongok Aman, Kuching, Semongok Emas, Semongok Perak, Semongok 1, Nyerigai, Ấn Độ, Lampung Daun Lebar, Sarikei và Yong Petai. Các tính trạng định tính và định lượng khác biệt của từng giống đã được chỉ ra để hỗ trợ nhận dạng giống. Mẫu tiêu bản khô cho mười giống cũng đã được chuẩn bị và ký gửi tại phòng tiêu bản đặt tại Đại học Malaysia Sarawak và các bản sao tại Malaysia Pepper Board, Kuching. Sự phân bố của từng giống cũng đã được ghi nhận (Chen & Tawan., 2020).

Ở Việt Nam, các giống hồ tiêu được trồng là giống nhập nội và được nhân giống vô tính nên ít phong phú trong quần thể giống, mỗi vùng trồng tiêu chính thường chỉ có vài giống phổ biến. Theo Trinh, P. H, cây hồ tiêu bắt đầu được trồng ở vùng Hà Tiên nước ta vào đầu thế kỷ thứ XIX, sau đó trồng ở các vùng Đông Nam Bộ và Bắc Trung Bộ, ở tỉnh Quảng Trị là các vùng hồ tiêu có độ cao so với mặt biển là 100 mét. Trong đó, các giống từ Campuchia và một số giống địa phương không rõ nguồn gốc được trồng trong thời điểm này (Trinh và cs., 1988).

1.1.2.5. Các giống hồ tiêu đang được sản xuất

Ở Thái Lan có 4 giống tiêu phổ biến là *Antique*, *Ban Keow*, *Prang Thi* và *Prang Thi Bai yick*. *Prang Thi Bai yick* có năng suất cao nhất, *Ban keow* có năng suất trung bình (Ravindran, 2003). Tại Indonesia có 6 giống tiêu được trồng phổ biến là Bulok Belantung, Jambi, Kerinci, Lampung Daun Lebar (LDL), Bangka (Muntok) và Lampung Daun Kecil (LDK) và lưu giữ 7 giống tiêu là Petaling 1, Petaling 2, Natar 1, Natar 2, Choenuk, LDK và Bengkayang. Indonesia có một số giống tiêu có khả năng kháng được sâu bệnh hại (George và cs., 2005).

Năm 2005, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên, đã thu thập được 9 giống hồ tiêu (tiêu Sẻ Mỡ, Tiêu Trâu, tiêu Tiên Sơn, tiêu Lộc Ninh, tiêu Phú Quốc, tiêu Vĩnh Linh, tiêu Di Linh, tiêu Lada Belangtoeng, tiêu Ấn Độ) theo tên gọi trong sản xuất. Năm 2021, Thúy Đ. T. K. đã dựa vào hình thái để chia hồ tiêu thành 2 dòng: dòng hồ tiêu lá nhỏ và lá lớn. Dòng tiêu có lá nhỏ gồm: tiêu Sẻ Đắc Lắc, tiêu Phú Quốc, tiêu Vĩnh Linh thu thập ở Đông Nam Bộ và Tây Nguyên. Dòng tiêu có

lá lớn gồm: dòng tiêu Braxin trồng ở Bình Dương, dòng tiêu Ấn Độ trồng ở Đồng Nai và dòng tiêu Sri Lanka trồng tại Gia Lai và Đồng Nai. Ngoài ra, sau khi phân tích di truyền dựa trên chỉ thị DNA barcode với 3 vùng gen MatK (Maturase K), psbA – trnH (Photosystem II protein D1 – tRNA histidine) và rcbL (ribulose - 1,5 - bisphosphate carboxylase/oxygenase large), đã phân tách được 33 giống tiêu thu thập từ các vùng Đông Nam Bộ, Phú Quốc, Tây Nguyên thành 4 dòng: tiêu Ấn Độ trồng ở Đồng Nai; tiêu Sri Lanka trồng tại Đồng Nai; hồ tiêu Braxin trồng tại Bình Dương và giống hồ tiêu Vĩnh Linh trồng tại các vùng đã thu thập, giống tiêu Sẻ Đăk Lăk và giống hồ tiêu Sri Lanka trồng tại vùng Gia Lai (Thúy, 2021).

Ở Việt Nam, có nhiều giống tiêu khác nhau như: Tiêu Đất Đỏ (Bà Rịa), tiêu Tiên Sơn (Pleiku), tiêu Lộc Ninh, tiêu Phú Quốc, tiêu Vĩnh Linh, tiêu Nam vang, tiêu Di Linh,... Có thể một số giống tiêu có tên gọi khác nhau ở một số địa phương. Tùy theo kinh nghiệm và truyền thống của từng vùng mà chọn giống phù hợp. Nguyên tắc chung là: chọn các vườn tốt, cây tốt, không mang các nguồn bệnh (đặc biệt là bệnh do virus) gây nên hoặc kháng bệnh tốt. Tồn tại 3 dạng giống chủ yếu ở Việt Nam: Giống tiêu lá cỡ trung bình, Giống tiêu Sẻ và tiêu Trâu (Sùng, 2001):

- Giống tiêu lá cỡ trung bình: nguồn gốc có thể từ tiêu Lada Belangtoeng. Bao gồm: tiêu Nam Vang, tiêu Phú Quốc, tiêu Lộc Ninh, tiêu Vĩnh Linh,... Các giống này có hạt lớn trung bình, chiều dài chùm quả trung bình là 11 cm.

- Giống tiêu Sẻ: chùm quả ngắn, lá nhỏ, màu xanh của lá không đậm như giống tiêu Lada Belangtoeng, trung bình chiều dài của chùm quả là 8 cm và hạt nhỏ hơn giống tiêu có cỡ lá trung bình.

- Tiêu Trâu: chùm quả dài, lá lớn, hạt lớn nhưng năng suất thấp.



Hình 1.1. Một số giống hồ tiêu ở các vùng trồng tiêu trọng điểm của Việt Nam. A: tiêu Trâu, B: tiêu Sri Lanka, C: tiêu Sẻ Lộc Ninh, D: tiêu Vĩnh Linh.

Các nghiên cứu về giống hồ tiêu bước đầu đã xác định được sơ bộ về hình thái của các giống tiêu trồng tại Việt Nam. Theo Bình, Đ. T, thì bộ giống cây tiêu ở các vùng trồng tiêu trọng điểm khá phong phú gồm các giống tiêu Vĩnh Linh, tiêu Ấn Độ, tiêu Lada Belangtoeng, tiêu Trâu, tiêu Phú Quốc, tiêu Hà Tiên, tiêu Sẻ Mỡ, tiêu Trung Lộc Ninh, tiêu Cù và tiêu Đại,... (Hình 1.1). Trong đó, các giống phổ biến ở Đông Nam Bộ là: tiêu Vĩnh Linh, tiêu Lộc Ninh và tiêu Ấn Độ. Các giống phổ biến ở Tây Nguyên là tiêu Vĩnh Linh, tiêu Ấn Độ, tiêu Sẻ Mỡ và tiêu Lộc Ninh, trong đó giống tiêu Vĩnh Linh cho năng suất cao nhất. Trong các giống tiêu được trồng hiện nay, giống tiêu Vĩnh Linh có khả năng thích nghi với điều kiện Đông Nam bộ, Tây Nguyên và Quảng Trị, ít bị nhiễm bệnh chết nhanh, cho năng suất cao và chất lượng hạt tốt. Giống tiêu Lada Belangtoeng tuy cho năng suất, chất lượng không cao như giống tiêu Vĩnh Linh nhưng chống chịu sâu bệnh tốt. Giống tiêu Ấn Độ (Karimunda và Panniyur) có ưu điểm sinh trưởng khỏe, chống chịu sâu bệnh khá, năng suất và chất lượng tương đương giống tiêu Vĩnh Linh (Cục trồng trọt, 2012).

1.1.2.6. Các phương pháp lai tạo giống hồ tiêu

Giống đóng vai trò rất quan trọng, quyết định đến năng suất, chất lượng và hiệu quả sản xuất trong suốt thời kỳ 20 - 25 năm của cây hồ tiêu. Giống hồ tiêu đang được trồng phổ biến ở Việt Nam là giống tiêu Vĩnh Linh, tiêu Lada Belangtoeng, tiêu Ấn Độ, tiêu Lộc Ninh. Trong đó, tiêu Vĩnh Linh là giống chủ lực, chiếm trên 90% diện tích trồng trong cả nước (Triệu & Nhung, 2019). Trải qua thời gian dài canh tác và nhân giống vô tính từ hom thân hoặc hom lươn, các giống tiêu có biểu hiện thoái hóa, suy giảm năng suất, chất lượng và khả năng kháng bệnh. Do đó, để cải thiện đặc tính của các giống hồ tiêu và tăng khả năng chống chịu sâu, bệnh hại thì phương pháp lai tạo là cần thiết để tạo giống mới và tăng tính đa dạng, phong phú về nguồn gen.

Lai giống hồ tiêu thông qua hai phương pháp là lai tự nhiên và lai nhân tạo. Chọn giống thông qua thụ phấn tự do (lai tự nhiên) ngày càng phổ biến và cho năng suất rất tốt (Triệu & Nhung, 2019). Tại Sarawak (Malaysia), đã xác định được năm kiểu gen đầy hứa hẹn từ thế hệ thứ ba được thụ phấn tự do của các giống tiêu Balankotta, tiêu Cheriakaniyakdan và tiêu Kalluvally và đã được du nhập từ Ấn Độ sang Malaysia. Giống tiêu Panniyur 2, giống tiêu Panniyur 5, giống tiêu IISR Sakthi, giống tiêu Panniyur 1 và giống tiêu Panniyur 3 được đưa vào sản xuất cũng thông qua chọn lọc từ thụ phấn tự do. Cải thiện đặc tính di truyền của cây hồ tiêu thông qua lai nhân tạo gồm 3 bước: lựa chọn cây bố mẹ phát triển, lựa chọn các thế hệ con lai và nhân giống vô tính các thế hệ con lai ưu tú nhất. Loài hồ tiêu hoang dại *P.*

divaricatum có nguồn gốc từ Puerto Rico, Nam Mỹ, thuộc họ Piperaceae có kháng cách di truyền khá xa so với giống hồ tiêu trồng *P. nigrum* L. (Rasphone và cs., 2022). *P. divaricatum* là loài có khả năng kháng bệnh thối gốc do *Phytophthora* spp. và tuyến trùng *M. incognita* (Devasahayam, 2000). Vì vậy, thông qua lai tạo để đưa tính kháng từ *P. divaricatum* vào dòng/giống tiêu trồng trội loài *P. nigrum* nhằm tạo ra dòng/giống hồ tiêu kháng *Phytophthora* và tuyến trùng là rất cần thiết.

MAS (Marker - Assisted Selection)

Cải thiện chất lượng bằng phương pháp lai tạo truyền thống sẽ mất nhiều thời gian và tốn chi phí nhiều. Khi muốn chọn giống thì phải dùng chỉ thị phân tử liên kết với tính trạng mục tiêu gọi tắt là MAS (marker assisted selection) là một quy trình sử dụng chỉ thị phân tử để chọn lọc gián tiếp của một hoặc nhiều yếu tố quyết định di truyền một tính trạng quan trọng, ưu điểm của kỹ thuật này là rút ngắn được thời gian lai tạo giống và có thể cho kết quả sau ba thế hệ chọn lọc (Tanksley & Nelson, 1996). MAS cho phép lựa chọn kiểu gen không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường. MAS cũng làm tăng hiệu quả của các lựa chọn vì nó có thể được sử dụng trong giai đoạn cây giống, nó cũng phân biệt các đồng hợp tử với dị hợp tử, lựa chọn cho một số đặc tính cùng lúc (Mai và cs., 2014).

1.1.3. Các phương pháp ghép áp dụng trên cây hồ tiêu

Khó khăn trong việc chống lại bệnh do *Phytophthora* đã được khắc phục bằng kỹ thuật ghép *P. nigrum* trên gốc ghép kháng bệnh *P. colubrinum*. Kỹ thuật ghép *P. nigrum* thông thường trên *P. colubrinum* mất chín tháng đến một năm để phát triển một cành ghép để trồng trên đồng ruộng và cần nhiều lao động, nước tưới. Việc ghép cành ghép trên phần gốc ghép không có rễ và gốc ghép tạo rễ theo phương pháp thủy canh đã được chứng minh là có thể tạo ra các tổ hợp ghép có khả năng sinh trưởng trên đồng ruộng trong 95 ngày với tỷ lệ hao hụt thấp (6,8%) và hiệu suất sử dụng nước cao (117,7%) (Ajith & Rini., 2023).

Ghép hồ tiêu (*Piper nigrum*) trên gốc ghép *P. colubrinum* là một kỹ thuật được sử dụng rộng rãi. Để đánh giá ảnh hưởng của giống và thời vụ đến khả năng phục hồi cành ghép, các chồi bên của tám giống *P. nigrum* được ghép trên gốc ghép *P. colubrinum*. Kết quả cho thấy ở tất cả các giống, tháng 2 và tháng 3 là thời kỳ tốt nhất để tạo cành ghép (Vanaja và nnk., 2007).

Nghiên cứu của Fan, R, (2020), cho thấy hàm lượng lipid tổng số ở các mẫu không ghép cao hơn nhiều so với các mẫu ghép. Nguyên nhân có sự khác biệt này nhiều khả năng do ghép giống từ nhiều nguồn khác nhau nên ảnh hưởng đến quá

trình vận chuyển một số chất dinh dưỡng, tuy nhiên sự khác biệt về hàm lượng lipid không lớn. Đặc tính của các hợp chất hóa học chính (caryophyllene, cyclohexene, caryophyllene oxide, và isospathulenol), các hợp chất dễ bay hơi và cấu hình dễ bay hơi của hai phương pháp xử lý (cây ghép và cây không ghép) và ba mẫu được lấy từ mỗi phương pháp cho thấy có rất ít sự khác biệt giữa tất cả các phương pháp xử lý. Điều này chỉ ra rằng việc ghép ít ảnh hưởng đến các thành phần mùi thơm của hồ tiêu trắng và nó có triển vọng cho việc trồng *P. nigrum* L. (Fan và cs., 2020)

Theo Janani, P, (2009), hai loài *P. colubrinum*, *P. hymenophyllum* đã được đánh giá khả năng ra rễ, khả năng ghép thành công và cả cơ chế sinh hóa tạo ra khả năng kháng sinh học. Kết quả cho thấy, *P. hymenophyllum* có tỷ lệ ghép (62,21%) cao hơn *P. colubrinum* (56,65%) và giống ghép Subhakara có tỷ lệ ghép cao hơn nhiều (69,98%) so với Banniyor-1 (48,85%). *P. colubrinum* và *P. hymenophyllum* chống chịu được với *F. Solani*. Khi lây nhiễm *M. incognita*, *P. colubrinum*, *P. hymenophyllum* và Panniyur - 1 kháng trung bình và nhiễm bệnh trong điều kiện không ghép. Trong khi *P. colubrinum* đạt loại “kháng”; *P. hymenophyllum* đạt “kháng trung bình” trong điều kiện ghép. Các nghiên cứu về sinh hóa về tính nhiễm, kháng và miễn dịch của các kiểu gen đối với *P. capsici*, *F. solani*, *R. similis* và *M. incognita* cho thấy hàm lượng phenol tăng gấp đôi trong hồ tiêu (Janani, 2009).

Các bộ phận của tổ hợp ghép:

Gốc ghép: Được tạo ra bằng cách cắt xiên ở dưới gốc cành ghép, vết cắt cách đọt cuối 1,5 - 2 cm, sau đó tỉa bớt lá và trồng vào mỗi bầu 1 hom. Nếu hom gồm 4 - 5 mắt thì 1 - 2 mắt để trên mặt đất và cắm 2 - 3 mắt xuống dưới đất. Chọn bầu PE đen dài 23 – 25 cm, rộng 15 – 17 cm, có đục 8 - 10 lỗ để dễ thoát nước. Đất trồng cần phơi nắng để diệt vi sinh vật gây bệnh, trộn 2 phần đất tơi xốp với 1 phần phân chuồng ủ hoai, rồi bổ sung 0,5 kg phân lân/super lân vào trộn đều với 200 kg hỗn hợp đất và phân chuồng. Ngoài ra, đất cần được xử lý chế phẩm vi sinh (*Trichoderma* spp.) và hóa chất bảo vệ thực vật chứa Ethoprophos để phòng bệnh. Muốn hom tạo rễ nhanh, ít nhiễm bệnh thì trước khi giâm, hom cần được ngâm ngập 30 phút trong nước đường (1-2%) có bổ sung *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* spp. Chỉ sử dụng những chồi phát triển mạnh, đồng đều, không nhiễm bệnh để làm gốc ghép (Tôn và cs., 2015).

Chồi ghép: Chồi ghép được chọn từ giống tiêu có năng suất cao (trên 3 tấn/ha), chất lượng hạt tốt (dung trọng trên 550 g/L), thích nghi tốt với điều kiện tự nhiên. Nguồn gốc của chồi ghép có thể từ cây đầu dòng, từ vườn nhân giống vô tính

của cây đầu dòng, cây giống gốc. Nếu không có cây đầu dòng thì lấy từ cây tiêu 2 - 4 năm tuổi khỏe mạnh, không bị sâu bệnh, đặc biệt là bệnh tiêu điên (do virus). Chồi ghép thường được cắt vào mùa mưa từ dây thân, dây lươn không quá non hoặc quá già. Không sử dụng các đoạn dây tiêu cách ngọn 20 – 25 cm, cắt cách gốc 40 – 60 cm, không làm tổn hại cây mẹ. Nên chọn chồi ghép có đường kính 0,3 - 0,5 cm, dài 8 – 15 cm, không bệnh, gồm khoảng 3 đốt. Chồi sau khi được cắt cần tía bỏ phiến lá và giữ độ tươi bằng cách bọc chúng trong vải ẩm, đặt trong thùng xốp được đậy kín, bảo quản nơi thoáng mát (Tôn và cs., 2015).

Phương pháp ghép:

Ghép áp: Thân gốc ghép được cắt ngang bằng dao ghép đã khử trùng (cắt ở vị trí cách mặt đất 30 - 40 cm), sau đó vạt xiên phần gốc một mặt xiên dài 2 - 3 cm. Đối với chồi ghép cũng vạt một mặt xiên tương tự, sau đó áp hai mặt cắt vào nhau. Nên để cho một bên mép vỏ của chồi ghép khớp với gốc ghép nếu đường kính của hai mặt ghép khác nhau. Bịt kín toàn bộ chồi ghép bằng băng ni lon mỏng quấn chặt từ dưới lên trên. Mỗi gốc ghép ghép 1 - 2 cành, để lại 1 - 2 lá trên mỗi cành và cắt bỏ những cành còn lại (Tôn và cs., 2015).

Ghép nêm: Cắt ngang thân gốc ghép cách mặt đất khoảng 30 - 50 cm bằng dao ghép đã khử trùng, rồi chẻ đôi gốc ghép thành hai phần bằng nhau dài khoảng 3 cm. Vạt xiên hai bên chồi ghép thành hình nêm. Sau đó, đẩy chồi ghép vào vết chẻ ở gốc ghép. Khi đường kính của hai mặt ghép khác nhau thì nên để cho một bên mép vỏ của chồi ghép khớp với gốc ghép. Bịt kín toàn bộ chồi ghép bằng cách dùng băng ni lon mỏng quấn chặt từ dưới lên trên. Mỗi gốc ghép tiến hành ghép 1 - 2 cành, để lại 1 - 2 lá trên mỗi cành, cắt bỏ những cành còn lại (Tôn và cs., 2015).

1.1.4. Chỉ thị phân tử

1.1.4.1. Định nghĩa của chỉ thị phân tử

Chỉ thị phân tử hay chỉ thị DNA, là các chỉ thị chỉ nằm gần hay liên kết với gen và không có hoặc ít ảnh hưởng đến kiểu hình. Chỉ thị DNA là những thay đổi trong DNA và được chia thành nhiều loại dựa vào sự khác nhau về phương pháp, kỹ thuật xác định sự đa hình (Thành, 2014). Đây là công cụ hữu ích để lập bản đồ di truyền liên kết tính trạng và chọn giống cây trồng. Hiện nay, thông tin về bộ gen chưa được cung cấp đầy đủ ở nhiều loài thực vật, do đó chỉ thị phân tử có thể được coi là công cụ để đánh giá đa dạng di truyền và xác định mức độ loài hay dưới loài một cách chính xác. Tuy nhiên, nguyên lý, ứng dụng, sự khác nhau giữa các loại chỉ thị cần phải được hiểu rõ để lựa chọn loại chỉ thị phù hợp (Hà và cs., 2019).

1.1.4.2. Các loại chỉ thị phân tử

Đến cuối những năm 90 của thế kỷ XX, chỉ thị DNA được phát triển đầu tiên và bắt đầu được ứng dụng. Các chỉ thị hiện nay gồm có: đa hình độ dài các đoạn cắt hạn chế (RFLP - restriction fragment length polymorphism), chuỗi lặp ngắn liền kề (STR - short tandem repeats) số lượng thay đổi các chuỗi lặp lại liền kề, số lượng biến đổi song song lặp lại (VNTR - variable number tandem repeat), đa hình cấu tạo sợi đơn (SSCP - single stranded conformation polymorphism, vị trí chuỗi đánh dấu (STS - sequence tagged site), đa hình DNA nhân bản ngẫu nhiên (RAPD - random amplified polymorphic DNA), vị trí trình tự tiểu vệ tinh được đánh dấu (STMS - sequence tagged microsatellite site), dấu DNA nhân bản (DAF - DNA amplification fingerprinting, chỉ thị trình tự biểu hiện (EST - expressed sequence tags), đa hình độ dài các chuỗi đơn giản (SSLP - simple sequence length polymorphism), chuỗi đa hình nhân bản được cắt hạn chế (CAPS - cleaved amplified polymorphic sequence), chỉ thị nhân bản sợi thay thế (SDA - strand displacement amplification), chuỗi lặp lại đơn giản (SSR - simple sequence repeat), vùng nhân bản chuỗi DNA được mô tả (SCAR - sequence characterized amplified regions), đa hình các locus tiểu vệ tinh nhân bản chọn lọc (SAM PL - selective amplification of microsatellite polymorphic loci), tiểu vệ tinh neo nhân bản (AMP - PCR - anchored microsatellite primed PCR), đa hình tiểu vệ tinh nhân bản ngẫu nhiên (RAMP - random amplified microsatellite polymorphism), chuỗi lặp lại đơn giản giữa (ISSR - intersimple sequence repeat), các môi liên quan đến allen đặc biệt (ASAP - allele specific associated primers), đa hình độ dài đoạn nhân chọn lọc (AFLP - amplified fragment length polymorphism), chỉ thị PCR lồng vị trí chọn lọc (SSI - site-selected insertion PCR), tiểu vệ tinh nhân bản ngẫu nhiên (RAM - random amplified microsatellites), chỉ thị PCR đảo (IPCR - inverse PCR), sự mở rộng lặp lại song song ngắn (STR - Short tandem repeat),... (Thành, 2014).

Từ năm 1979, đã có hàng ngàn nghiên cứu về di truyền quần thể trên nhiều đối tượng, với hơn 300 nghiên cứu đã sử dụng các chỉ thị phân tử như RFLP, RAPD, DGGE, minisatellite, SSCP,... Các kỹ thuật này sau đó được sử dụng rộng rãi vào đầu thập niên 90 để cung cấp các thông tin về cấu trúc đa hình của DNA. RAPD và fingerprinting được sử dụng trong các nghiên cứu về sinh sản và huyết thống. Gần đây, minisatellite và microsatellite dần dần được sử dụng nhiều hơn. Tuy nhiên, chi phí xây dựng thư viện DNA vẫn là yếu tố giới hạn của hai kỹ thuật này. SSCP, DGGE,... cũng đã được sử dụng vào các nghiên cứu quần thể và chọn giống mới.

Chỉ thị RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD là đa hình các đoạn DNA được khuếch đại ngẫu nhiên. RAPD sử dụng các môi tổng hợp đơn, ngắn (khoảng 8 - 10 base), nhằm khuếch đại ngẫu nhiên các trình tự DNA chưa biết bằng PCR. Đầu tiên, môi bắt cặp tại các vị trí trên sợi DNA, sau đó tiến hành khuếch đại để tạo ra các đoạn DNA có kích thước khác nhau. Các đoạn DNA này được nhận biết bằng điện di. Mỗi môi có thể tạo ra sự đa hình DNA giữa các giống trong quần thể và các đoạn đa hình này có thể được dùng như một chỉ thị nhận biết. RAPD ra đời sau RFLP, mặc dù khả năng tạo sự đa hình tương đương với RFLP nhưng kỹ thuật đơn giản hơn, chi phí thấp hơn, kết quả nhanh hơn và có thể thu được sự đa hình DNA tại rất nhiều locus. Vì các môi sử dụng trong kỹ thuật này ngắn nên dễ dàng tìm được các trình tự tương đồng trên DNA genomic. Do đó, tính đa hình thu được là đáng tin cậy vì khi có sự thay đổi một base sẽ ngăn cản sự bắt cặp giữa DNA đích và môi. Nhờ ưu điểm trên nên RAPD được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu đa dạng di truyền ở nhiều giống cây trồng một hoặc hai lá mầm. Khái niệm chọn tạo giống phân tử (molecular breeding) cũng được hình thành trên cơ sở RAPD (Truong và cs., 2011; Truong và cs., 2013b; Truong và cs., 2015).

Chỉ thị SCAR (Sequence characterized amplified region)

RAPD có ưu điểm chính là nhanh chóng và dễ dàng thử nghiệm, không cần biết trước trình tự DNA đích để thiết kế môi, có thể khuếch đại ngẫu nhiên trong toàn bộ bộ gen và có tính chất trội. Tuy nhiên, chỉ thị này không thích hợp cho việc định danh loài do độ lặp lại và độ đặc hiệu thấp. Chỉ thị RAPD có thể được chuyển đổi thành một chỉ thị đồng trội là SCAR để xác định loài, phân tích bộ gen, xác định các locus (Sairkar và cs., 2016). SCAR là chỉ thị dựa vào PCR tạo ra các phân đoạn DNA tại các locus xác định bằng các môi nucleotide đặc hiệu. SCAR được tiến hành bằng cách tạo dòng sản phẩm PCR từ kết quả RAPD sau đó giải trình tự hai đầu đoạn tạo dòng. Dựa vào trình tự này để thiết kế cặp môi với độ dài 15 đến 30 bp đặc hiệu cho phân đoạn được nhân dòng. Sự đa hình được xác định dựa vào sự có mặt hay vắng mặt băng được khuếch đại hoặc có sự khác biệt về chiều dài.

ITSu1-4 (Internal Transcribed Spacer)

Trình tự ITS của DNA ribosome hạt nhân là một trong những chỉ thị DNA được sử dụng phổ biến nhất trong phân tích mã vạch DNA và phát sinh loài thực vật, và nó đã được đề xuất làm mã vạch DNA thực vật. So sánh và phân tích sự khác biệt di truyền của một số cá thể hồ tiêu thu thập ở các địa phương khác nhau ở Việt Nam đã được thực hiện khi sử dụng trình tự ITS. ITSu1-4 (hay ITSu1/ITSu4)

là cặp mồi được thiết kế từ cuối trình tự 18S và đầu trình tự 26S. Vùng trình tự được khuếch đại bởi cặp mồi này bao gồm toàn bộ vùng ITS1; 5,8S và ITS2 trên ribosome. So với các mồi ITS phổ biến hiện có (ITS1, ITS4, ITS5, ITS2,...), ITSu1-4 là cặp mồi có hiệu quả bắt cặp cao hơn, đồng thời cải thiện được độ bao phủ và tỉ lệ thành công của PCR (97,5%). Cụ thể là, ITS-u1 có thể khuếch đại hơn 90% các loài thực vật, trong khi tỉ lệ này ở ITSu4 là 97%. Ngoài ra, không có lỗi mismatch nào giữa sự bắt cặp của mồi và trình tự DNA đích được chỉ ra (Cheng và cs., 2016).

Kỹ thuật BSA (Bulked Segregant Analysis)

BSA là một kỹ thuật được sử dụng để xác định các dấu hiệu di truyền liên quan đến kiểu hình đột biến. Điều này cho phép phát hiện ra các gen quy định tính kháng bệnh hoặc tính nhạy cảm. Kỹ thuật này liên quan đến việc hình thành hai nhóm kiểu hình đối lập cho một đặc điểm quan tâm. Ví dụ, một nhóm có các cá thể có khả năng chống lại bệnh tật, trong khi nhóm thứ hai thì không. Sau đó, hai hỗn hợp DNA được tạo ra bằng cách gộp DNA của tất cả các cá thể trong mỗi nhóm. Hai nhóm này sau đó được phân tích RAPD để phát hiện những điểm tương đồng và khác biệt trong các locus khác nhau của bộ gen. Hai nhóm sẽ có sự phân bố ngẫu nhiên các alen trong tất cả các locus của bộ gen ngoại trừ các locus có liên quan đến đột biến. Sự khác biệt nhất quán trên một locus giữa hai mẫu được đánh dấu có nghĩa là vị trí locus đó có liên quan đến đột biến được quan tâm (McClellan, 1992).

Cơ sở của phương pháp BSA, lần đầu tiên được mô tả bởi Michelmore và cộng sự (1991), là tất cả các alen phải xuất hiện khi DNA được tạo thành từ DNA của một nhóm cây có cùng kiểu hình. Do đó, hai nhóm cá thể khác nhau về một đặc điểm kiểu hình sẽ chỉ khác nhau ở vị trí chứa đặc điểm đó. Ưu điểm lớn nhất của BSA so với phân tích QTL là không cần thiết phải xác định kiểu gen và kiểu hình từng cá thể trong quần thể phân ly. Thay vào đó, bằng cách nhóm các cá thể theo một tính trạng cụ thể và tách chiết DNA từ hai đoạn gen này, quá trình phân loại kiểu gen sẽ giảm xuống chỉ còn hai mẫu DNA hỗn hợp cần phân tích (Chu, 2016).

1.1.4.3. Vai trò của chỉ thị phân tử

Ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu di truyền cho phép xác định được các locus hoặc các gen quy định tính trạng của cây trồng qua đó xây dựng được bản đồ di truyền phân tử của loài quan tâm (Rai và cs., 2022). Việc chọn giống chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường nhờ chỉ thị phân tử được áp dụng trên nhiều cây trồng khác nhau, trong đó đáng chú ý là những thành công trong chọn tạo giống lúa kháng rầy nâu, đạo ôn; cà chua kháng bệnh héo xanh vi khuẩn, tuyến

trùng (Williamson & Roberts, 2009). Chọn lọc giống cây trồng nhờ chỉ thị phân tử rất có tiềm năng trong các chương trình chọn giống cây trồng kháng tuyến trùng.

Chỉ thị phân tử DNA rất đa dạng, chúng rất bền vững và không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường và các giai đoạn phát triển như các chỉ thị hình thái. Việc phát hiện các chỉ thị DNA có ý nghĩa rất quan trọng trong nghiên cứu di truyền sinh vật nói chung và chọn tạo giống cây trồng nói riêng, vì nó thường liên kết với các tính trạng quan trọng của cây trồng (Darvasi & Soller, 1994), nó được sử dụng trong nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền, lập bản đồ gen hay chọn giống.

Bên cạnh việc đưa ra thông tin chính xác về sự đa dạng di truyền giữa các quần thể sinh vật, các chỉ thị phân tử gần đây còn được sử dụng như là một công cụ hỗ trợ hữu ích cho lai tạo (MABC - Molecular Assisted Backcrossing) và chọn lọc các giống cây trồng (MAS - Molecular Assisted Selection) (Francia và cs., 2005). Nhờ những chỉ thị phân tử này, một số giống kháng bệnh như kháng tuyến trùng và kháng với điều kiện tự nhiên bất lợi đã được sử dụng trong chọn tạo giống cây trồng như cà chua, cây họ cà, ớt kháng tuyến trùng (Skupinovas và cs., 2004).

Theo Francia, E, việc khám phá và phát triển hàng loạt chỉ thị phân tử trong suốt thập niên 80 và 90, việc kết hợp chỉ thị phân tử và chọn lọc giống truyền thống đã cung cấp một công cụ hữu hiệu và đáng tin cậy cho chọn tạo giống hiện đại (Francia và cs., 2005). Trong những năm qua, kỹ thuật sinh học phân tử đang được áp dụng rộng rãi, có hiệu quả trong nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể thực vật và bảo tồn tài nguyên sinh vật. Chúng được sử dụng để nghiên cứu sự giống nhau hay biến đổi di truyền của các giống gốc, giống lai và cha mẹ của chúng. Các chỉ thị phân tử thường được dùng để nghiên cứu đa hình thực vật bao gồm RFLP, RAPD hay chỉ thị SSRs và gần đây nhất là chỉ thị của chuỗi lặp đơn giản có đánh dấu (EST - SSRs). Đối với hồ tiêu, hầu hết các chỉ thị phân tử nói trên đều được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền, trong đó chủ yếu nhất là RAPD (Sen và cs., 2010), AFLP (Shi và cs., 2009), và ISSR (Sheeja và cs., 2013). Gần đây chỉ thị SSR được chứng minh là tốt hơn trong phân tích đa dạng (Zargar, 2016).

Hasan, S. T, (2018) thực hiện nghiên cứu nhằm chẩn đoán tuyến trùng (RKN-Root - knot nematodes) *Meloidogyne* spp., dựa trên các đặc điểm hình thái và chẩn đoán phân tử. Kết quả sơ bộ về đặc điểm hình thái cho thấy hai loài tuyến trùng là *M. javanica* và *M. incognita* có tỷ lệ lần lượt là 73,33% và 20%. Tuy nhiên, chỉ có 6,67% số rễ cây bị nhiễm cả hai loài. Chẩn đoán phân tử đã cho thấy sự phù hợp với các đặc điểm hình thái khi sử dụng một số phương pháp để tách chiết DNA bộ gen

từ một khối trứng. Mỗi rDNA 18S (Mel F/R) và chỉ thị SCAR (Jav F/R) được sử dụng để phát hiện loài. Kết quả cho thấy khi sử dụng mỗi Mel F/R tạo ra các băng xấp xỉ 902 bp. Kỹ thuật SCAR (Jav F/R) cho kết quả là các băng 670 bp. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR cho cả hai loài, dòng/giống phân lập (*M. javanica*) tương đồng 100% với trình tự *M. javanica* trong Ngân hàng gen (KF041325.1). Trong khi đó, *M. incognita* phân lập tương đồng 98% với trình tự tham chiếu của *M. incognita* (KU578066.1) (Hasan & Abood, 2018).

Hồ tiêu (*Piper nigrum*) được nghiên cứu với hệ gen tham chiếu trong mã hóa piperine, bởi tích hợp được công nghệ PacBio, 10x Chromium, BioNano DLS optical mapping và Hi - C mapping. Trình tự hệ gen có kích thước 761,2 Mb (gồm 45 scaffolds với độ lớn N50 là 29,8 Mb) (Hu và cs., 2019). Năm 2019 Kumari và cộng sự đã giải trình tự hệ gen cây hồ tiêu (*P. nigrum*) thông qua Illumina, PacBio (NCBI Genbank: PRJNA412127) và IRYS sequencing để có được một bản phác thảo bộ gen bao gồm 916 scaffolds, phủ trên bộ gen là 80X, rồi sử dụng thông tin của trình tự ấy thực hiện bộ gen wide mining (tìm kiếm mô gen trên hệ gen), định tính chỉ thị SSR trong cây hồ tiêu (Kumari và cs., 2019).

Trong nghiên cứu của Ankita Negi đã tạo ra dữ liệu trình tự ddRAD của 29 kiểu gen hồ tiêu từ khắp Ấn Độ. Tập hợp bộ gen hồ tiêu mới nhất đã được sử dụng để xác định các SSR trên toàn bộ bộ gen. Tổng số 276.230 SSR bộ gen được khai thác phân bố trên 26 nhiễm sắc thể, với mật độ tương đối là 362,88 SSR/Mb và khoảng cách trung bình giữa hai SSR là 2,76 Kb. Tập hợp này cũng được sử dụng để tìm các SSR đa hình trong dữ liệu GBS được tạo ra của 29 kiểu gen hồ tiêu bằng cách sử dụng các phương pháp nhanh chóng và hiệu quả về chi phí, tạo ra 3,176 SSR đa hình. Đa hình của hồ tiêu rất hữu ích để phát triển chỉ thị giống, bản đồ vật lý, xác định QTL/gen, và MAS trong nỗ lực sản xuất hồ tiêu (Negi và cs., 2021).

Các kỹ thuật chỉ thị DNA có vai trò quan trọng trong nghiên cứu đa dạng di truyền, phát sinh loài, phân loại, đánh dấu và xác định gen; đồng thời chọn lọc nguồn gen và chọn giống. Tuy nhiên, hiện không có chỉ thị nào đáp ứng được tất cả các yêu cầu trên. Tùy vào vấn đề nghiên cứu mà chọn các kỹ thuật chỉ thị DNA phù hợp.

1.2. CƠ SỞ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

1.2.1. Tình hình sản xuất hồ tiêu và sử dụng giống hồ tiêu trên thế giới và Việt Nam

❖ Trên thế giới

Brazil nổi bật là nhà sản xuất hồ tiêu lớn thứ ba thế giới. Theo số liệu từ Bộ công nghiệp, ngoại thương và dịch vụ Brazil (MDIC), lượng hồ tiêu xuất khẩu trong

cả năm 2021 đã chạm mức kỷ lục 92,1 nghìn tấn, trị giá thu về 306,3 triệu USD, tăng 2,6% về lượng và tăng 65,3% về trị giá so với năm 2020. Trong khi đó, giá xuất khẩu hồ tiêu của Brazil trong năm 2021 cũng tăng vọt 61,1% so với năm 2020, đạt mức cao nhất trong 4 năm với bình quân 3,327 USD/tấn. Hồ tiêu của Brazil được xuất khẩu đến 111 thị trường trên thế giới (Hiệp, 2021).

Malaysia có diện tích trồng hồ tiêu khoảng 10.899 ha (2016), sản lượng 29.245 tấn và là nước trồng hồ tiêu lớn ở khu vực Đông Nam Á (Cường, 2020). Năm 2015 được coi là năm thành công của ngành hồ tiêu Malaysia, xuất khẩu trên 14,500 tấn, cao hơn khoảng 1,000 tấn so với năm trước. Sản lượng hồ tiêu năm 2021 lên tới 21.597 tấn, bao gồm 70% (15,118 tấn) tiêu đen và 30% (6,479 tấn) tiêu trắng; tăng 17% so với năm 2020. Xuất khẩu hồ tiêu năm 2021 lên tới 7,451 tấn, trong đó 6,037 tấn tiêu nguyên hạt và 1,414 tấn tiêu xay. Với tổng thu nhập từ xuất khẩu hồ tiêu lên tới 37 triệu USD. Thị trường chính của Malaysia là Nhật Bản, Việt Nam và Trung Quốc (Khew và cs., 2022).

Ấn Độ là nước trồng hồ tiêu nhiều thứ hai thế giới với diện tích 129.000 ha (2016), sản lượng 55.000 tấn. Sri Lanka nổi tiếng về sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu ở phía nam Ấn Độ. Sri Lanka có diện tích sản xuất hồ tiêu khoảng 41.559 ha, sản lượng 28.901 tấn (2016) (Cường, 2020). Lợi nhuận từ hồ tiêu cũng khiến nông dân Sri Lanka tăng mạnh diện tích. Năm 2015 sản lượng tăng gần gấp đôi so với năm 2014, đạt khoảng 27.000 tấn, xuất khẩu 18.000 tấn, đã cao hơn 10.000 tấn so với 2014.

Năm 2021, xuất khẩu hồ tiêu của Indonesia giảm xuống mức thấp nhất trong hơn 5 năm gần nhất khi chỉ đạt 35.057 tấn, giảm mạnh 32,3% so với cùng kỳ theo số liệu từ cục thống kê Indonesia. Những thị trường xuất khẩu hồ tiêu chính của Indonesia gồm Việt Nam chiếm 22,1% tỷ trọng, Mỹ chiếm 14,1% và Trung Quốc là 13,9%. Sản lượng tiêu của Indonesia giảm trong những năm gần đây do giá tiêu thấp, khiến nhiều nông dân chuyển sang sản xuất các loại cây có lợi hơn như sắn.

Nhập khẩu hồ tiêu của Mỹ tăng 5,7% về lượng và 38,3% về trị giá, đạt 85.159 tấn, trị giá 318,4 triệu USD. Việt Nam là nguồn cung hồ tiêu lớn nhất cho Mỹ với khối lượng đạt 58.123 tấn, tăng 8,3% và chiếm 68,3% tổng khối lượng hồ tiêu nhập khẩu vào Mỹ. Mỹ cũng đẩy mạnh nhập khẩu hồ tiêu từ Ấn Độ, Indonesia, Trung Quốc, Nam Phi... nhưng khối lượng thấp hơn Việt Nam (Hiệp, 2021).

❖ Ở Việt Nam

Năm 2021, khối lượng hồ tiêu xuất khẩu của Việt Nam giảm lần đầu tiên sau 6 năm, tuy nhiên giá trị thu về của ngành hồ tiêu đạt cao nhất kể từ năm 2018 nhờ giá

tăng mạnh. Việt Nam đã xuất khẩu 260.989 tấn hồ tiêu các loại, kim ngạch thu về 937,9 triệu USD, giảm 8,5% về lượng nhưng kim ngạch tăng 42% so với năm 2020. Việt Nam tiếp tục dẫn đầu về xuất khẩu hồ tiêu toàn cầu khi cung cấp khoảng 60% nhu cầu tiêu dùng của thế giới. Giá hồ tiêu xuất khẩu của nước ta năm 2021 đã tăng mạnh sau 4 năm sụt giảm với mức tăng 55,2% (tương ứng 1,278 USD/tấn). Riêng tháng 12, trong khi giá hồ tiêu trong nước chững lại và giảm thì giá hồ tiêu xuất khẩu vẫn duy trì xu hướng tăng với mức bình quân 4.710 USD/tấn, tăng 1,6% so với tháng 11 và tăng mạnh 70,2% so với tháng 12/2020 (Hiệp, 2021).

Năm 2021, tiêu đen nguyên hạt vẫn là chủng loại được xuất khẩu nhiều nhất nhưng tỷ trọng trong tổng xuất khẩu đã giảm xuống còn khoảng 64 - 67% so với khoảng 80% của trước đây. Thay vào đó, tỷ trọng tiêu đen xay, tiêu trắng và tiêu ngâm giấm, mộc, đầu đinh, xanh, hồng... tăng lên đáng kể. Việt Nam đã xuất khẩu hồ tiêu tới hơn 80 quốc gia và vùng lãnh thổ trên thế giới. Trong đó, Mỹ là thị trường xuất khẩu lớn nhất, sản lượng hồ tiêu xuất khẩu sang thị trường Mỹ đã liên tục tăng trong 4 năm qua (Hiệp, 2021).

Tây Nguyên là một vùng trồng hồ tiêu quan trọng. Năm 2015, hồ tiêu được sản xuất đạt hơn 10 nghìn tỷ đồng (chiếm gần 8% tỷ trọng ngành trồng trọt của Tây Nguyên). Việt Nam trở thành quốc gia xuất khẩu hồ tiêu đứng đầu thế giới. Diện tích trồng hồ tiêu ở Tây Nguyên là trên 70 nghìn ha, chiếm hơn 60% diện tích của cả nước. Năng suất trung bình của vùng đạt hơn 31 tạ/ha, cao hơn gần 20% so với trung bình của cả nước. Các tỉnh trồng cây hồ tiêu trọng điểm của Tây Nguyên là Gia Lai, Đắk Nông và Đắk Lắk. Tuy nhiên, việc sản xuất hồ tiêu vẫn thiếu bền vững, còn nhiều yếu kém, chủ yếu chế biến thô, sản xuất tự phát và thiếu quy hoạch, môi trường bị suy thoái, ảnh hưởng đến năng suất, sản lượng, chất lượng sản phẩm, đặc biệt việc áp dụng các tiến bộ kỹ thuật vào sản xuất còn nhiều hạn chế... Bên cạnh đó, tỷ lệ nhiễm bệnh chết nhanh, chết chậm ngày càng tăng lên. Phần lớn các giống hồ tiêu do người dân tự uơm giống và sử dụng, còn các giống bán trên thị trường đều không thực hiện đúng pháp lệnh giống cây trồng năm 2004 như: Không rõ nguồn gốc, không có vườn giống đầu dòng...(Khuong và cs., 2018).

1.2.2. Tình hình bệnh tuyến trùng gây hại cây hồ tiêu trên thế giới và Việt Nam

❖ Trên thế giới

Từ 1902, tuyến trùng đã được phát hiện ở vùng tiêu Cochin của Trung Quốc. Năm 1918, Butler cũng đã báo cáo sự gây hại của tuyến trùng trên hồ tiêu ở Wynad, Ấn Độ. Hai loài *M. incognita* và *M. javanica* là những loài gây hại trên tiêu ở nhiều

nước như Brazil, Sarawak, Borneo, Trung Quốc, Malaysia, Brunei, Kampuchea, Indonesia, Philippines, Thái Lan và Việt Nam (Koshy & Geetha, 1992).

Hainan Island, Trung Quốc là nơi sản xuất hồ tiêu lớn, có điều kiện khí hậu và mô hình canh tác thuận lợi cho sự xâm nhiễm của *Meloidogyne* spp. Long (2023) đã điều tra sự xuất hiện, mức độ nghiêm trọng và sự phân bố của tuyến trùng trên hồ tiêu ở khắp Hainan Island. Đồng thời, thử nghiệm mức độ kháng *M. enterolobii* và *M. incognita* đối với các giống hồ tiêu. Kết quả đã tìm thấy các loài tuyến trùng *M. enterolobii*, *M. incognita* và *M. javanica* ở Hainan Island và *M. enterolobii* là loài chiếm ưu thế. Tất cả các giống tiêu đều rất mẫn cảm với *M. Enterolobii*, đây là lý do khiến bệnh lây lan nhanh chóng ở Hainan Island. Các giống tiêu thể hiện mức độ kháng *M. incognita* khác nhau. Nghiên cứu này đã thúc đẩy sự hiểu biết toàn diện về phân bố của tuyến trùng ở rễ và mức độ kháng tuyến trùng của vật chủ ở Hainan Island, từ đó kiểm soát hiệu quả tuyến trùng ở rễ (Long và cs., 2023).

Do nguy cơ xảy ra các vấn đề về môi trường và sức khỏe nên các giải pháp thay thế để quản lý tuyến trùng ngày càng hạn chế. Một số hợp chất tổng hợp đã được sử dụng để kiểm soát tuyến trùng; nhưng hầu hết chúng đã bị loại khỏi thị trường do các tác động ngoài mục tiêu ban đầu. Một số thuốc trừ tuyến trùng có hiệu quả kiểm soát tuyến trùng ở hạt tiêu đen, nhưng chi phí lớn và gây ô nhiễm. Ở Ấn Độ, nơi tuyến trùng ký sinh thực vật là mối nguy hiểm nghiêm trọng, thì lại thiếu cách kiểm soát chúng. Nông dân cần một kỹ thuật quản lý tuyến trùng thay thế, hiệu quả về chi phí và không ảnh hưởng xấu môi trường. Do đó, nhu cầu về các chương trình quản lý tuyến trùng toàn diện ngày càng cấp thiết (Saad và cs., 2022).

Một cuộc khảo sát tại các quận Thiruvananthapuram, Kollam và Idukki ở Kerala (2017-2018), tiết lộ rằng *Meloidogyne incognita* là loài tuyến trùng gây hại mạnh nhất trên cây tiêu. Để thay thế các loại hóa chất sử dụng, các dịch chiết của cây cỏ dại đã được tách chiết để tìm ra đặc tính diệt khuẩn. Chiết xuất methanol từ *Andrographis paniculata*, *Glyricidia maculata* và *Chromolaenaodorata* đã được tìm thấy có hiệu quả chống lại *M. incognita*. Kết quả thí nghiệm nuôi cấy trong chậu sử dụng các chế phẩm thực vật khác nhau cho thấy bột khô *A. paniculata* 50g/kg đất hoặc 25g/kg đất có hiệu quả ức chế quần thể tuyến trùng trong đất và rễ (giảm 88 - 92% so với không được xử lý) (Nisha và cs., 2019).

❖ Ở Việt Nam

Các loài tuyến trùng *Meloidogyne* là nguyên nhân làm giảm năng suất và có khả năng phá hủy các vườn hồ tiêu ở Việt Nam (Trinh và cs., 1998; Châu, 1995b).

Hồ tiêu là cây trồng bị rất nhiều loài tuyến trùng kí sinh gây hại. Tại Tân Lâm (Quảng Trị), đã có 49 loài tuyến trùng lây nhiễm vào hồ tiêu với 4 loài được đánh giá nguy hiểm là *M. incognita* gây bệnh nốt sùng, *Rotylenchulus* gây đen rễ, *Paratrichodorus namus* gây bệnh xoắn lá, *Xiphinema americanum* gây bệnh vàng lá (Châu, 1995b). Ở Việt Nam đã có khoảng 15 giống tuyến trùng gây hại: *Xiphinema*, *Tylenchorhynchus*, *Trophonema*, *Trichodorus*, *Scutellonema*, *Criconemoides*, *Pratylenchus*, *Dilichodorus*, *Helicotylenchus*, *Hoplolaimus*, *Meloidogyne*, *Hemicriconemoides*, *Hemicycliophora*, *Hirschmanniella* và *Meloidodera* (Khuong, 1983). Khoảng 10 giống tuyến trùng được phát hiện ở vùng Đông Nam Bộ (Biên, 1989), *Meloidogyne* rất phổ biến ở các vùng trồng tiêu, gây hiện tượng sùng rễ tiêu.

Năm 2019, chỉ tính riêng các tỉnh Tây Nguyên đã cho thấy diện tích cây hồ tiêu chết đã vượt trên 10 ngàn hecta (Gia Lai là 5.547 ha; Đắk Lắk là 2.774 ha; Đắk Nông là 1.827 ha). Nguyên nhân chủ yếu được xác định là do bệnh chết nhanh và chết chậm, trong đó bệnh chết chậm mặc dù không gây hại nghiêm trọng như bệnh chết nhanh nhưng khi bị nhiễm tuyến trùng thì vườn cây sinh trưởng kém, cho năng suất thấp. Nghiên cứu các giải pháp phòng trừ các loại bệnh này trên cây hồ tiêu cũng đã được tiến hành nhưng chưa mấy hiệu quả (Cục Bảo vệ thực vật, 2019).

Theo Loang, T. K, nghiên cứu bệnh gây hại đối với cây tiêu trên địa bàn Tây Nguyên cho thấy các bệnh gây hại ở rễ là phổ biến và nghiêm trọng, khó để phòng ngừa. *Phytophthora spp.* và *Meloidogyne sp.* là nguyên nhân chính. Để phòng trừ hiệu quả các bệnh hại nói trên cần phải kết hợp nhiều biện pháp, trong đó thường xuyên sử dụng phân hữu cơ, phân bón lá kết hợp sử dụng hợp lý thuốc bảo vệ thực vật sẽ đem lại hiệu quả cao hơn (Loang, 2007). Hiệu quả kiểm soát tuyến trùng của các loại phân hữu cơ có thể kéo dài cả năm (Son, 2004).

Có 35 loài tuyến trùng thuộc 19 chi được phân lập từ 432 mẫu đất và rễ tại 19 huyện thuộc sáu tỉnh Bắc Trung Bộ, Tây Nguyên và đảo Phú Quốc. Theo nghiên cứu, loài tuyến trùng chủ yếu có liên quan đến cây hồ tiêu ở Việt Nam là *M. incognita*. Không có sự khác biệt về tần suất xuất hiện của *M. incognita* giữa 3 vùng sinh thái nông nghiệp. Tuy nhiên, mật độ quần thể của *M. incognita* trên cây tiêu trung bình cao hơn khoảng 5 lần ở Bắc Trung Bộ và Tây Nguyên so với Phú Quốc. Sự khác biệt lớn về mật độ quần thể cũng được quan sát ở các huyện khác nhau trong cùng một vùng sinh thái nông nghiệp. Tỷ lệ chết rễ trung bình khoảng 40% ở cả ba vùng sinh thái nông nghiệp. Tỷ lệ tiêu bị vàng lá trung bình khoảng 20 - 25% ở Bắc Trung Bộ và Tây Nguyên, cao hơn so với đảo Phú Quốc (16,9%). Nhìn

chung mật độ quần thể *M. incognita* trong đất và rễ trên cây tiêu và tỷ lệ cây vàng lá có mối quan hệ thuận. Ở huyện Quảng Trị, mật độ tuyến trùng *M. incognita* tương đối cao dẫn đến tỷ lệ cây bị vàng lá cao (Thuy và cs., 2012).

Tại Cam Lộ, Quảng Trị, nghiên cứu về thành phần loài tuyến trùng trên hồ tiêu cho thấy *Meloidogyne* là loài phổ biến nhất, với mật độ cao nhất trong đất và rễ cây vào tháng 2 (thời điểm thích hợp cho tuyến trùng tăng sinh). Tại Phú Quốc tỷ lệ hồ tiêu nhiễm *M. incognita* là 98,4%. Nghiên cứu về đa dạng quần xã tuyến trùng đất tại vùng trồng hồ tiêu tỉnh Đồng Nai (tháng 4 năm 2013) chỉ ra rằng *Meloidogyne* là nhóm tuyến trùng chiếm ưu thế và có mặt ở tất cả các điểm thu mẫu (11,6 - 60,3%). Năm 2016, có 6,737 ha diện tích bị nhiễm tuyến trùng, tăng 2.066 ha so với cùng kỳ năm trước, với hơn 98% (6.624 ha) diện tích nhiễm *Meloidogyne* và gây ra bệnh chết nhanh, chết chậm. Năm 2018, khoảng 105 ha hồ tiêu ở giai đoạn thu hoạch bị chết chậm và 20 ha bị chết nhanh ở Phú Yên (Nga và cs., 2015).

1.2.3. Tình hình ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống kháng bệnh tuyến trùng ở cây hồ tiêu trên thế giới và ở Việt Nam

❖ Trên thế giới

Việc tách chiết DNA từ lá tiêu là một thách thức do sự hiện diện của một lượng đáng kể polysaccharide, polyphenolic và các thành phần hóa học khác. Thường thì, các lá tiêu non được tách chiết DNA bằng phương pháp cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). Đồng thời, 2 – mercaptoethanol, PVP (poly vinyl pyrrolidone, khối lượng phân tử: 40,000), 1% natri metabisulfite và 5M NaCl, được sử dụng để loại bỏ các polyphenol và polysaccharide. DNA bộ gen thu được từ các lá non tiêu dao động trong khoảng 75 - 120 µg/g (Ashokkumar và cs., 2020).

Những ứng dụng của chỉ thị phân tử để chọn tạo giống hồ tiêu kháng tuyến trùng còn nhiều khó khăn vì hệ gen nhân của hồ tiêu chưa được giải trình tự toàn bộ. Nghiên cứu về bộ gen sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho các nghiên cứu di truyền, xác định QTL (Quantitative Trait Locus), tăng cường di truyền và cải tiến giống hồ tiêu. Thông tin về trình tự bộ gen *Piper nigrum* gần đây đã được dùng để nhận dạng và mô tả đặc điểm của chuỗi lặp lại trình tự đơn giản (SSR). Tổng số 69.126 SSR đã được xác định từ bộ gen của *P. nigrum*. Sự đa dạng di truyền của 30 dòng/giống tiêu được chỉ ra khi sử dụng 50 SSR. Hơn nữa, khả năng khuếch đại ở các loài khác nhau của SSR cũng đã được kiểm tra. Trong 50 SSR được sử dụng, 19 và 31 SSR được khuếch đại lần lượt ở 9 và 7 loài. Do đó, SSR có thể ứng dụng ở các loài *Piper* khác chưa có thông tin về trình tự bộ gen (Kumari và cs., 2019).

Trong các lĩnh vực đánh giá nguồn gen, lập bản đồ gen, xác định gen dựa trên bản đồ và nhân giống cây trồng được hỗ trợ bởi chất chỉ thị ở hồ tiêu và các loài liên quan, các chất chỉ thị phân tử đã được nghiên cứu rộng rãi. Với sự tiến bộ của công nghệ giải trình tự, các công cụ chỉnh sửa bộ gen tiên tiến, đặc biệt là công nghệ CRISPR/Cas, đang trở nên khả dụng (Khew và cs., 2022).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn lọc giống hồ tiêu kháng tuyến trùng dựa trên kết quả nghiên cứu của Trương và cộng sự (2013). Cụ thể là, ba trong số 400 môi RAPD (UBC484, 504 và 553) đã cho thấy tính đa hình giữa các mẫu (ở kỹ thuật BSA). Từ các băng đa hình của 3 môi này tiến hành phát triển chỉ thị SCAR. Tuy nhiên, chỉ một trình tự đã được chuyển đổi thành công thành chỉ thị SCAR SA133_4 liên kết với tính trạng kháng *Phytophthora* ở ớt. Phân tích liên kết di truyền cho thấy các chỉ thị SCAR và RAPD nằm trên nhiễm sắc thể số 5 của hồ tiêu. Phân tích định lượng tính trạng (QTL) cho thấy SA133_4 và UBC553 có liên quan đến khả năng kháng *Phytophthora*.

❖ Ở Việt Nam

Các ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn lọc nhanh các giống cây hồ tiêu kháng sâu bệnh hại ở Việt Nam vẫn còn hạn chế. Việc ứng dụng các kỹ thuật công nghệ sinh học trong chọn giống chống chịu điều kiện bất lợi của môi trường trên cây hồ tiêu vẫn chưa được thực hiện. Do đó cần được khuyến khích thực hiện nhằm chọn tạo nhanh giống/dòng hồ tiêu có khả năng chống chịu sâu bệnh hại đặc biệt là bệnh chết nhanh và chết chậm để thúc đẩy và ổn định sản xuất hồ tiêu bền vững.

1.2.4. Tình hình lai tạo giống hồ tiêu kháng tuyến trùng trên thế giới và ở Việt Nam

❖ Trên thế giới

Giống hồ tiêu lai đầu tiên giữa các loài có khả năng kháng *Phytophthora* được tạo ra thông qua lai giữa *Piper nigrum* với loài hoang dã *P. colubrinum*. Khả năng lai của các cây khác loài được kiểm tra thông qua các đánh giá về hình thái, giải phẫu, tế bào học và phân tử. Các đoạn môi RAPD OPE 07 và OPG 08 được xác định là các chỉ thị phân tử lai đặc hiệu. Đánh giá chức năng cho thấy có sự xâm nhập một phần của gen - chịu trách nhiệm về tính kháng bệnh *Phytophthora*. Đây sẽ là tiền đề để tạo *Piper* có khả năng kháng *P. nigrum*. Nhiễm sắc thể của *P. nigrum* sẽ có xu hướng lai tốt hơn với các giống cùng/gần loài chứ không phải so với các nhiễm sắc thể tương đồng của *P. colubrinum*. Do đó, Kimber đã chỉ ra rằng chuyển gen bằng tái tổ hợp tự phát sẽ có xác suất thành công thấp do mức ghép đôi nhiễm

sắc thể thấp. Do đó, phương pháp thay thế sẽ phải cần để việc chuyển gen (Kimber, 1984). Hướng tới mục tiêu này, hạt lưỡng bội thu được từ thế lai F1 có thể là vật liệu khởi đầu tốt nhất để cải tiến di truyền của hồ tiêu (Vanaja và cs., 2008).

Bhai, S, (2010) đã sàng lọc các thể hệ cây con thụ phấn tự nhiên của hồ tiêu trong giai đoạn 2004 - 2006 để xác định các nguồn kháng *P. capsici* và tuyển trùng. Tổng số 11.632 cây con được trồng, từ 30 giống cây trồng, 42 giống lai và chọn lọc thụ phấn tự do 1 lần đã được sàng lọc sơ bộ. Đã có 21 thể hệ Karimunda, 10 thể hệ con từ các giống khác, 8 thể hệ con lai và 1 thể hệ con từ tuyển chọn “IISR Shakti” không bị nhiễm *P. capsici* được nhân giống sinh dưỡng và trải qua vòng sàng lọc thứ hai áp dụng cây ghép gốc. Trong số 11.632 thể hệ được sàng lọc, có 1 thể hệ con '04 - P24 - 1' cho thấy phản ứng kháng và thể hệ con lai 04 – HP – 400 - 1 kháng *P. capsici* ở mức trung bình. Ngoài ra dòng con 04 - HP 1533 (2) có phản ứng kháng tuyển trùng. Đây là báo cáo đầu tiên về việc xác định nguồn kháng *Phytophthora* trong hồ tiêu (*P. nigrum* L.) và quy trình này có thể được sử dụng để sàng lọc các thể hệ hồ tiêu thụ phấn tự do (Bhai và cs., 2010).

❖ Ở Việt Nam

Chưa có nghiên cứu lai tạo giống hồ tiêu kháng tuyển trùng nào ở Việt Nam.

1.2.5. Tình hình sản xuất và sử dụng cây ghép hồ tiêu kháng tuyển trùng ở trên thế giới và ở Việt Nam

❖ Trên thế giới

Nhân giống hồ tiêu bằng phương pháp ghép để hạn chế ảnh hưởng của tuyển trùng *Meloidogyne* và nấm đã được nghiên cứu ở nhiều nước. Giống *Piper colubrinum* được sử dụng làm gốc ghép với các giống tiêu Balamcotta, tiêu Kalluvail và tiêu Singapura. Kết quả cho thấy, khả năng tương thích giữa gốc ghép và chồi ghép rất tốt sau 4 năm. Năm 1981, Nuryani đã ghép gốc ghép *P. chaba* Hunter với ngọn ghép là giống tiêu sản xuất nhưng không thành công. Ngay vị trí vết ghép bị tách ra sau 2 năm, có thể là do gốc và chồi ghép không tương hợp (Nuryani, 1981).

Tại Brazil, đã sử dụng giống *P. columbrium* mọc hoang dại trong rừng Amazon làm gốc ghép kháng tuyển trùng và bệnh thối rễ *Phytophthora* sp. Sử dụng giống tiêu ghép Singapura cho 500 g tiêu đen sau 1 năm ghép và cho 2-3 kg sau 2 - 3 năm ghép. Ở Puerto Rico, cây tiêu ghép dùng ngọn Balancotta và Kalluvail ghép trên gốc *P. columbrium* phát triển tốt hơn nhiều so với những cây không ghép, đặc biệt là khi trồng với trụ bê tông (Ravindran, 2000).

Mathew, P. A, đã tiến hành ghép 20 giống tiêu trên gốc *P. colubrinum* trong điều kiện bóng râm hoặc trong nhà lưới với 50% ánh sáng và tưới nước hàng ngày. Kết quả cho thấy, *P. colubrinum* tương thích với hầu hết các giống. Độ cao vết ghép thích hợp nhất là cách mặt đất 50 cm nhằm hạn chế các sự lây nhiễm nấm bệnh từ đất. Tuy nhiên sau 4 năm cây có biểu hiện sinh trưởng kém. Nguyên nhân có thể do nhu cầu nước cho cây tiêu không đáp ứng hoặc khả năng tương hợp thấp (Mathew & Rema, 2000). Hai loại gốc ghép *P. colubrinum* và *P. arboreum* kháng bệnh chết nhanh và tuyến trùng. Riêng *P. colubrinum* được xác định là có triển vọng nhất cho việc ghép. Các kỹ thuật ghép khác nhau đã được thử nghiệm như: ghép vạt ngọn, ghép yên ngựa, ghép mắt, và ghép. Khi ghép tiêu lên gốc ghép *Piper colubrinum*, trong giai đoạn 5 - 6 năm đầu rất thành công trong việc chống lại bệnh chết nhanh. Việc ghép *P. nigrum* trên gốc *P. colubrinum* có khả năng chống được bệnh hại về rễ, đặc biệt có khả năng kháng nấm *Phytophthora*. Thời gian ghép được tiến hành vào tháng 2, 3 trong năm và tỷ lệ cây ghép sống là trên 90% (Ravindran, 2006).

Thomas một nông dân Ấn Độ đã ghép thành công giống tiêu *P. thekken* lên gốc tiêu *P. colubrinum*. Giống này đã được Viện Nghiên cứu Gia vị Ấn Độ công nhận là giống cho năng suất cao, nhiều cành nhánh, chống chịu được bệnh chết nhanh. Ở Malaysia gốc ghép *P. colubrinum* và *P. cubeba* được ghép với giống tiêu trong sản xuất (*P. nigrum*) là không tiếp hợp. Đồng thời thử nghiệm các cách ghép khác nhau như ghép mắt, ghép kiểu yên ngựa, ghép vạt ngọn và ghép nêm nhưng kết quả không có sự khác biệt. Hầu hết sau bốn năm trồng, cây tiêu suy yếu dần, tuy nhiên sự không tương hợp này không biểu hiện ở giai đoạn vườn ươm, đồng thời tại vị trí ghép phình to lên, vỏ xuất hiện những vết nứt dọc (Paulus & Eng, 2005).

Ở Brazil sử dụng giống *P. colubrinum* để làm gốc ghép, cây tiêu ghép phát triển tốt vào giai đoạn đầu, tuy nhiên sau khi trồng bốn năm cây tiêu ghép sinh trưởng kém dần (Ravindran, 2000). Những thí nghiệm sử dụng gốc ghép giống *Piper chaba* ghép với nhiều giống tiêu đang trồng trong sản xuất nhưng không thành công, do vị trí ghép bị tách sau hai năm trồng có lẽ do không tương thích (Manohara, 2004).

❖ Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, hiện vẫn chưa có giống hồ tiêu nào có khả năng kháng tuyến trùng và đảm bảo năng suất chất lượng tốt. Bên cạnh đó, việc chọn tạo giống với cây công nghiệp dài ngày thường mất nhiều thời gian và công sức. Vì vậy, việc sử dụng các gốc ghép có khả năng kháng tuyến trùng ở hồ tiêu để tạo giống là cần thiết. Nam, T. N. T, 2009 đã ghép tiêu trồng (*Piper nigrum*) trên gốc trầu không.

Kết quả cho thấy không có sự tiếp hợp do tiêu và trầu không có vòng tượng tầng tập trung, mạch gỗ ít phát triển (Nam, 2009). Ngoài ra, Nam, T. N. T, đã lấy mẫu đất quanh vùng rễ gốc ghép tiêu rừng Nam Mỹ (*P. divaricatum*) ở các cây được 9 năm tuổi để phân tích tuyến trùng và nấm bệnh, kết quả là trong rễ không có tuyến trùng *Meloidogyne* spp., tuyến trùng *Pratylenchus* spp. và nấm *Phytophthora* spp.

Tại Gia Lai, Lang, N. H. T, đã tiến hành ghép hom thân giống Vĩnh Linh trên gốc trầu không. Cây vẫn sinh trưởng phát triển tốt sau 15 năm. Năng suất đạt 3 - 4 kg/trụ. Tuy nhiên, gốc ghép lại bị phình chân voi.

Hiền, T. T. D, (2019) đã đánh giá được giống hồ tiêu rừng Nam Mỹ (*P. divaricatum*); giống trầu không (lá nhỏ và lá to) có khả năng chống chịu tốt với nấm *P. a capsici* và tuyến trùng *Meloidogyne* spp. Những giống này đang được đưa vào nghiên cứu sử dụng làm gốc ghép cho cây hồ tiêu (Hiền, 2019).

Quyện, N. T, (2020) đã nghiên cứu ghép hồ tiêu để tạo ra các tổ hợp ghép có khả năng chống chịu nấm và tuyến trùng. Kết quả là Trầu lá nhỏ, Trầu lá lớn, Tiêu rừng Nam Mỹ (*Piper divaricatum*) có khả năng chống chịu tốt với nấm *Phytophthora capsici* và *Meloidogyne* spp. Khả năng tiếp hợp của vết ghép và sinh trưởng của chồi ghép giai đoạn trong vườn ươm rất tốt, tỷ lệ sống đạt trên 85% sau 3 tháng ghép. Tuy nhiên, khi trồng ra đồng ruộng ngay trong năm đầu tiên hai tổ hợp ghép giữa gốc Trầu lá lớn, Trầu lá nhỏ với chồi ghép giống tiêu Vĩnh Linh tỏ ra sinh trưởng chậm và tỷ lệ chết rất cao. Trong khi, tổ hợp ghép giữa Tiêu rừng Nam Mỹ và tiêu Vĩnh Linh sinh trưởng và tỷ lệ sống cao, nhưng chịu hạn rất kém, yêu cầu chế độ tưới vào mùa khô khá dày 7 ngày/lần và có che bóng (Quyện và cs., 2020).

Năm 2020 - 2021, Ngọc, N. Q, đã tiến hành tuyển chọn các dòng/giống gốc ghép hồ tiêu có khả năng kháng nấm *Phytophthora* spp. và tuyến trùng. Đề tài đã thu thập, tuyển chọn được 01 tổ hợp ghép tương thích tốt giữa ngọn ghép tiêu Vĩnh Linh và gốc ghép của giống tiêu địa phương Gia Lai (L1) và có khả năng kháng nấm *Phytophthora capsici* ở giai đoạn vườn ươm. Tuy nhiên, chưa đánh giá được khả năng thích ứng trong điều kiện sản xuất (Ngọc và cs., 2021).

Tính đến nay, trên thế giới đã có một số nghiên cứu về việc ghép hồ tiêu. Tuy nhiên, vẫn chưa có nước nào phát triển tiêu ghép thành công. Tại Việt Nam, việc trồng tiêu ghép chủ yếu do nông dân tự phát là chính, có những diện tích trồng thất bại nhưng cũng có những diện tích sinh trưởng phát triển bước đầu rất tốt và đồng đều. Điều này có thể do kỹ thuật trồng và chăm bón khác nhau giữa các chủ vườn.

Chương 2

NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn hồ tiêu được thu thập ở Việt Nam
- Chọn lọc các dòng/giống hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng và chịu úng
- Phát triển chỉ thị phân tử DNA liên kết có khả năng kháng với tính kháng tuyến trùng của cây hồ tiêu bằng phương pháp BSA.
- Đánh giá đặc điểm ra hoa của một số dòng/giống hồ tiêu loài *P. nigrum* L. và khả năng lai tạo với loài *P. divaricatum* kháng tuyến trùng nhằm tạo dòng/giống hồ tiêu mới
- Chọn lọc gốc ghép kháng tuyến trùng và đánh giá khả năng ghép thành công trên gốc ghép kháng tuyến trùng đối với một số dòng/giống tiêu thương mại
- Đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của các cây ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng trong điều kiện nhà màng

2.2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Đề tài kế thừa và sử dụng 39 dòng/giống hồ tiêu được thu thập từ các vùng trồng tiêu ở Việt Nam và trồng tại nhà ươm của Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế từ đề tài khoa học và công nghệ cấp Quốc gia (Mã số: ĐTĐ.CN-08/20) (Bảng 2.1). Các hom hồ tiêu được trồng trong chậu 23 x 13 cm có chứa đất và phân hữu cơ (tỷ lệ 3:1). Sau ba tháng, cây được chuyển sang chậu 36 x 29 x 29 cm; 100 mỗi RAPD được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền (Bảng 2.2).

Bảng 2.1. Danh sách 39 dòng/giống hồ tiêu được sử dụng trong nghiên cứu này

STT	Ký hiệu dòng/giống	Tên dòng/giống theo địa phương thu thập	Nguồn gốc thu thập	Địa điểm thu thập
1	HUIB_PN10	Tiêu Vĩnh Linh	Gio An – Quảng Trị	*Gia Lai, Việt Nam
2	HUIB_PN20	Tiêu Vĩnh Linh	Cẩm Mỹ - Đồng Nai	*Gia Lai, Việt Nam
3	HUIB_PN21	Tiêu Tiên Phước	Tiên Phước, Quảng Nam	Quảng Nam, Việt Nam
4	HUIB_PN27	Tiêu Vĩnh Linh	Vĩnh Linh, Quảng Trị	Quảng Trị, Việt Nam
5	HUIB_PN29	Tiêu Cù	Cù, Quảng Trị	Quảng Trị, Việt Nam
6	HUIB_PH30	Tiêu rừng lá tròn	Hướng Hóa, Quảng Trị	Quảng Trị, Việt Nam
7	HUIB_PN34	Tiêu Sır Lanka	Trung tâm Hồ tiêu Gia Lai	Đắk Lắk, Việt Nam
8	HUIB_PN35	Tiêu địa phương	Ban Mê Thuật, Đắk Lắk	*Gia Lai, Việt Nam
9	HUIB_PD36	Tiêu rừng Nam Mỹ	Trung tâm Hồ tiêu Gia Lai	*Gia Lai, Việt Nam
10	HUIB_PN38	Tiêu Vĩnh Linh	Ban Mê Thuật, Đắk Lắk	Quảng Trị, Việt Nam

STT	Ký hiệu dòng/giống	Tên dòng/giống theo địa phương thu thập	Nguồn gốc thu thập	Địa điểm thu thập
11	HUIB_PR41	Tiêu Lốt	Hướng Hóa, Quảng Trị	Quảng Trị, Việt Nam
12	HUIB_PN42	Tiêu Lộc Ninh	Trung tâm Hồ tiêu Gia Lai	*Gia Lai, Việt Nam
13	HUIB_PN43	Tiêu Ấn Độ	Trung tâm Hồ tiêu Gia Lai	*Gia Lai, Việt Nam
14	HUIB_PN45	Tiêu Lộc Ninh	Trung tâm Hồ tiêu Gia Lai	*Gia Lai, Việt Nam
15	HUIB_PH46	Tiêu rừng lá dài	Hướng Hóa, Quảng Trị	Quảng Trị, Việt Nam
16	HUIB_PN47	Tiêu Tân Lâm	Tiên Phước, Quảng Nam	Quảng Nam, Việt Nam
17	HUIB_PR48	Tiêu Bầu Mây	Hướng Hóa, Quảng Trị	Quảng Trị, Việt Nam
18	HUIB_PN50	Tiêu Indo 1	Hớn Quân, Bình Phước	*Gia Lai, Việt Nam
19	HUIB_PN52	Tiêu Bình Phước	Hớn Quân, Bình Phước	Bình Phước, Việt Nam
20	HUIB_PN54	Tiêu Vĩnh Linh	Xuân Lộc, Đồng Nai	Đồng Nai, Việt Nam
21	HUIB_PN55	Tiêu Hà Tiên	Phú Quốc	Phú Quốc, Việt Nam
22	HUIB_PN56	Tiêu Ba Lê	Ba Tơ, Quảng Ngãi	Quảng Ngãi, Việt Nam
23	HUIB_PN69	Tiêu Ấn Độ	Chư Prông- Gia Lai	*Gia Lai, Việt Nam
24	HUIB_PN70	Tiêu Ấn Độ	Xuyên Mộc, Bà Rịa Vũng Tàu	*Gia Lai, Việt Nam
25	HUIB_PN84	Tiêu địa phương	Cầm Mỹ, Đồng Nai	*Gia Lai, Việt Nam
26	HUIB_PN87	Tiêu địa phương	Cầm Mỹ, Đồng Nai	*Gia Lai, Việt Nam
27	HUIB_PN89	Tiêu địa phương	Buôn Hồ, Đắk Lắk	*Gia Lai, Việt Nam
28	HUIB_PN91	Tiêu Sẻ địa phương	CưKuin, Đắk Lắk	*Gia Lai, Việt Nam
29	HUIB_PN93	Tiêu Bầu Mây	Xuyên Mộc, BRVT	*Gia Lai, Việt Nam
30	HUIB_PN95	Tiêu Mã Lai	Xuân Lộc, Đồng Nai	*Gia Lai, Việt Nam
31	HUIB_PN96	Tiêu Mã Lai	Camphuchia	*Gia Lai, Việt Nam
32	HUIB_PN97	Tiêu Sri Lanka	Lộc Ninh-Bình Phước	*Gia Lai, Việt Nam
33	HUIB_PN101	Tiêu Phú Quốc	Chư Prông, Gia Lai	*Gia Lai, Việt Nam
34	HUIB_PN102	Tiêu Phú Quốc	Đức cơ – Gia Lai	*Gia Lai, Việt Nam
35	HUIB_PN105	Tiêu Không tên	Đắk Nông	*Gia Lai, Việt Nam
36	HUIB_PN113	Tiêu Sri Lanka	Sri Lanka	*Gia Lai, Việt Nam
37	HUIB_PN114	Tiêu Indo 2	(PRDC) Indonesia	*Gia Lai, Việt Nam
38	HUIB_PN115	Tiêu Nata 1	(PRDC) Indonesia	*Gia Lai, Việt Nam
39	HUIB_PN116	Tiêu Chùm	Bà Rịa Vũng Tàu	*Gia Lai, Việt Nam

Chú thích: * Trung tâm nghiên cứu và phát triển cây hồ tiêu, thành phố Pleiku, Gia Lai

Bảng 2.2: Danh sách môi UBC RAPD được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền

STT	Môi	Trình tự (5'-3')	STT	Môi	Trình tự (5'-3')	STT	Môi	Trình tự (5'-3')
1	UBC#301	ACGGCAGTGG	68	UBC#368	ACTTGTGCGG	135	UBC#435	CTAGTAGGGG
2	UBC#302	ACTTCCTCCA	69	UBC#369	GCGCATAGCA	136	UBC#436	GAGGGGGCCA
3	UBC#303	GGTCTCCTAG	70	UBC#370	TCAGCCAGCG	137	UBC#437	AGTCCGCTGC
4	UBC#304	CCTCACCTGT	71	UBC#371	TCTCGATTGC	138	UBC#438	AGACGGCCGG
5	UBC#305	CTAGGGGCTG	72	UBC#372	CCCACTGACG	139	UBC#439	GCCCCTTGAC

STT	Môi	Trình tự (5'-3')	STT	Môi	Trình tự (5'-3')	STT	Môi	Trình tự (5'-3')
6	UBC#306	CGGAGAGCGA	73	UBC#373	CTGAGGAGTG	140	UBC#440	CTGTCTGAACC
7	UBC#307	GTGGCCGCGC	74	UBC#374	GGTCAACCCT	141	UBC#441	CTGCTTCTT
8	UBC#308	CCGGCATAGA	75	UBC#375	CCGGACACGA	142	UBC#442	CTACTCGGTT
9	UBC#309	ATCTAGGGAC	76	UBC#376	CAGGACATCG	143	UBC#443	TGATTGCTCG
10	UBC#310	GCCGCTACTA	77	UBC#377	GACGGAAGAG	144	UBC#444	GCAGCCCAT
11	UBC#311	GACATCTCGC	78	UBC#378	GACAACAGGA	145	UBC#445	TAGCAGCTTG
12	UBC#312	ACAGGGAACG	79	UBC#379	GGGCTAGGGT	146	UBC#446	GCCAGCGTTC
13	UBC#313	TCTAAGCTCG	80	UBC#380	AGGAGTGAGA	147	UBC#447	CAGGCTCTAG
14	UBC#314	CGGATCTCTA	81	UBC#381	ATGAGTCCTG	148	UBC#448	GTTGTGCCTG
15	UBC#315	ATACGGCGTC	82	UBC#382	ATACACCAGC	149	UBC#449	GAGGTTCAAC
16	UBC#316	ATGGCCTTAC	83	UBC#383	GAGGCGCTGC	150	UBC#450	CGGAGAGCCC
17	UBC#317	GCGAACCTCC	84	UBC#384	TGCGCCGCTA	151	UBC#451	CTAATCTCGC
18	UBC#318	GGTGGTTTCC	85	UBC#385	ACCGGGAACG	152	UBC#452	CTAATCACGG
19	UBC#319	GCCTAGTCAC	86	UBC#386	TGTAAGCTCG	153	UBC#453	AGTACAAGGG
20	UBC#320	AACGCGTAGA	87	UBC#387	CGCTGTCCGC	154	UBC#454	GCTTACGGCA
21	UBC#321	GAATGCGACG	88	UBC#388	CGGTCGCGTC	155	UBC#455	AGCAAGCCGG
22	UBC#322	ATGGCAAAGC	89	UBC#389	CGCCCGCAGT	156	UBC#456	GCGGAGGTCC
23	UBC#323	TGGACCACCC	90	UBC#390	TCACTCAGAG	157	UBC#457	CGACGCCCTG
24	UBC#324	GCCACGGAGA	91	UBC#391	GCGAACCTCG	158	UBC#458	CTCACATGCC
25	UBC#325	TCCCGAACCG	92	UBC#392	CCTGGTGGTT	159	UBC#459	GCGTCGAGGG
26	UBC#326	CTGTGGCGGT	93	UBC#393	TTCCATGCCT	160	UBC#460	ACTGACCGGC
27	UBC#327	CTCACTTGGG	94	UBC#394	TCACGCAGTT	161	UBC#461	CCCGTATGTC
28	UBC#328	GAGAGGCACC	95	UBC#395	TCACTTGAGG	162	UBC#462	CATAGCGGCA
29	UBC#329	CTGGGGCCGT	96	UBC#396	GAATGCGAGG	163	UBC#463	AGGCGGAAGC
30	UBC#330	GAGATCCCTC	97	UBC#397	GGGCTGTGCC	164	UBC#464	CACAAGCCTG
31	UBC#331	TGTTAGGCTC	98	UBC#398	CAGTGCTCTT	165	UBC#465	GGTCAGGGCT
32	UBC#332	TGTTAGGCAC	99	UBC#399	TTGCTGGGCG	166	UBC#466	TTCTTAGCGG
33	UBC#333	GCGTGACCCG	100	UBC#400	GCCCTGATAT	167	UBC#467	AGCACGGGCA
34	UBC#334	TAGGCGAACG	101	UBC#401	TAGGACAGTC	168	UBC#468	ACGGAAGCGC
35	UBC#335	TTGCTTGGCG	102	UBC#402	CCCGCCCTTG	169	UBC#469	CTCCAGCAAA
36	UBC#336	CACGGCTGCG	103	UBC#403	GGAAGGCTGT	170	UBC#470	AGGAGCTGGG
37	UBC#337	GGAGCCCCCT	104	UBC#404	TCTCTACGAC	171	UBC#471	CCGACCGGAA
38	UBC#338	TGACGCGCTC	105	UBC#405	CTCTCGTGCG	172	UBC#472	AGGCGTGCAA
39	UBC#339	ACGGCAGTGG	106	UBC#406	GCCACCTCCT	173	UBC#473	ATCCCCAAGA
40	UBC#340	ACTTCCTCCA	107	UBC#407	TGGTCCTGGC	174	UBC#474	AGGCGGGAAC
41	UBC#341	GGTCTCCTAG	108	UBC#408	CCGTCTCTTT	175	UBC#475	CCAGCGTATT
42	UBC#342	CCTCACCTGT	109	UBC#409	TAGGCGGCGG	176	UBC#476	TTGAGGCCCT
43	UBC#343	CTAGGGGCTG	110	UBC#410	CGTCACAGAG	177	UBC#477	TGTTGTGCCC

STT	Môi	Trình tự (5'-3')	STT	Môi	Trình tự (5'-3')	STT	Môi	Trình tự (5'-3')
44	UBC#344	CGGAGAGCGA	111	UBC#411	GAGGCCCGTT	178	UBC#478	CGAGCTGGTC
45	UBC#345	GTGGCCGCGC	112	UBC#412	TGCGCCGGTG	179	UBC#479	CTCATAACGCG
46	UBC#346	CCGGCATAGA	113	UBC#413	GAGGCGGCGA	180	UBC#480	GGAGGGGGGA
47	UBC#347	ATCTAGGGAC	114	UBC#414	AAGGCACCAG	181	UBC#481	GTAATTGCGC
48	UBC#348	GCCGCTACTA	115	UBC#415	GTTCCAGCAG	182	UBC#482	CTATAGGCCG
49	UBC#349	GACATCTCGC	116	UBC#416	GTGTTTCCGG	183	UBC#483	GACTAAGAC
50	UBC#350	ACAGGGAACG	117	UBC#417	GÂCGGCCAA	184	UBC#484	CTGGCAAGGA
51	UBC#351	CTCCCGGTGG	118	UBC#418	GAGGAAGCTT	185	UBC#485	AGAATAGGGC
52	UBC#352	CACAACGGGT	119	UBC#419	TACGTGCCCG	186	UBC#486	CCAGAATCAG
53	UBC#353	TGGGCTCGCT	120	UBC#420	GCAGGGTTCC	187	UBC#487	GTGGCTAGGT
54	UBC#354	CTAGAGGCCG	121	UBC#421	ACGGCCCACC	188	UBC#488	TTCGCTTCTC
55	UBC#355	GTATGGGGCT	122	UBC#422	CACCTGCGGG	189	UBC#489	CGCACGCACA
56	UBC#356	GCGGCCCTCT	123	UBC#423	GGGTCTCGAA	190	UBC#490	AGTCGACCTT
57	UBC#357	AGGCCAAATG	124	UBC#424	ACGGAGGTTC	191	UBC#491	TCCTCTCAAG
58	UBC#358	GGTCAGGCC	125	UBC#425	CGTCGGGCCT	192	UBC#492	GTGACTGCTC
59	UBC#359	AGGCAGACCT	126	UBC#426	TCTCCCGGTG	193	UBC#493	CCGAATCACT
60	UBC#360	CTCTCCAGGC	127	UBC#427	GTAATCGACG	194	UBC#494	TGATGCTGTC
61	UBC#361	GCGAGGTGCT	128	UBC#428	GGCTGCGGTA	195	UBC#495	CTTTCCTTCC
62	UBC#362	CCGCCTTACA	129	UBC#429	AAACCTGGAC	196	UBC#496	CCTTCAAGG
63	UBC#363	ATGACGTTGA	130	UBC#430	AGTCGGCACC	197	UBC#497	GCATAGTGCG
64	UBC#364	GGCTCTCGCG	131	UBC#431	CTGCGGGTCA	198	UBC#5488	GACAGTCCTG
65	UBC#365	TAGACAGAGG	132	UBC#432	AGCGTCGACT	199	UBC#499	GGCCGATGAT
66	UBC#366	CCTGATTGCC	133	UBC#433	TCACGTCCT	200	UBC#500	TTGCGTCATG
67	UBC#367	ACCTTTGGCT	134	UBC#434	TCGCTAGTCC			

Nguồn dòng/giống tuyển trùng *Meloidogyne*: Tuyển trùng được lấy từ rễ cây hồ tiêu ở các vườn bị nhiễm bệnh vàng lá chết chậm ở Gia Lai, Việt Nam, sau đó ly trích tuyển trùng theo phương pháp lọc đã được mô tả bởi Hooper (1986). *M. incognita* được phòng thí nghiệm Vi sinh vật và Công nghệ lên men (Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế) định danh. Tuyển trùng được nhân dòng/giống trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới từ 4 - 6 tuần và được phân lập từ rễ bị nhiễm bệnh. Rễ được rửa sạch trong nước máy, trứng và con non được thu thập bằng cách lọc.

Vật liệu lai tạo: 5 dòng/giống hồ tiêu thuộc loài *Piper nigrum* L. có tên thường gọi tiêu Vĩnh Linh (HUIB_PN27), tiêu Sri Lanka (HUIB_PN97), tiêu Ấn Độ (HUIB_PN69), tiêu Phú Quốc (HUIB_PN101), tiêu Mã Lai (HUIB_PN96) và 01 dòng/giống tiêu rừng Nam Mỹ *Piper divaricatum* (HUIB_PD36). Các dòng/giống được trồng bằng hom thân trong chậu nhựa (đường kính 30 cm, chiều cao 40 cm). Mỗi

dòng/giống trồng 3 - 5 chậu, được chăm sóc trong điều kiện nhà lưới đến khi xuất hiện gié hoa (từ uơm đến khi ra gié là 5 tháng).

Vật liệu gốc ghép và ngọn ghép: có 6 loại gốc ghép và 4 loại ngọn ghép đã được sử dụng. Trong đó, các loại gốc ghép HUIB_PN105; HUIB_PN45; HUIB_PN27; HUIB_PH30; HUIB_PD36, HUIB_PH46 được uơm trong bầu đất sạch đã được hấp tiệt trùng (1,5 kg giá thể) với số lượng 30 bầu/loại gốc ghép. Các loại ngọn ghép là tiêu Vĩnh Linh – VL, tiêu Lộc Ninh – LN, tiêu Sri Lanka – SR, tiêu Ấn Độ - AD.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. *Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu được thu thập ở Việt Nam*

2.3.1.1. *Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng đặc điểm hình thái*

Mô tả chi tiết các loại vật liệu được thu thập dựa trên các tiêu chí của Viện Nghiên cứu Tài nguyên Di truyền thực vật Quốc tế (IPGRI, 1995), gồm: kiểu sinh trưởng (PGH), dạng phân cành (BT), màu đỉnh chồi cây con (YOSTC), sự sinh chồi từ thân (RSP), khả năng bám trụ (HC), sự sản sinh rễ bất định (ARP), lông tơ trên thân (POS), tập tính ra cành bên (LBH), hình dạng phiến lá (LLS), hình dạng gốc lá (LBS), mép lá (LM), kiểu gân lá (TOV), hướng mọc của bông (SO), hình dạng bông (SS), loại hoa (TH) và dạng quả (FS). Màu chồi được ghi lại bằng biểu đồ màu. Đối với phân tích cụm (R Development Core Team, 2008), tất cả các đặc điểm của mỗi lần đánh giá đã được chuẩn hóa và khoảng cách Euclide được tính bằng phương pháp nhóm cặp không trọng số với trung bình số học (UPGMA).

2.3.1.2. *Định danh các dòng/giống hồ tiêu đã thu thập dựa vào trình tự ITS*

Phương pháp chuẩn bị mẫu: Lấy những mẫu lá/chồi non có kích thước đồng đều, không bị bệnh, không bị dập nát, được bảo quản trong bao bì có đánh số để tránh nhầm lẫn. Các mẫu của các giống được thu thập cùng một thời điểm. Mẫu sau khi thu được lau rửa bằng cồn 70% và ngâm trong 1X TE buffer để loại bỏ tinh dầu.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Raz và Ecker (1997) với một số sửa đổi:

Bước 1: Nghiền 100 mg lá trong cối với 500 µl CTAB buffer (nghiền thật sánh, mịn). Sau đó đưa hỗn hợp vào ống Eppendorf (EP) 1,5 ml (Jet. BIO FIL, China)

Bước 2: Ủ ấm ống EP ở nhiệt độ 65°C để CTAB dễ dàng phá vỡ thành tế bào, giải phóng DNA (5 phút lắc 1 lần, trong vòng 30 phút).

Bước 3: Thêm 1 thể tích Chloroform : Isoamyl Alcohol (24 : 1).

Bước 4: Lắc đều, nhẹ, đưa đi cân và cho ly tâm lạnh (13.000 vòng trong 10 phút - 4°C). Sau đó, hút dịch nổi chuyển sang ống EP 1,5 ml mới

Bước 5: Thêm 2/3 thể tích dịch nổi Isopropanol, rồi lắc nhẹ và ủ lạnh trong 1 giờ.

Bước 6: Ly tâm lạnh 13.000 vòng 4°C trong 5 phút để thu phần kết tủa và đổ phần dịch trong ống sau khi ly tâm.

Bước 7: Thêm 500 µl 70% Ethanol vào lắc đều, nhẹ để rửa sạch Isopropanol. Sau đó, ly tâm 13.000 vòng ở 4°C trong 2 phút và đổ phần dịch. Chú ý cẩn thận để phần kết tủa không trôi ra ngoài

Bước 8: Thực hiện lại bước 7 thêm 1 lần

Bước 9: Ly tâm 13.000 vòng trong 1 phút và hút phần dịch trong ống ra. Sau đó đem phơi khô ống EP ở nhiệt độ phòng để DNA khô hẳn.

Bước 10: Sau khi khô, DNA được hòa tan trong 100 µl dung dịch TE (pH=8).

DNA sau khi tách chiết được kiểm tra trên agarose gel 1% trong dung dịch TBE 0,5X. DNA được nhuộm 10 µl *Loading dye* (Công ty TNHH giải pháp Y sinh ABT (ABT), Việt Nam), sau đó lắc đều và ủ 15 phút trước khi chạy điện di. Sản phẩm điện di được kiểm tra trên máy chụp gel và kiểm tra hình ảnh điện di.

Phương pháp tinh sạch DNA tổng số: Trường hợp DNA sau khi tách chiết còn bản thì tiến hành tinh sạch qua cột silica (ABT, Việt Nam)

Bước 1: Bổ sung 2/3 thể tích Isopropanol, lắc nhẹ và chuyển toàn bộ dịch lên cột silica.

Bước 2: Ly tâm 13.000 vòng 4°C, 1 phút và bỏ phần chất lỏng bên dưới ống thu.

Bước 3: Thêm 500 µl 70% Ethanol vào để rửa sạch Isopropanol. Sau đó, ly tâm 13.000 vòng ở 4°C trong 2 phút và đổ phần dịch.

Bước 4: Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút để làm khô cột hoàn toàn

Bước 5: Chuyển cột silica sang ống EP mới. Cho 100 µl EB buffer (evolution buffer) vào cột (ủ 5 phút) và ly tâm (13.000 vòng, 4°C trong 1 phút). Sau đó, bỏ cột silica và giữ lại ống EP chứa dịch DNA. Sau đó, bảo quản ống EP chứa dịch DNA ở - 20°C

Phương pháp định danh dựa trên trình tự vùng gen *ITSu1-4*:

Vùng gen *ITSu1-4* của các dòng/giống Hồ tiêu được khuếch đại trong phản ứng 25 µL, sử dụng OneTaq® DNA Polymerase (Biolabs Inc., New England) với 5 µL One Taq buffer (5X), 5 mM dNTP, 5 µM mỗi *ITSu1*, 5 µM mỗi *ITSu4* và 100 ng mẫu DNA (50 ng/µL), 0,125 µL (1,25 Unit) OneTaq® DNA Polymerase và nước cất vô trùng để đủ là 25 µl. Phản ứng PCR được thực hiện trên Applied

Biosystems - Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc. Hoa Kỳ). Trong đó, trình tự của các mồi như sau, ITSu1: GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG và ITSu4: RGTTCCTTTTCCTCCGCTTA (Cheng và cs., 2016). Chu trình nhiệt dựa trên nghiên cứu của Cheng và cộng sự (2016) với một thay đổi như sau: 95°C/5 phút; 30 chu kỳ x (95°C/40 giây; 56°C/1 phút; 72°C/1 phút); 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Các mẫu hiển thị một dải đơn rõ ràng đã được gửi giải trình tự đến Công ty Maccrogen, Hàn Quốc.

2.3.1.3. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng chỉ thị phân tử

Đầu tiên, 3 trong số 39 dòng/giống được chọn ngẫu nhiên để sàng lọc 100 mồi RAPD nhằm chọn ra mồi có tỷ lệ đa hình cao nhất. Các mồi đa hình sau đó được sử dụng để khuếch đại 39 dòng/giống hồ tiêu để đánh giá tính đa dạng di truyền.

PCR được thực hiện theo quy trình của Truong và cộng sự (2013). Thể tích phản ứng là 15 µl chứa 25 mM MgCl₂ (Bioline - Meridian, UK), 200 µM deoxyribonucleotide triphosphate mix (Bioline - Meridian, UK) (dNTP), 5X PCR buffer, 1U của Taq DNA polymerase (Bioline - Meridian, UK), 10 pmol mồi RAPD, 5 - 10 ng DNA tổng số và nước cất vô trùng. Chu kỳ nhiệt được sử dụng là 94°C - 3 phút, sau đó là 40 chu kỳ ở 94°C - 1 phút, 37°C - 1 phút và 72°C - 2 phút, và cuối cùng hoàn thành phản ứng ở 72°C - 7 phút. Các sản phẩm khuếch đại sau đó được phân tách bằng điện di trên gel agarose 1% (Truong và cs., 2013).

2.3.2. Chọn lọc các dòng/giống hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng và chịu úng

2.3.2.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của tập đoàn hồ tiêu

- **Chuẩn bị dòng/giống thí nghiệm:** Tiêu được ương 2 hom/bầu, mỗi hom 3 mắt cắm vào bầu đất với kích thước 13 x 23 cm. Chăm sóc cây hồ tiêu theo đúng quy trình chăm sóc cây trong vườn ương của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn). Khi cây được 3 - 5 lá thì tiến hành lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita*.

- **Phương pháp bố trí thí nghiệm:** thí nghiệm được bố trí trong nhà lưới theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức gồm 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc gồm 10 cây.

- **Phương pháp thu tuyến trùng *M. incognita*:** Chọn những rễ hồ tiêu với nhiều nốt sưng từ các vườn tiêu bị nhiễm bệnh vàng lá ở Gia Lai. Áp dụng TCVN 12194 - 1: 2019 về quy trình giám định tuyến trùng *M. incognita* gây bệnh thực vật để thu trứng và tuyến trùng *M. incognita* tuổi 2 (J2) (Châu & Thanh, 2000). Sau đó, nhân dòng/giống tuyến trùng *M. incognita* J2 trên cà chua.

- **Phương pháp ly trích tuyến trùng *M. incognita* từ rễ:** sử dụng phương pháp lọc (Macerationsieving method) (Hooper, 1986).

Đầu tiên, chuẩn bị khay và lưới lọc có đường kính mắt lưới 2mm. Đặt lớp giấy lọc lên trên mặt lưới. Cân 5 g rễ tiêu cho vào máy xay, xay và rải đều trên mặt giấy. Đặt giấy và rải mẫu phải thật nhẹ để tránh rách, thủng giấy lọc. Đổ nước dọc mép khay sao cho nước chỉ vừa ướt lớp giấy lọc. Sau 24 – 48 giờ, đổ nước dưới rây vào cốc thủy tinh và kiểm tra dưới kính lúp soi nổi với độ phóng đại từ 10 – 40 lần. Nếu phát hiện thấy tuyến trùng, dùng đầu col của micropipet để đưa tuyến trùng lên lam và quan sát dưới kính hiển vi có độ phóng đại 40 – 1.000 lần. Quan sát lần lượt cho đến khi nước trong cốc thủy tinh hết. Sau khi các đặc điểm hình thái và số đo được ghi nhận, tuyến trùng *M. incognita* được chuyển vào các ống li tâm nhỏ chứa 20 μ l dung dịch đệm Worm Lysis Buffer (WLB) (50 mM KCL; 10 mM Tris pH 8,3; 2,5 mM MgCl₂; 0,45% NP 40 (Tergitol Sigma); và 0,45% Tween 20).

- **Tách chiết DNA tổng số:** khoảng 300 cá thể tuyến trùng *M. incognita* sau khi được ly trích thì ly tâm và chuyển sang ống 1,5 mL. DNA tổng số được tách từ tuyến trùng *M. incognita* bằng kit FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Đài Loan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuếch đại DNA bằng phản ứng chuỗi (PCR): vùng ITS được khuếch đại bằng mồi xuôi ITS - F (5' – TGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATC - 3') và mồi ngược ITS - R (5' – CCTATTTAGTTTCTTTTCCTCCGC - 3') (Saeki và cs., 2003). Một phần của gen SEC1 được khuếch đại sử dụng mồi xuôi SEC1 - F (5' – GGGCAAGTAAGGATGCTCTG - 3') và mồi ngược SEC1 - R (5' – GCACCTCTTTCATAGCCACG - 3') (Tesařová và cs., 2003). Với cả 2 phản ứng, chu trình PCR bao gồm 4 phút biến tính ban đầu tại 94°C, theo sau là 40 chu kỳ bao gồm 15 giây biến tính tại 94°C, 15 giây bắt cặp tại 60°C và 60 giây kéo dài tại 72°C; cuối cùng là chu kỳ kéo dài cuối tại 72°C trong 5 phút. Điện di trên gel Agarose: nạp sản phẩm PCR trên gel agarose 1% được nhuộm với SYBGR. Kiểm tra chất lượng DNA dựa trên các băng quan sát được.

- **Phương pháp lây nhiễm:** Khi tiêu được 3 tháng tuổi thì lây nhiễm. Mật độ *M. incognita* sử dụng là 100 con tuổi 2 (J2) trên 100 g giá thể. Tiến hành đổ 50 mL dung dịch chứa khoảng 1500 con tuyến trùng *M. incognita* vào mỗi bầu dồng/giống (1,5 kg giá thể). Lót đĩa nhựa dưới các bầu dồng/giống để tránh tuyến trùng *M. incognita* ra ngoài. Thường xuyên tưới nước để duy trì độ ẩm cho bầu cây trong suốt thí nghiệm.

- **Chỉ tiêu theo dõi:** Tỷ lệ rễ bị nốt sưng (%), tỷ lệ cây bị nhiễm bị vàng lá (%).

2.3.2.2. Đánh giá khả năng chịu úng của một số dòng/giống hồ tiêu

- **Đánh giá khả năng chịu úng**

Cây hồ tiêu sau khi chuyển ra chậu 12 tháng sẽ được xử lý ngập úng. Toàn bộ chậu được ngâm dưới nước trong 4 ngày. Tỷ lệ sống sót được xác định sau 15 ngày.

- **Đánh giá đặc điểm vi phẫu của các dòng/giống chịu úng**

Mặt cắt ngang được chuẩn bị từ phần gốc xuyên tâm của rễ và thân. Các mặt cắt ngang được ngâm trong natri hypoclorit (5%) trong 20 phút rồi rửa bằng nước cất. Sau đó, các mặt cắt được ủ trong axit axetic (1%), 2 phút và rửa bằng nước cất trước khi nhuộm màu xanh methyl và carmine như mô tả của Tran và cộng sự (2022). Phân tích hình ảnh được thực hiện trong CorelDRAW. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.3.3. Phát triển chỉ thị phân tử DNA liên kết với tính kháng tuyến trùng của cây hồ tiêu bằng phương pháp BSA (Bulked Segregant Analysis)

2.3.3.1. Nghiên cứu nhận diện chỉ thị phân tử liên kết với tính kháng tuyến trùng bằng phương pháp BSA

Kỹ thuật RAPD: Từ kết quả phần “Đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn hồ tiêu”, tìm thêm băng đặc trưng cho tính kháng tuyến trùng bằng cách sàng lọc thêm 100 môi RAPD. Mẫu DNA sử dụng khảo sát môi RAPD là HUIB_PH30, HUIB_PD36, HUIB_PH46, HUIB_PN34. Mỗi phản ứng PCR 15 µl gồm 25 mM MgCl₂ (Bioline - Meridian, Anh), 200 µM dNTP (Bioline - Meridian, Anh), 5X PCR buffer, 1U of *Taq* DNA polymerase (Bioline - Meridian, Anh), 10 pmol môi RAPD, 5 - 10 ng DNA tổng số và nước cất vô trùng. Chu trình nhiệt là: 94°C, 5 phút (1 chu kỳ); 94°C trong 1 phút, 37°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút (40 chu kỳ); 72°C trong 10 phút (1 chu kỳ). Sản phẩm PCR được nhuộm bằng SYBR Green I nồng độ 1/10000 (Invitrogen, USA) trong 20 phút, sau đó điện di trên 2% gel agarose và quan sát kết quả. Từ kết quả điện di lựa chọn ra các môi RAPD cho thấy sự xuất hiện băng đặc trưng của 2 dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PD36 so với 2 dòng/giống còn lại. Các môi này sau đó được sử dụng để phát triển kỹ thuật BSA.

Kỹ thuật BSA: Sử dụng phương pháp BSA (Bulked Segregant Analysis) (Michelmore và cs., 1991; Truong và cs., 2013) nhằm phát hiện nhanh chóng các đoạn DNA đặc hiệu cho các dòng/giống kháng tuyến trùng. Quy trình cụ thể là, 2 dòng/giống có khả năng kháng tuyến trùng (HUIB_PH30, HUIB_PD36) và 9 dòng/giống không kháng tuyến trùng (HUIB_PH46, HUIB_PN84, HUIB_PN114, HUIB_PN21, HUIB_PN27, HUIB_PN29, HUIB_PN34, HUIB_PN45,

HUIB_PN47) đã được chọn để tạo các pool. Sau đó, một lượng DNA bằng nhau của mỗi dòng/giống kháng tuyến trùng được trộn lại tạo thành Rp pool, một lượng DNA bằng nhau của mỗi dòng/giống không kháng được trộn lại tạo thành Sp pool. Các pool này và toàn bộ các dòng/giống (kháng và không kháng tuyến trùng) sẽ được khảo sát với các mồi RAPD đã được chọn (cho thấy có sự xuất hiện của băng đặc trưng của 2 dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PD36). Các đoạn DNA đặc trưng được phát hiện bằng điện di trên agarose gel 1%. Sau đó, đoạn DNA đặc trưng được tinh sạch bằng QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Germany). Ở thí nghiệm tiếp theo, đoạn DNA được nhân dòng vào plasmid pJET1.2 sau đó được phân lập và giải trình tự. Trình tự giải mã được phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.0.

2.3.3.2. Nghiên cứu chuyển đổi chỉ thị RAPD thành chỉ thị SCAR

Thiết kế mồi SCAR: Mồi SCAR được thiết kế dựa vào trình tự giải mã của các đoạn RAPD liên kết với tính kháng và nhiễm tuyến trùng, sử dụng chương trình Primer3 4.0 (Rozen & Skaletsky, 1999). Các oligonucleotide của các mồi được tổng hợp bởi công ty Phusagenomics. Các cặp mồi được đánh giá khả năng khuếch đại bằng cách thực hiện phản ứng PCR với hai mẫu DNA dòng/giống kháng và hai mẫu DNA dòng/giống nhiễm được chọn. Mỗi một phản ứng PCR được thực hiện dựa trên sự mô tả của Truong và cs., (2013) với một vài thay đổi. Cụ thể là, mỗi phản ứng có thể tích 15 μ l, gồm 5 - 10 ng DNA, 10 mM dNTP (Bioline - Meridian, Anh), Mytaq mix buffer 2X, 25 mM MgCl₂, 10 pmol mỗi loại mồi và bổ sung nước cất vừa đủ 15 μ l. Trong đó chu trình nhiệt là: 95°C trong 5 phút (1 chu kỳ); 95°C trong 1 phút, 55 - 60°C trong 60 giây, 72°C trong 1 phút (30 - 40 chu kỳ); 72°C trong 10 phút (1 chu kỳ). Sản phẩm PCR sau đó được nhuộm bằng SYBR Green I nồng độ 1/10,000 (Invitrogen, USA) trong 20 phút và điện di trên gel agarose 1%.

Đánh giá độ nhạy của chỉ thị SCAR: Độ nhạy của chỉ thị SCAR được xác định là nồng độ DNA thấp nhất có thể phát hiện ra bệnh thông qua kết quả PCR dương tính. Để thực hiện PCR, mỗi mẫu DNA của một dòng/giống tiêu được pha loãng về các nồng độ 1, 5, 10, 20 ng/ μ l. Mỗi phản ứng gồm: DNA khuôn mẫu, 10 mM dNTP (Bioline - Meridian, Anh), 25 mM MgCl₂, Mytaq mix buffer 2X, 10 pmol mỗi loại mồi và nước cất. PCR có chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút (1 chu kỳ); 95°C trong 1 phút, 50 - 60°C trong 30 - 90 giây, 72°C trong 1 phút (30 - 40 chu kỳ) (tùy vào từng cặp mồi SCAR); 72°C trong 10 phút (1 chu kỳ).

Đánh giá độ đặc hiệu của chỉ thị SCAR: Độ đặc hiệu là tỉ lệ dòng/giống cho kết quả dương tính trên tổng số dòng/giống thực hiện PCR với cặp mồi đặc hiệu.

Mỗi SCAR được sử dụng để khuếch đại toàn bộ 39 dòng/giống hồ tiêu nhằm kiểm tra tính đa hình và tính kháng tuyến trùng. Mỗi phản ứng thực hiện dựa trên các thông số đã được tối ưu. Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra trên 1% gel agarose.

2.3.4. Đánh giá đặc điểm ra hoa của một số dòng/giống hồ tiêu loài *P. nigrum* L. và khả năng lai tạo với loài *P. divaricatum* kháng tuyến trùng nhằm tạo dòng/giống hồ tiêu mới

2.3.4.1. Khảo sát đặc điểm ra hoa của một số dòng/giống hồ tiêu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu 1 yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), với 3 lần lặp lại, 3 cây/1 lần lặp, lần lặp theo dõi 10 giá/3 cây.

Chi tiêu theo dõi: Giai đoạn kéo dài giá (ngày): từ khi xuất hiện giá đến lúc hoa đầu tiên nở. Thời gian phân hóa hoa (ngày): từ khi xuất hiện hoa đầu tiên đến khi giá nở toàn bộ. Khoảng lệch giao giữa nhị và nhụy (ngày): từ khi hoa nở đến khi nhị xuất hiện.

2.3.4.2. Bước đầu lai tạo các dòng/giống hồ tiêu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố (CRD), 3 lần lặp, 3 cây/lần lặp, theo dõi 10 giá/3 cây, mỗi giá theo dõi 5 bông. Năm cặp lai được bố trí là: (1) ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27; (2) ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97; (3) ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN96; (4) ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN69; (5) ♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27. Áp dụng theo kỹ thuật lai hoa tiêu của Viện Nghiên cứu Cây gia vị và Cây dược liệu Indonesia, gồm các bước:

+ Bước 1: Chuẩn bị các vật liệu lai.

+ Bước 2: Thu hạt phấn của cây bố bằng cách đọt nhị chín, dùng ống thủy tinh nhỏ trùm lên giá tiêu và treo cố định. Để qua đêm, thu các ống thủy tinh vào sáng hôm sau, thêm một ít nước cất vào ống.

+ Bước 3: Thụ phấn: chọn giá để thụ phấn và bao cách ly trước khi hoa nở để tránh nhụy nhận phấn từ các giá xung quanh (Hình 2.1). Theo dõi cho đến khi hoa nở (chưa có xuất hiện nhị trên giá được chọn) thì tiến hành thụ phấn bằng cách sử dụng cây cọ mềm nhúng vào dung dịch hạt phấn và quét lên nhụy của cây mẹ. Làm như vậy 3 - 4 giờ liên tục. Tiến hành đeo thẻ ghi tên tổ hợp ngày lai lên cây mẹ.



Hình 2.1. Bao cách ly các



Hình 2.2. Đánh dấu hoa được



Hình 2.3. Bao cách ly sau

gié với nhau chọn trước khi thụ phấn khi thụ phấn

+ Bước 4: Khử đực: theo dõi sự xuất hiện của nhị, khi thấy nhị xuất hiện dùng dao mổ loại bỏ nhị ra khỏi hoa đã được thụ phấn, tránh làm hỏng hoa (Hình 2.2). Sau khi khử đực xong vẫn tiến hành lai bao cách ly triệt để cho đến khi nhụy không còn khả năng nhận hạt phấn (Hình 2.3).

Thời gian tiến hành lai được căn cứ vào sinh lý ra hoa của các dòng/giống tiêu Vĩnh Linh (HUIB_PN27), tiêu Sri Lanka (HUIB_PN97), tiêu Ấn Độ (HUIB_PN69), tiêu Phú Quốc (HUIB_PN101), tiêu Mã Lai (HUIB_PN96), tiêu rừng Nam Mỹ *Piper divaricatum* (HUIB_PD36). Cặp lai ♂HUIB_PD36 với ♀HUIB_PN27, ♀HUIB_PN69, ♀HUIB_PN96, ♀HUIB_PN97 và ♀HUIB_PN97 với HUIB_PN27 tiến hành thu hạt phấn từ 7 giờ sáng, thụ phấn trong khoảng thời gian từ 14 giờ đến 17 giờ cùng ngày. Đối với cặp lai HUIB_PN97 và HUIB_PN27, tiến hành thu hạt phấn từ chiều tối hôm trước và thụ phấn vào sáng hôm sau, từ 8 giờ đến 11 giờ.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ đậu quả (%): số quả đậu/tổng số hoa được thụ. Tỷ lệ gié rụng (%): số gié rụng/tổng số gié lai.

2.3.5. Chọn lọc gốc ghép kháng tuyến trùng và đánh giá khả năng ghép thành công trên gốc ghép kháng tuyến trùng đối với một số dòng/giống tiêu thương mại

2.3.5.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các gốc ghép hồ tiêu

Phương pháp thu tuyến trùng *Meloidogyne incognita*: Rễ cây hồ tiêu nhiều nốt sừng được thu từ các vườn tiêu bị bệnh vàng lá tại Gia Lai. Thu trứng và tuyến trùng *M. incognita* tuổi 2 (J2) dựa vào TCVN 12194 - 1: 2019 về quy trình giám định tuyến trùng *M. incognita* gây bệnh thực vật (Châu & Thanh, 2000). Sau đó, nhân nuôi tuyến trùng *M. incognita* J2 trên giá thể cà chua, sau 2 - 3 tháng sẽ thu trứng tuyến trùng *M. incognita* và ủ 2 ngày để trứng phát triển thành tuyến trùng *M. incognita* tuổi 2, tiến hành lây nhiễm vào cây giống.

Phương pháp lây nhiễm: Lây nhiễm 1 lần khi các vật liệu gốc ghép (HUIB_PN105; HUIB_PN45; HUIB_PN27; HUIB_PH30; HUIB_PD36) được 3 tháng tuổi. Mật độ *M. incognita* là 100 con tuổi 2 (J2) trên 100 g giá thể. Đổ 50mL dung dịch có chứa khoảng 1.500 con *M. incognita* vào mỗi bầu cây giống (với 1,5 kg giá thể). Lót đĩa nhựa dưới bầu cây giống để tránh tuyến trùng *M. incognita* ra ngoài. Thường xuyên đảm bảo duy trì độ ẩm cho bầu cây trong suốt thí nghiệm.

Dòng/giống HUIB_PN27 được lựa chọn làm đối chứng âm vì là dòng/giống hồ tiêu được trồng phổ biến và có khả năng kháng tuyến trùng yếu.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Số lượng tuyến trùng *M. incognita* tuổi 2 trong 5 g rễ: dùng phương pháp của Speijer và De Waele (1997) để tách lọc tuyến trùng *M. incognita* từ rễ (tính 1 lần khi kết thúc thí nghiệm).

- Số lượng tuyến trùng *M. incognita* tuổi 2 trong 100 g đất: Áp dụng phương pháp Baermann với một số cải tiến để tách lọc tuyến trùng *M. incognita* từ đất (Hooper, 2005). Theo dõi một lần khi kết thúc thí nghiệm. Kiểm tra dưới kính lúp soi nổi với độ phóng đại 10 - 40 lần để đếm số lượng, xác định mật độ tuyến trùng.

- Tỷ lệ rễ bị nốt sùng (%): Số rễ có nốt sùng/tổng số rễ chính x 100%. Đánh giá 3 cây/lần nhắc lại. Theo dõi một lần sau khi kết thúc thí nghiệm.

- Sinh trưởng chiều cao cây (cm) và số lá (lá): Đo chiều dài thân chính, đếm số lá. Đo 3 cây cho 1 lần lặp. Theo dõi tại thời điểm trước khi tiến hành lây nhiễm, sau lây nhiễm 30, 60, 90 và 120 ngày

- Tỷ lệ cây bị vàng lá (%): Số cây bị vàng lá/tổng số cây x 100%. Quan trắc 3 cây/lần lặp. Theo dõi tại thời điểm sau lây nhiễm 30, 60, 90 và 120 ngày

$$\text{Chỉ số bệnh (\%)} = \frac{\sum(N1 \times 1 + \dots + (Nn \times n))}{N \times K} \times 100$$

Trong đó : N1: số mẫu điều tra bị hại ở cấp 1; Nn: số mẫu điều tra bị hại ở cấp n; N: tổng mẫu điều tra; K: cấp hại cao nhất của thang phân cấp

Cấp hại được tính theo QCVN 01 - 172 : 2014/BNNPTNT. Cấp 1 (nhẹ) tỷ lệ vàng lá/rễ bị nốt sùng dưới 30%; cấp 2 (trung bình) tỷ lệ vàng/rễ bị nốt sùng lá từ 30 - 65%; cấp 3 (nặng) tỷ lệ vàng lá/rễ bị nốt sùng từ trên 65%.

Mức kháng: chia thành 5 mức, được xác định dựa theo chỉ số bệnh. Mức 5/5 chỉ số bệnh < 20%; Mức 4/5 chỉ số bệnh từ 20% - 40%; Mức 3/5 chỉ số bệnh từ 40% - 60%; Mức 2/5 chỉ số bệnh từ 60% - 80%; Mức 1/5 chỉ số bệnh > 80% (Truong và cs, 2008)

2.3.5.2. Đánh giá khả năng ghép thành công và khả năng tiếp hợp của các tổ hợp ghép

Phương pháp ghép: Thí nghiệm 2 yếu tố: Yếu tố A: 3 loại gốc ghép (HUIB_PD36 (A1), HUIB_PH30 (A2), HUIB_PH46 (A3)); Yếu tố B: 4 loại ngọn ghép (Vĩnh Linh - VL (B1), Lộc Ninh - LN (B2), Sri Lanka - SR (B3), Ấn Độ - AD (B4)). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD), 3 lần lặp, ô cơ sở 10 cây, số lượng mẫu là 360 cây (Lan và cs., 2005). Lựa chọn là các gốc ghép có khả năng kháng được tuyến trùng, ngọn ghép được sử dụng là các ngọn ghép của các dòng/giống hồ tiêu được trồng phổ biến với năng suất chất lượng tốt.

Kỹ thuật ghép (ghép nêm nổi ngọn) được thực hiện như sau: Dùng dao ghép cắt ngang thân cây gốc ghép ở vị trí thân bánh tẻ, chẻ dọc thân khoảng 2,0 cm. Ngọn ghép có 1 - 2 đốt mang mầm ngủ ở nách lá. Cắt vát phần đuôi của ngọn ghép theo hình chữ V, có độ dài khoảng 2,0 cm tương ứng với vết chẻ trên thân cây gốc ghép (Hình 2.4 A). Đưa ngọn ghép vào gốc ghép sao cho phần tượng tầng của ngọn ghép và gốc ghép tiếp xúc tốt với nhau (Hình 2.4 B). Dùng dây nilon cuốn chặt vị trí ghép, chụp bì nilong để hạn chế chồi ghép mất nước, khô héo (Hình 2.4 C).



Hình 2.4. Các bước trong kỹ thuật ghép nêm nổi ngọn

A: Cắt vát phần đuôi của ngọn ghép theo hình chữ V, độ dài khoảng 2,0 cm tương ứng với vết chẻ trên thân cây gốc ghép, B: Đưa ngọn ghép vào gốc ghép sao cho phần tượng tầng của ngọn ghép và gốc ghép tiếp xúc tốt với nhau, C: Dùng dây nilon cuốn chặt vị trí ghép.

Chỉ tiêu đánh giá khả năng ghép thành công: Tỷ lệ tổ hợp ghép sống (%): số cây ghép sống/tổng số cây thí nghiệm x100%. Theo dõi tại thời điểm sau ghép 30, 60, 90 và 120 ngày.

Sinh trưởng chiều cao và số lá của ngọn ghép (cm, lá): Đo chiều dài ngọn (tính từ vết ghép đến ngọn) tại thời điểm sau ghép 30, 60, 90 và 120 ngày.

Đánh giá khả năng tiếp hợp: dựa vào mức độ tương đồng trong cấu trúc giải phẫu giữa gốc ghép và ngọn ghép hồ tiêu; mức độ tiếp hợp ở vị trí vết ghép khi cây ghép được 4 tháng. So sánh đặc điểm cấu tạo của thân gốc ghép và ngọn ghép, từ đó so sánh các đặc điểm tương đồng của các cây thí nghiệm. Các cấu trúc vi phẫu được nhuộm bằng phương pháp nhuộm 2 màu kết hợp giữa Carmin - phen chua và xanh methylen. Quan sát vi phẫu trên một giọt glycerin.

Phương pháp đánh giá khả năng tiếp hợp qua quan sát vi phẫu: Đánh giá khả năng tiếp hợp thông qua mức độ tương đồng giải phẫu gốc ghép, ngọn ghép và mức độ tiếp hợp tại vị trí vết ghép khi cây ghép được 2 tháng. So sánh đặc điểm cấu tạo của gốc ghép và ngọn ghép: Từ cấu tạo thân của cây gốc ghép và ngọn ghép, so sánh các đặc điểm tương đồng của các cây thí nghiệm.

2.3.5.3. *Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các tổ hợp ghép hồ tiêu*

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Ngọc, N. Q và cộng sự (2021), thiết kế theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD) gồm 8 tổ hợp ghép với 3 lần lặp lại và 10 cây cho mỗi lần lặp.

Lây nhiễm tuyến trùng nhân tạo: Tổ hợp ghép sau khi ghép thành công, cây ghép được 2 tháng, cao từ 10 - 15 cm có 2 - 3 lá thì tiến lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita*. Phương pháp lây nhiễm và chỉ tiêu theo dõi tương tự mục 2.3.5.1.

2.3.6. *Đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của cây ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng trong điều kiện nhà màng*

Các cây ghép 4 tháng tuổi từ 8 tổ hợp ghép sẽ được trồng ở nhà màng để quan sát sự sinh trưởng và phát triển trong 30, 60, 90 và 120 ngày. Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD) gồm 8 tổ hợp ghép có khả năng kháng tuyến trùng và tiếp hợp tốt với 3 lần lặp lại và 10 cây cho mỗi lần lặp.

Điều kiện trồng và chăm sóc: Chăm sóc cây hồ tiêu theo đúng quy trình chăm sóc cây trong vườn ươm của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

Các chỉ tiêu theo dõi: Đánh giá khả năng sinh trưởng của các dòng/giống cây ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng: Động thái tăng trưởng chiều cao cây (cm); Động thái tăng trưởng số lá (lá) và màu sắc lá; Động thái tăng trưởng số đốt (đốt) và màu sắc đốt và Động thái tăng trưởng số cành (cành)

2.4. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Phân tích đặc điểm hình thái của tập đoàn hồ tiêu

Dữ liệu được phân tích bằng kiểm định Duncan test với mức ý nghĩa $P < 0,05$ trong phần mềm SPSS của IBM (Phiên bản 27). Phân tích cụm và thành phần chính được thực hiện bằng phần mềm R (R Development Core., 2008). Các mối quan hệ không gian giữa 39 dòng/giống hồ tiêu được hiển thị bằng sơ đồ điểm số của các thành phần chính thứ nhất và thứ hai trong không gian hai chiều. Đối với phân tích cụm, tất cả các đặc điểm của mỗi lần gia nhập đã được chuẩn hóa và khoảng cách Euclidian được tính bằng phương pháp liên kết trung bình nhóm không trọng số (UPGMA).

Phân tích kết quả định danh tập đoàn hồ tiêu:

Kết quả giải trình tự vùng ITSu1-4 được tập hợp và chỉnh sửa bằng BioEdit v7.2.5. Các trình tự sau đó được ClustalW căn chỉnh trong MEGA X và các vùng trình tự chồng chéo ở đầu 5 và 3 được cắt bớt. Bảy thông số bao gồm số lượng vị trí đa hình riêng biệt (S), tổng số vị trí đột biến (Eta), số haplotype (h), độ đa dạng haplotype (Hd), số lượng nucleotide khác biệt trung bình (k), sự đa dạng nucleotide

(Pi), số sự kiện tái tổ hợp tối thiểu (Rm) được coi là một phép đo đa hình trong quần thể. Tính trung lập được kiểm tra dựa trên năm phương pháp là Tajima's D test (Fu, 1997), Fs, Fu's statistic (Fu and Li, 1993), D* and F*, Fu and Li's statistics (Fu và Li, 1993); S, Strobeck's statistic (Strobeck, 1987) từ phần mềm DNAsp 6.0.

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng cách phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) được thực hiện trong MEGA X. Các trình tự barcode được truy vấn dựa trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) bằng thuật toán Nucleotide BLAST. Sau đó, xây dựng mạng lưới Haplotype (Haplotype Network) trên cơ sở phần mềm Network 10.2.

Phân tích kết quả đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn hồ tiêu

Dựa trên kết quả điện di để xây dựng ma trận nhị phân, các băng xuất hiện rõ ràng và không bị biến dạng sẽ được gán là "1", không có (hoặc quá mờ) sẽ được gán là "0". Kích thước của băng sản phẩm PCR được ước tính, dựa trên marker chuẩn. Ma trận này sẽ được dùng cho phần mềm POPGEN 1.32 để xác định các chỉ số đa dạng: đa dạng gen của Nei (h), chỉ số thông tin Shannon (Ho), số lượng alen quan sát được (na), số lượng alen hiệu quả (ne) (Nei., 1987). Bên cạnh đó, dữ liệu ma trận cũng được đưa vào NTSYSpc 2.1 để xây dựng cây phát sinh loài.

Phân tích đặc điểm ra hoa của một số dòng/giống hồ tiêu loài P. nigrum L. và khả năng lai tạo với loài P. divaricatum kháng tuyến trùng nhằm tạo dòng/giống hồ tiêu mới

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê mô tả, so sánh phương sai ANOVA bằng phần mềm xử lý thống kê SAS9.1. Các số liệu % được chuyển đổi bằng công thức $\arcsin\sqrt{\%}$

Phân tích kết quả kháng tuyến trùng, khả năng ghép thành công, kết quả lai tạo, kết quả ghép, đánh giá khả năng tiếp hợp, khả năng sinh trưởng, phát triển của tổ hợp ghép hồ tiêu:

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Ms Excel và SAS 9.1.

Các số liệu là số được chuyển đổi $y_i = \log(x_i + 1)$, số liệu % chuyển sang góc $y_i = \arcsin\sqrt{\%}$ đối với những dãy số từ 1-100 và $y_i = \sqrt{\%}$ với dãy số từ 70 - 100.

Trong cùng 1 cột, các giá trị có ký tự khác biệt là có ý nghĩa thống kê.

ns: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

* Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA TẬP ĐOÀN HỒ TIÊU ĐƯỢC THU THẬP Ở VIỆT NAM

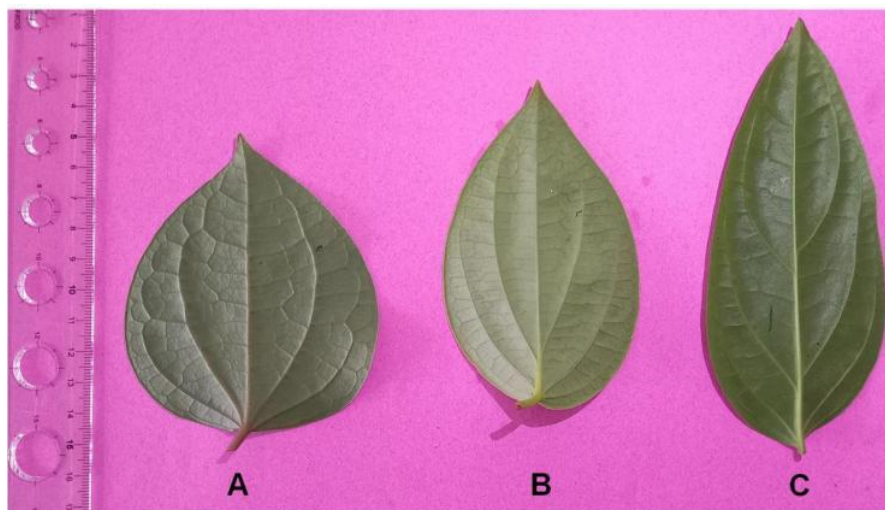
3.1.1. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng đặc điểm hình thái

Đã nghiên cứu 16 đặc điểm hình thái ở tất cả các loại cây hồ tiêu (Bảng 3.1). Kiểu sinh trưởng là một trong những tính trạng quan trọng nhất trong chọn lọc dòng/giống hồ tiêu thương mại sản xuất và chủ yếu được xác định bởi di truyền. Kiểu sinh trưởng phổ biến nhất là cây leo (37 dòng/giống) trong khi dòng/giống HUIB_PR48 thân bò và HUIB_PD36 là dạng thân đứng. Tất cả các dòng/giống hồ tiêu có kiểu phân cành đa dạng ngoại trừ HUIB_PD36.

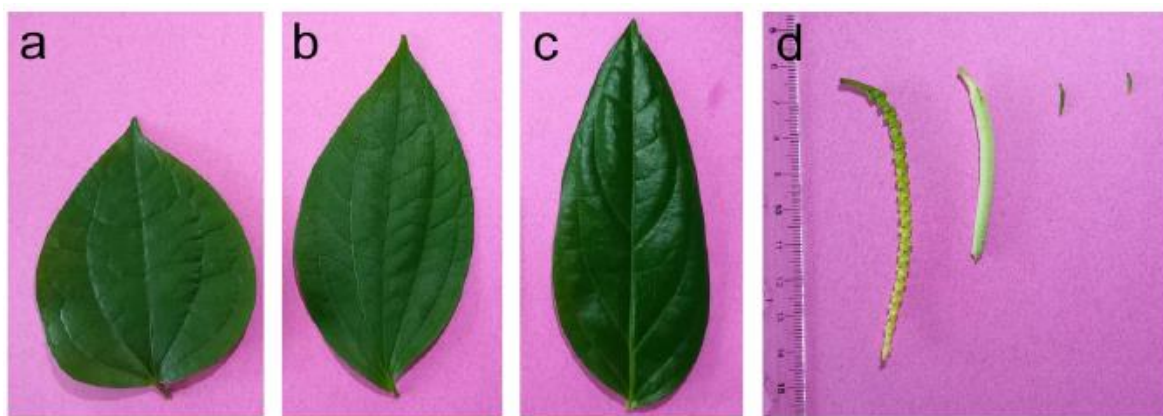
Hầu hết các dòng/giống đều có nhiều chồi sinh ra từ thân, ngoại trừ HUIB_PN10, HUIB_PN34, HUIB_PN96, HUIB_PN97, HUIB_PN101, HUIB_PN102, HUIB_PN113, và HUIB_PN116. Ba dòng/giống (HUIB_PD36, HUIB_PR48 và HUIB_PN101) có khả năng bám trụ yếu, trong khi khả năng bám trụ trung bình đã được quan sát thấy ở 3 dòng/giống HUIB_PN56, HUIB_PR41 và HUIB_PN47. Các dòng/giống còn lại thể hiện khả năng bám mạnh. Khả năng tạo rễ bất định là ít ở dòng/giống HUIB_PN101, vừa phải ở HUIB_PD36, HUIB_PR41 và HUIB_PR48, các dòng/giống còn lại tạo ra rất nhiều rễ bất định. Tất cả các dòng/giống đều không có lông tơ trên thân. Hướng mọc của cành bên dốc xuống ở các dòng/giống HUIB_PN91, HUIB_PH30 và HUIB_PH46, nằm ngang ở HUIB_PN21, HUIB_PN29, HUIB_PN38, HUIB_PR41, HUIB_PN43, HUIB_PN45, HUIB_PN47, HUIB_PN48, HUIB_PN50, HUIB_PN55, HUIB_PN56, HUIB_PN89, các dòng/giống còn lại cành bên mọc thẳng.

Đa số các dòng/giống có gân lá kiểu campylodromous, ngoại trừ HUIB_PH30 và HUIB_PH46 (gân chân vịt) và HUIB_PD36 gân hình xương cá (Hình 3.1). Hướng mọc của bông của hầu hết các dòng/giống đều nằm nghiêng, ngoại trừ

HUIB_PH30, HUIB_PH46, HUIB_PD36 và HUIB_PR41 (kiểu thẳng đứng, Hình 3.2 d). Dữ liệu không được thu thập ở HUIB_PR48. Hầu hết các dòng/giống đều có bông ở dạng sợi, ngoại trừ HUIB_PR41 (hình nón), HUIB_PH30 và HUIB_PH46 (hình trụ). Hầu hết các dòng/giống đều hoa lưỡng tính. Trong khi, HUIB_PH30, HUIB_PH46 và HUIB_PR41 chỉ tạo ra hoa cái. Hình dạng quả của tất cả các dòng/giống đa số dạng tròn.



Hình 3.1. Kiểu gân lá của một số dòng/giống hồ tiêu: A: HUIB_PH30 (*Acrodromous*), HUIB_PN27 (*Campylodromous*), HUIB_PD36 (*Eucamptodromous*)



Hình 3.2. Các hình dạng và kích thước của lá và bông (a-c) Lá của các dòng/giống (a) HUIB_PH30 (hình tim), (b) HUIB_PH46 và (c) HUIB_PD36 (mũi mác đến elip) (d) Từ trái sang phải, lần lượt là các dòng/giống HUIB_PN27, HUIB_PD36, HUIB_PH30 và HUIB_PH46

Hình dạng phiến lá đa dạng từ hình ovan, ovan-elip, ovan-mũi mác, elip - mũi mác, hình tim (Hình 3.2. a - c). Hình dạng gốc lá cũng đa dạng với 4 kiểu hình là tròn, hình tim, nhọn và nhọn có góc. Mép lá có 2 kiểu là mép có sóng được quan sát ở HUIB_PN20, HUIB_PN35, HUIB_PD36, HUIB_PR41, HUIB_PH46, HUIB_PR48, HUIB_PN52, HUIB_PN69, HUIB_PN70 và HUIB_PN102. Các dòng/giống còn lại có mép lá bằng.

Dựa trên khoảng cách Euclidian, được tính bằng giá trị trung bình của nhóm không trọng số (UPGMA), 39 dòng/giống tiêu đen được nhóm thành ba nhóm (Hình 3.3). Trong đó, nhóm I chỉ gồm dòng/giống HUIB_PR48, với các đặc điểm khác biệt như phiến lá hình tim, mép lá hình sóng, có kiểu sinh trưởng bò trên mặt đất, khả năng bám trụ yếu, kém tạo rễ bất định hơn các dòng/giống khác, khả năng ra hoa và đậu quả kém nên khó có thể quan sát. Nhóm II gồm bốn dòng/giống là HUIB_PH30, HUIB_PD36, HUIB_PR41 và HUIB_PH46 và 34 dòng/giống còn lại được xếp vào nhóm III. Các đặc điểm đặc trưng của nhóm II bao gồm: mép lá hình sóng hặc hình tim, gốc lá nhọn hoặc tròn, hoa mọc thẳng dạng trụ hoặc dạng hình nón và thường chỉ có hoa đực. Trong khi đó, nhóm III là các dòng/giống hồ tiêu có thân leo, phân cành đa dạng, đỉnh chồi có màu sắc đa dạng, chồi ở thân nhiều, khả năng bám trụ khỏe, hình dạng gốc lá và phiến lá đa dạng, gân lá kiểu campylodromous, hoa dạng chỉ và mọc theo hướng nghiêng, quả tròn.

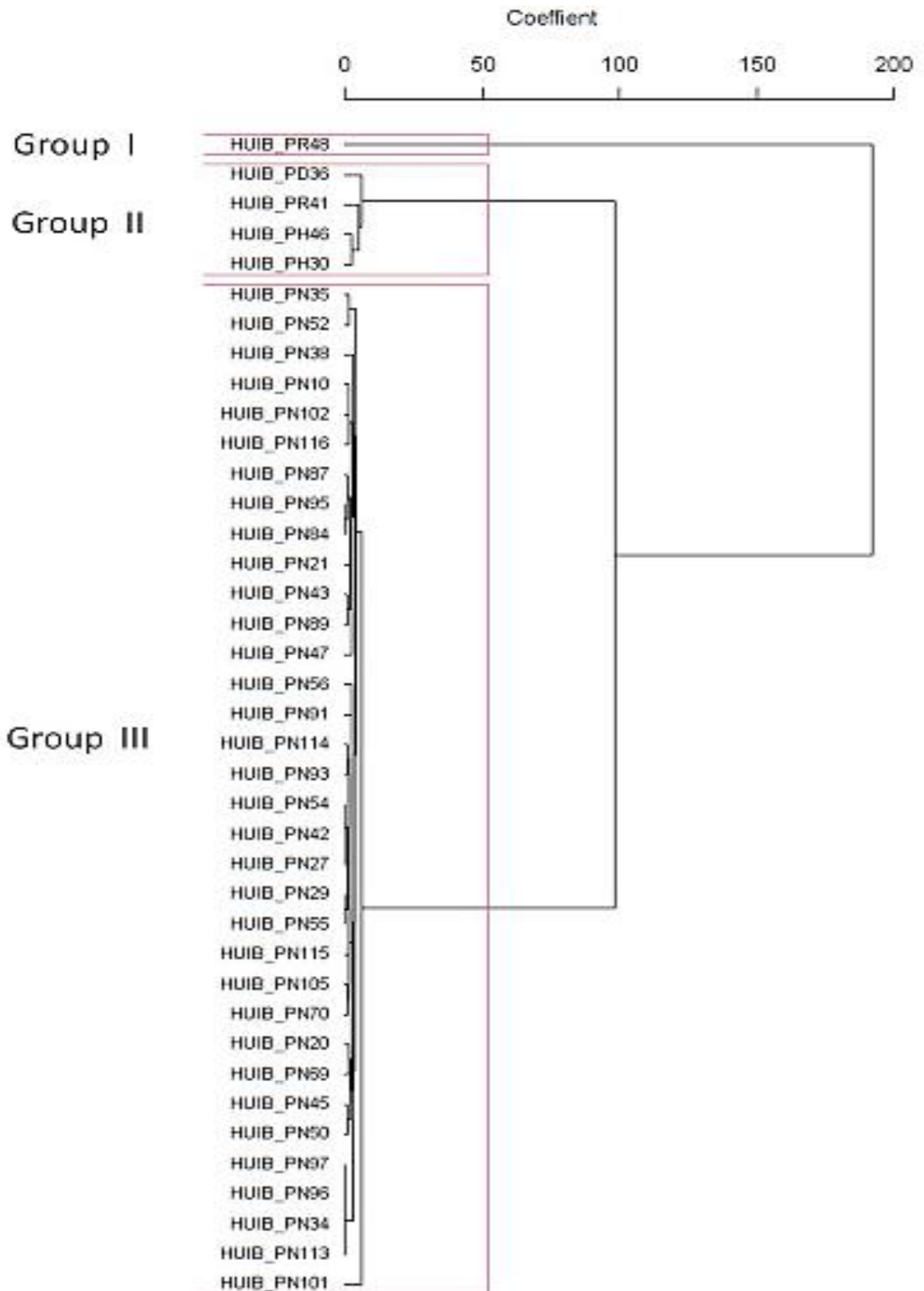
Bảng 3.1. Các chỉ tiêu theo dõi của các cây hồ tiêu đã thu thập

Kỹ hiệu vật liệu	Các đặc điểm hình thái															
	PGH	BT	YOSTC	RSP	HC	ARP	POS	LBH	LLS	LBS	LM	TOV	SO	SS	TH	FS
HUIB_PN10	1	2	3	5	7	7	1	1	2	1	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN20	1	2	2	7	7	7	1	1	3	2	2	2	2	1	3	1
HUIB_PN21	1	2	3	7	7	7	1	2	1	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN27	1	2	3	7	7	7	1	1	4	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN29	1	2	3	7	7	7	1	2	4	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PH30	1	2	4	7	7	7	1	3	5	3	1	1	1	2	2	99
HUIB_PN34	1	2	1	5	7	7	1	1	5	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN35	1	2	99	7	7	7	1	1	4	3	2	2	2	1	3	1
HUIB_PD36	3	99	99	7	3	5	1	1	4	3	2	3	1	2	3	99
HUIB_PN38	1	2	99	7	7	7	1	2	1	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PR41	1	2	2	7	5	5	1	2	4	1	2	2	1	4	2	99
HUIB_PN42	1	2	3	7	7	7	1	1	4	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN43	1	2	2	7	7	7	1	2	1	1	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN45	1	2	1	7	7	7	1	2	2	3	1	2	2	1	3	1
HUIB_PH46	1	2	2	7	7	7	1	3	4	3	2	1	1	2	2	99
HUIB_PN47	1	2	2	7	5	7	1	2	1	1	1	2	2	1	3	1
HUIB_PR48	2	2	2	7	3	5	1	2	5	2	2	2	–	99	99	99
HUIB_PN50	1	2	1	7	7	7	1	2	3	3	1	2	2	1	3	1

Ký hiệu vật liệu	Các đặc điểm hình thái															
	PGH	BT	YOSTC	RSP	HC	ARP	POS	LBH	LLS	LBS	LM	TOV	SO	SS	TH	FS
HUIB_PN52	1	2	99	7	7	7	1	1	4	3	2	2	2	1	3	1
HUIB_PN54	1	2	3	7	7	7	1	1	4	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN55	1	2	3	7	7	7	1	2	4	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN56	1	2	3	7	5	7	1	2	4	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN69	1	2	2	7	7	7	1	1	2	3	2	2	2	1	3	1
HUIB_PN70	1	2	2	7	7	7	1	1	5	2	2	2	2	1	3	1
HUIB_PN84	1	2	3	7	7	7	1	1	2	1	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN87	1	2	2	7	7	7	1	1	2	1	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN89	1	2	1	7	7	7	1	2	1	1	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN91	1	2	3	7	7	7	1	3	3	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN93	1	2	2	7	7	7	1	1	4	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN95	1	2	3	7	7	7	1	1	2	1	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN96	1	2	1	5	7	7	1	1	5	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN97	1	2	1	5	7	7	1	1	5	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN101	1	2	3	5	3	3	1	1	4	1	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN102	1	2	2	5	7	7	1	1	2	1	2	2	2	1	3	1
HUIB_PN105	1	2	2	7	7	7	1	1	5	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN113	1	2	1	5	7	7	1	1	5	2	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN114	1	2	2	7	7	7	1	1	4	1	1	2	2	1	3	1

Kỹ hiệu vật liệu	Các đặc điểm hình thái															
	PGH	BT	YOSTC	RSP	HC	ARP	POS	LBH	LLS	LBS	LM	TOV	SO	SS	TH	FS
HUIB_PN115	1	2	2	7	7	7	1	1	4	3	1	2	2	1	3	1
HUIB_PN116	1	2	2	5	7	7	1	1	1	1	1	2	2	1	3	1

Chú thích: PGH, kiểu sinh trưởng của cây: 1, thân leo (trên trụ); 2, thân bò (trên mặt đất); 3, thân đứng.
 BT, dạng phân cành: 1, phân đôi; 2, đa dạng; 99, khác.
 YOSTC, màu đỉnh chồi cây con: 1, Vàng hơi xanh; 2, tím nhạt; 3, tím đậm; 4, đỏ nhạt; 99, khác.
 RSP, sự sinh chồi từ thân: 3, ít; 5, trung bình; 7, nhiều.
 HC, khả năng bám trụ: 3, yếu; 5, trung bình; 7, khỏe.
 ARP, sự sản sinh rễ bất định: 3, yếu; 5, trung bình; 7, khỏe.
 POS, lông tơ trên thân: 1, không có; 2, có.
 LBH, tập tính ra cành bên: 1, đứng; 2, ngang; 3, dốc xuống.
 LLS, hình dạng phiến lá: 1, ovate; 2, ovate-ellip; 3, ovate-mũi mác; 4, ellip-mũi mác; 5, hình tim.
 LBS, hình dạng gốc lá: 1, tròn; 2, hình tim; 3, nhọn; 4, nhọn coa góc.
 LM, mép lá: 1, bằng; 2, có sóng.
 TOV, kiểu gân lá: 1, chân vịt; 2, campylodromous; 3, xương cá.
 SO, hướng mọc của bông: 1, thẳng; 2, nghiêng; -, không có dữ liệu.
 SS, hình dạng bông: 1, dạng chỉ; 2, hình trụ; 3, hình cầu; 4, hình nón; 99, khác.
 TH, loại hoa: 1, chỉ có hoa cái; 2, chỉ có hoa đực; 3, hoa lưỡng tính; 99, khác.
 FS, dạng quả: 1, tròn; 2, ovate; 3, thuôn dài; 99, khác.



Hình 3.3. Cây phát sinh loài hiển thị mối quan hệ di truyền của 39 dòng/giống dựa trên phân tích dữ liệu hình thái bằng phương pháp UPGMA và hệ số khoảng cách Euclidian

3.1.2. Định danh các dòng/giống hồ tiêu đã thu thập dựa vào trình tự ITS

Tỉ lệ khuếch đại vùng gen ITSu1-4 của quần thể hồ tiêu với các cặp mồi đặc hiệu là rất cao (100%). Sự khác biệt di truyền dựa vào vùng gen ITSu1-4 của quần thể hồ tiêu nằm trong khoảng từ 0,000 đến 0,155 (trung bình = 0,033) (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Các đặc điểm di truyền dựa trên vùng gen ITSu1-4 của tập đoàn hồ tiêu

Vùng gen	Tỉ lệ PCR thành công (%)	Tỉ lệ giải trình tự thành công (%)	Tổng chiều dài tương đồng (bp)	Số lượng các vị trí đơn hình	Tỷ lệ biến dị (%)	Sự khác biệt trong quần thể (trung bình)
<i>ITSu1-4</i>	100	100	667 - 685	517 - 535	21,898	0,000 – 0,155 (0,033)

Bảng 3.3. Thành phần nucleotide trong vùng gen ITSu1-4 của quần thể hồ tiêu

Ký hiệu	Tỷ lệ nucleotide (%)					Tổng (bp)
	T(U)	C	A	G	G+C	
HUIB_PN10	19,374	29,210	19,970	31,446	60,656	671
HUIB_PN20	20,119	28,614	19,821	31,446	60,060	671
HUIB_PN21	19,970	28,763	19,672	31,595	60,358	671
HUIB_PN27	19,970	28,912	19,672	31,446	60,358	671
HUIB_PN29	19,940	28,720	19,940	31,399	60,119	672
HUIB_PH30	18,394	31,825	18,832	30,949	62,774	685
HUIB_PN34	19,970	28,763	19,821	31,446	60,209	671
HUIB_PN35	19,970	28,763	19,672	31,595	60,358	671
HUIB_PD36	20,597	28,209	24,627	26,567	54,776	670
HUIB_PN38	19,940	28,720	19,940	31,399	60,119	672
HUIB_PR41	19,640	29,085	21,739	29,535	58,621	667
HUIB_PN42	19,970	28,912	19,821	31,297	60,209	671
HUIB_PN43	19,970	28,912	19,672	31,446	60,358	671
HUIB_PN45	19,970	28,912	19,672	31,446	60,358	671
HUIB_PH46	18,394	31,825	18,832	30,949	62,774	685
HUIB_PN47	19,821	29,061	19,672	31,446	60,507	671
HUIB_PR48	19,640	29,085	21,739	29,535	58,621	667
HUIB_PN50	19,970	29,210	19,225	31,595	60,805	671
HUIB_PN52	19,970	28,763	19,821	31,446	60,209	671
HUIB_PN54	19,821	29,210	19,821	31,148	60,358	671

Ký hiệu	Tỷ lệ nucleotide (%)					Tổng (bp)
	T(U)	C	A	G	G+C	
HUIB_PN55	19,970	28,763	19,821	31,446	60,209	671
HUIB_PN56	19,970	28,763	19,672	31,595	60,358	671
HUIB_PN69	19,970	28,763	19,821	31,446	60,209	671
HUIB_PN70	19,672	29,210	21,311	29,806	59,016	671
HUIB_PN84	19,672	29,508	20,268	30,551	60,060	671
HUIB_PN87	19,970	28,763	19,821	31,446	60,209	671
HUIB_PN89	19,523	28,912	19,970	31,595	60,507	671
HUIB_PN91	19,851	28,955	19,851	31,343	60,299	670
HUIB_PN93	19,672	28,614	20,417	31,297	59,911	671
HUIB_PN95	19,523	29,061	20,119	31,297	60,358	671
HUIB_PN96	19,970	28,763	19,821	31,446	60,209	671
HUIB_PN97	19,970	28,763	19,821	31,446	60,209	671
HUIB_PN101	19,970	28,763	19,970	31,297	60,060	671
HUIB_PN102	20,119	28,614	19,821	31,446	60,060	671
HUIB_PN105	19,821	29,061	19,672	31,446	60,507	671
HUIB_PN113	19,970	28,763	19,821	31,446	60,209	671
HUIB_PN114	19,821	29,061	19,672	31,446	60,507	671
HUIB_PN115	19,523	29,061	19,821	31,595	60,656	671
HUIB_PN116	19,672	29,061	19,821	31,446	60,507	671
Avg.	19,795	29,047	20,031	31,128	60,174	671.513

Các sản phẩm PCR của vùng gen ITSu1-4 được giải trình tự trên ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Hệ thống sinh học ứng dụng) bằng phương pháp đầu cuối dideoxy. Kết quả của vùng gen ITSu1-4 là 667 bp ở HUIB_PR41 và HUIB_PR48; 670 bp ở HUIB_PN36 và HUIB_PN91; 672 bp HUIB_PN29 và HUIB_PN38; 685 bp HUIB_PN46 và HUIB_PN30; 671 bp đối với các dòng/giống còn lại. Kết quả BLAST trên NCBI được sử dụng để xác minh và so sánh với trình tự của chi *Piper* cho thấy trình tự nucleotide thu được tương đồng 96 đến 100% với loài của *Piper nigrum* (MH493477 - MH493487, KF924121, KF924111), *Piper retrofractum* (MH493562), *Piper hancei* (EF450274) và *Piper divaricatum* (DQ868714). Tỷ lệ xuất hiện từng loại nucleotide trên vùng ITSu1-4 cho thấy

Guanidin (G) chiếm tỷ lệ cao nhất, dao động từ 26,567 đến 31,595% (trung bình = 31,188%), tiếp đến là Cysteine (C) chiếm 28,209 đến 28,955% (trung bình = 29,047%) và thấp nhất là Thymine (Uracin) chiếm 18,394 đến 20,19% (trung bình = 19,795%). Tỷ lệ phần trăm (G + C) chứa trong vùng gen ITSu1-4 là cao nhất 60,805% (HUIB_PN50) và có sự khác biệt giữa các dòng/giống *Pipper* khác nhau, sự khác biệt dao động từ 54,776% đến 60,805% và đạt mức trung bình là 60,174% (Bảng 3.3). Tất cả các chuỗi mới đã được gửi vào GenBank theo các số gia nhập sau: MZ636718 đến MZ636756.

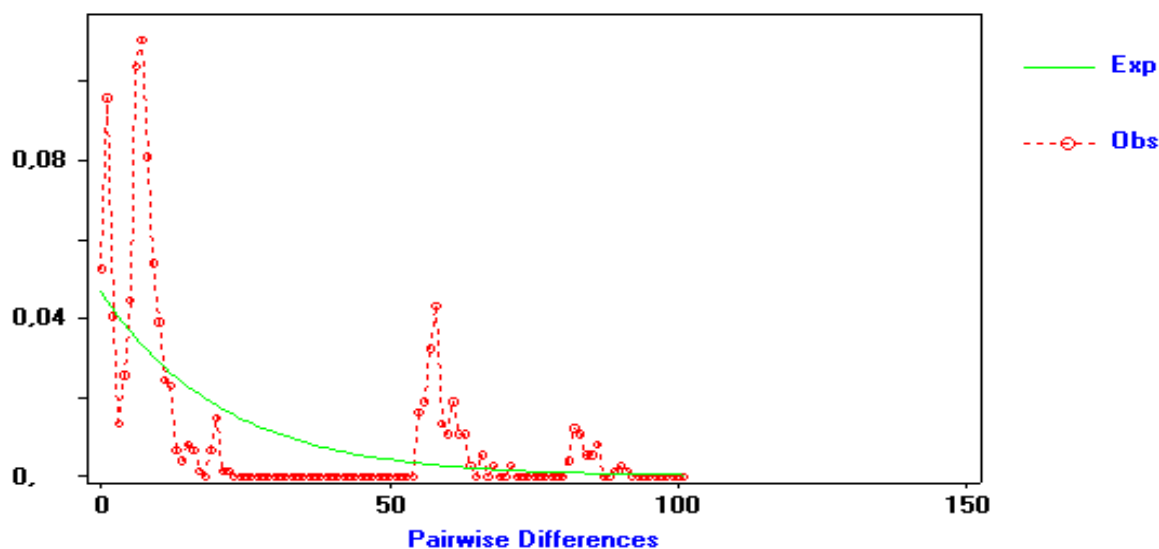
Bảng 3.4. Kết quả đa hình DNA dựa trên vùng gen ITSu1-4 của quần thể hồ tiêu

Vùng gen	n	S	Eta	h	Hd	k	Pi ($\times 10^{-3}$)	Rm
<i>ITSu1-4</i>	39	150	169	23	0,947	20,352	30,930	18

Lưu ý: n: Số lượng dòng/giống; S: số vị trí khác biệt; Eta: Tổng số đột biến; h: Số kiểu Haplotypes; Hd: Đa dạng gen (Haplotype); Pi: Sự đa dạng nucleotide (trên mỗi vị trí); k: Chênh lệch số nucleotit trung bình; Rm: Số sự kiện tái tổ hợp tối thiểu

Kết quả trình bày ở bảng 3.4 cho thấy trình tự nucleotide của vùng gen ITSu1-4 có chứa 150 vị trí nucleotide khác nhau giữa 39 dòng/giống hồ tiêu được nghiên cứu. Trong số này, có 53 vị trí khác biệt đơn (với 52 vị trí chứa hai nucleotide: 17, 21, 31, 36, 37, 41, 50, 63, 75, 130, 141, 146, 147, 148, 164, 165, 167, 173, 195, 224, 301, 318, 343, 367, 392, 395, 410, 420, 431, 432, 439, 451, 462, 463, 468, 469, 484, 487, 506, 507, 509, 538, 588, 597, 598, 601, 616, 622, 663, 670, 672, 677 và 1 vị trí chứa ba nucleotide: 262) và 97 vị trí Parsimony (với 79 Parsimony chứa 2 nucleotide: 10, 22, 47, 59, 64, 65, 74, 85, 86, 89, 91, 94, 97, 106, 111, 115, 121, 128, 129, 150, 168, 179, 180, 181, 186, 189, 192, 194, 201, 202, 211, 213, 229, 231, 241, 265, 351, 379, 386, 390, 402, 405, 411, 413, 424, 428, 436, 438, 440, 441, 444, 447, 448, 455, 461, 480, 497, 518, 523, 536, 539, 557, 569, 570, 574, 575, 587, 590, 593, 604, 606, 627, 630, 642, 650, 651, 655, 685, 690 và 18 Parsimony chứa 3 nucleotide: 108, 187, 188, 220, 352, 396, 414, 422, 430, 434, 452, 491, 510, 525, 558, 584, 632, 671). Vùng gen ITSu1-4 không có protein chỉ định vùng mã hóa, có chứa 169 (*Eta*) tổng số đột biến, với số nucleotide chênh lệch trung bình ($k =$

20,352), hệ số đa dạng về nucleotide chiếm $30,930 \times 10^{-3}$ (Pi), tạo ra 23 Haplotypes trong 39 dòng/giống với hệ số đa dạng haplotype chiếm 0,947 (Hd). Các dòng/giống trong quần thể tiêu có sự khác biệt lớn, có tới 18 sự kiện tái tổ hợp tối thiểu được dự đoán xảy ra trong quần thể này khi phân tích trên phần mềm DNAsp 6.0. Tất cả các chỉ tiêu đều được xử lý với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ (Bảng 3.4).



Hình 3.4. Các dấu hiệu mở rộng quần thể trong vùng ITSu1-4 hạt nhân

Sự phân bố không đồng đều của các nucleotide khác biệt trong trình tự ITSu1-4 của tất cả các dòng/giống trong quần thể đã biểu hiện khả năng sự mở rộng quần thể lớn (Raz & Ecker, 1997; Moniz & Kaczmariska, 2010). Phổ tần số của dữ liệu nghiên cứu cho thấy sự dư thừa của các đột biến singleton khi so sánh với các tần số dự kiến trong điều kiện trung lập và kích thước quần thể ổn định (Hình 3.4).

Bảng 3.5. Kết quả kiểm tra tính trung tính dựa trên vùng gen ITSu1-4 của quần thể hồ tiêu

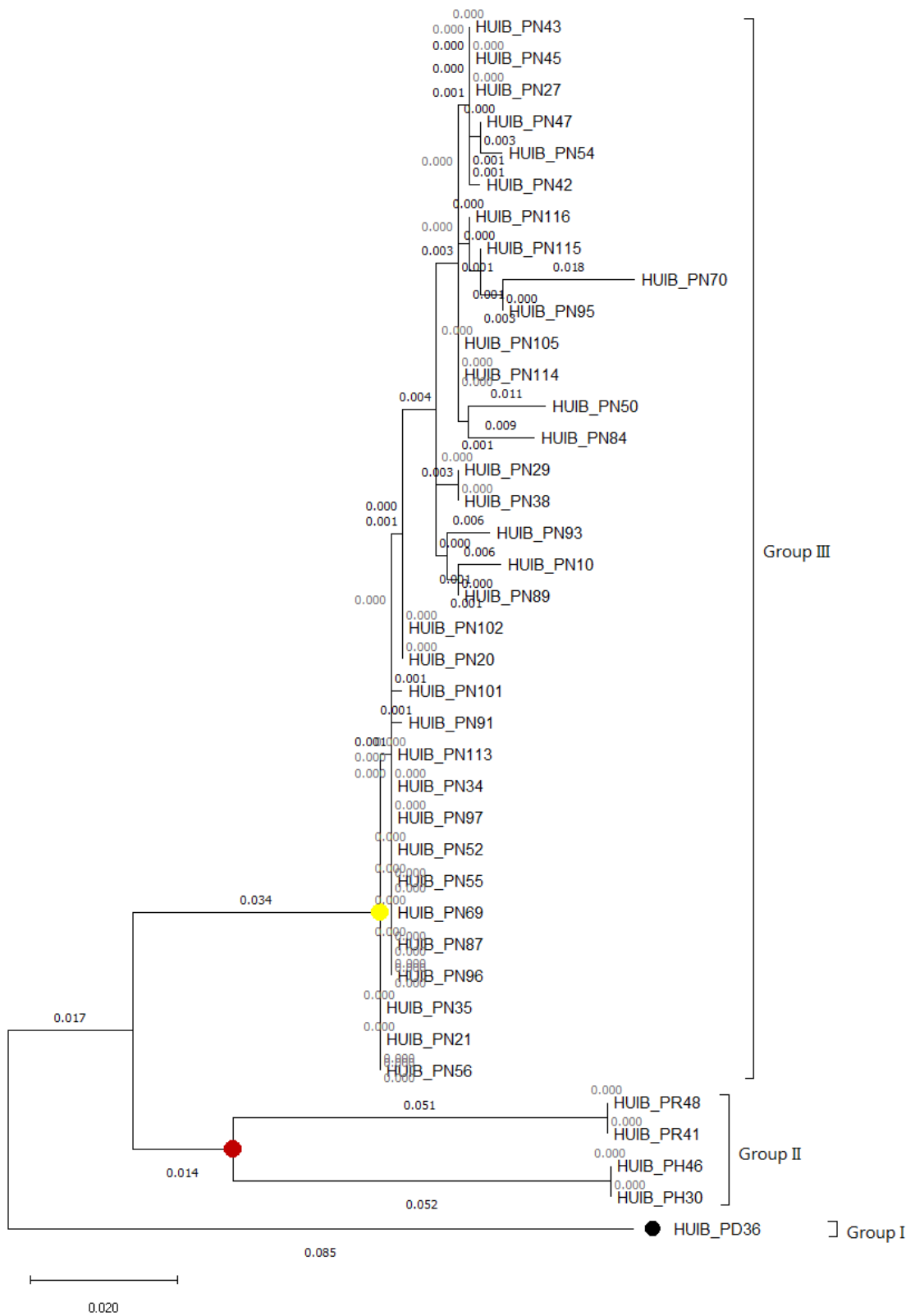
Vùng gen	<i>Fu's</i>	<i>Tajima's</i>		<i>Fu and Li's</i>				<i>S</i>
	<i>F_s</i>	<i>D</i>	<i>P</i>	<i>D*</i>	<i>P</i>	<i>F*</i>	<i>P</i>	
<i>ITSu1-4</i>	-0,209	-1,824	Statistical significance: *, $P < 0,05$	-1,205	Not significant, $P > 0,10$	-1,699	Not significant, $0,10 > P > 0,05$	0,684

Trong đó: *D*, *Tajima's* statistic; *F_s*, *Fu's* statistic; *D** and *F**, *Fu and Li's* statistics; *S*, *Strobeck's S* statistic.

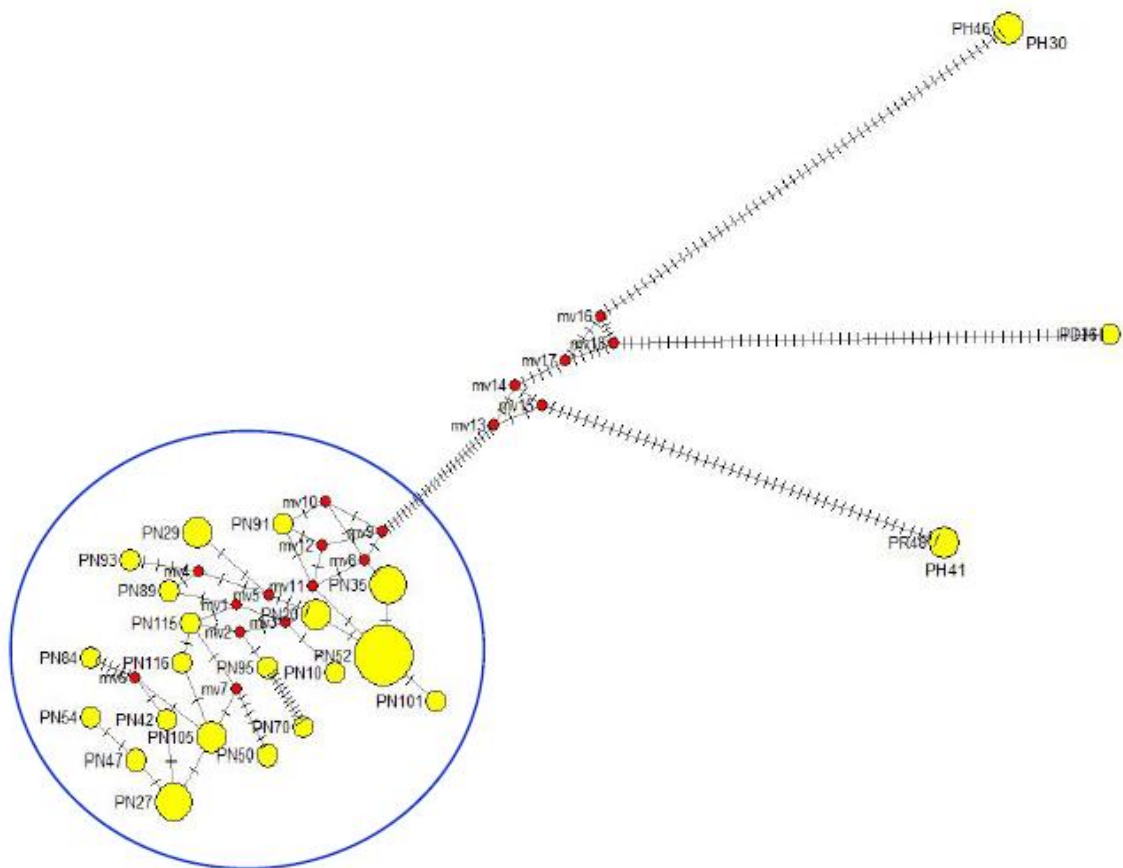
Giá trị F_s trong phân tích Fu's statistic là âm ($F_s = -0,209$) xảy ra khi có quá nhiều haplotype hiếm và cho thấy rằng việc mở rộng quần thể hoặc biến đổi di truyền đã diễn ra (Fu, 1997). Các giá trị D^* và F^* của Fu and Li's statistics cũng âm ($D = -1,824$; $P < 0,05$, $D^* = -1,205$; không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,10$) và $F^* = -1,699$; không có ý nghĩa thống kê ($0,10 > P > 0,05$)), cho thấy sự dư thừa của các haplotype mới xuất hiện gần đây và cho thấy rằng việc mở rộng quần thể hoặc chọn lọc nền (background selection) đã xảy ra (Tajima, 1989; Fu và Li, 1993). Bên cạnh đó, xác suất thu được các kiểu haplotype bằng hoặc ít hơn dựa trên tần số gen và tỷ lệ đột biến giữa các dòng/giống trong một quần thể là cao ($S = 0,684$). Các kết quả này phù hợp với độ lệch so với trung lập do chọn lọc hoặc mở rộng quần thể (Bảng 3.5).

Phân tích phát sinh loài

Mạng lưới Haplotype ITSu1-4 được xây dựng bằng cách sử dụng phân tích thống kê (statistical parsimony) với giới hạn kết nối 95% (điểm ngắt phân tích parsimony = 7 bước đột biến). Lịch sử tiến hóa dựa trên tần số alen vùng gen ITSu1-4 được suy ra bằng cách sử dụng phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei (Kumar và cs., 2018), trong đó tốc độ tiến hóa không đổi giữa các dòng/giống trong quần thể được giả định và khoảng cách di truyền giữa các dòng/giống trong quần thể là tương đối. Cây có log likelihood cao nhất (-2082,26) được hiển thị. Các phân tích tiến hóa được thực hiện trong MEGA X (Kumar và cs., 2018). Kết quả cho thấy có 3 phân nhóm được tạo ra. Nhóm I gồm 1 dòng/giống thuộc loài *Piper divaricatum* (HUIB_PD36), nhóm II gồm 4 dòng/giống thuộc loài *Piper retrofractum* (HUIB_PR41 và HUIB_PR48) và *Piper hancei* (HUIB_PH30 và HUIB_PH46), nhóm III gồm 26 dòng/giống còn lại của loài *Piper nigrum* (Hình 3.5 và 3.6).



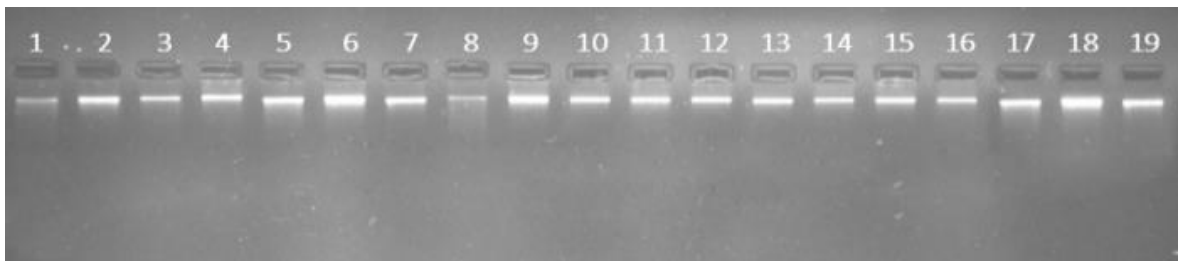
Hình 3.5. Mối quan hệ tiến hóa của các đơn vị phân loại dựa trên vùng gen ITSu1-4 trong nhân di truyền của quần thể hồ tiêu



Hình 3.6. Mạng lưới Haplotype của quần thể Pepper dựa trên vùng ITSu1-4
3.1.3. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng chỉ thị phân tử

Kết quả tách chiết DNA tổng số

Mẫu lá của 39 dòng/giống hồ tiêu được sử dụng để tách chiết DNA theo phương pháp CTAB theo mô tả của Doyle JJ và Doyle JL, 1987 (Doyle & Doyle, 1987). DNA tổng số sau khi tách chiết được điện di trên agarose gel 1% (Hình 3.7)



Hình 3.7. Kết quả tách chiết DNA tổng số của một số dòng/giống hồ tiêu
 Trong đó: 1: HUIB_PN10, 2: HUIB_PN20, 3: HUIB_PN69, 4:HUIB_PN70, 5:HUIB_PN89, 6:HUIB_PN91, 7:HUIB_PN93, 8:HUIB_PN95, 9: HUIB_PN96, 10:

HUIB_PN97, 11: HUIB_PN101, 12: HUIB_PN102, 13: HUIB_PN105, 14: HUIB_PN113, 15: HUIB_PN114, 16: HUIB_PN115, 17: HUIB_PN116, 18: HUIB_PN55, 19: HUIB_PN56

Kết quả điện di ở hình 3.7 cho thấy DNA tổng số tách chiết từ lá của các dòng/giống nghiên cứu cho một băng duy nhất, sạch, không đứt gãy, rõ nét. Chất lượng DNA đảm bảo để làm nguyên liệu cho thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả sàng lọc môi RAPD

Chọn ngẫu nhiên 3 dòng/giống hồ tiêu trong số 39 dòng/giống để tiến hành sàng lọc 200 môi RAPD nhằm tìm ra môi tạo ra các băng rõ nét và có số băng đa hình cao nhất. Kết quả cho thấy chỉ 12 môi RAPD đạt yêu cầu (Bảng 3.6). Các môi này sau đó được chúng tôi sử dụng để nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền bằng kỹ thuật RAPD cho 39 dòng/giống trong tập đoàn hồ tiêu.

Bảng 3.6. Môi RAPD sử dụng đánh giá đa dạng di truyền hồ tiêu

STT	Tên môi	Trình tự môi	STT	Tên môi	Trình tự môi
1	UBC#303	GGTCTCCTAG	7	UBC#352	CACAACGGGT
2	UBC#317	GCGAACCTCC	8	UBC#359	AGGCAGACCT
3	UBC#322	ATGGCAAAGC	9	UBC#363	ATGACGTTGA
4	UBC#329	CTGGGGCCGT	10	UBC#377	GACGGAAGAG
5	UBC#333	GCGTGACCCG	11	UBC#382	ATACACCAGC
6	UBC#347	ATCTAGGGAC	12	UBC#392	CCTGGTGGTT

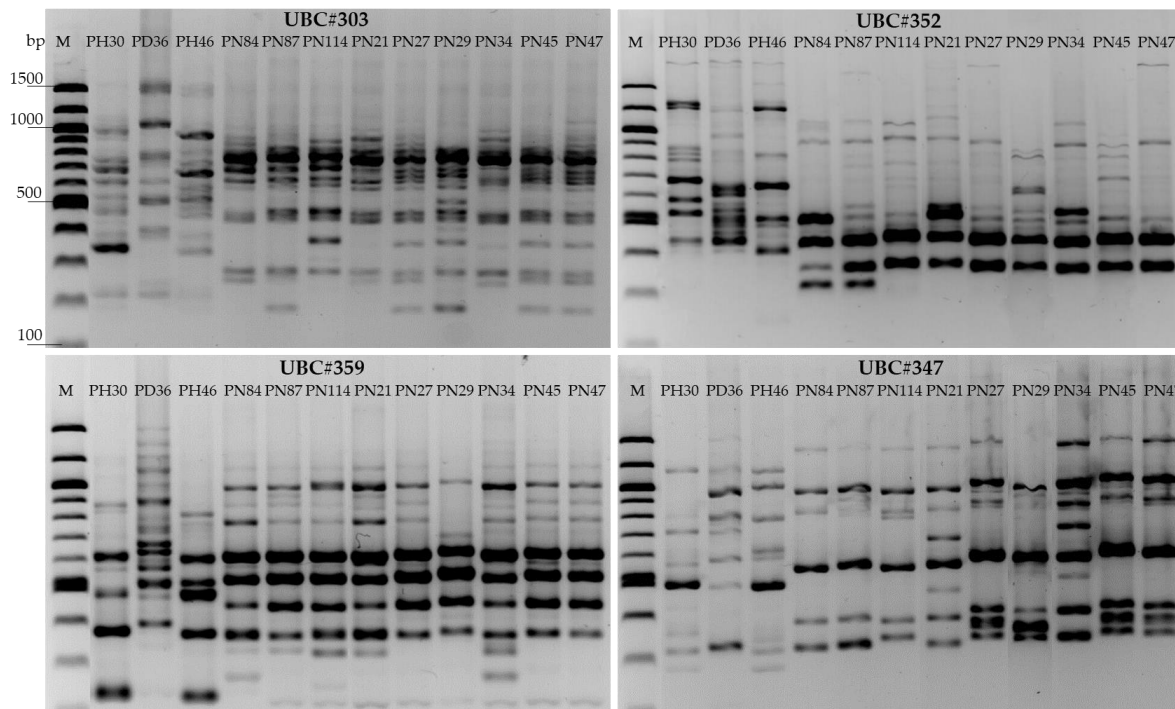
Kết quả phân tích RAPD của quần thể hồ tiêu

Trong tổng số 39 dòng/giống hồ tiêu được sử dụng trong nghiên cứu, HUIB_PN29 là dòng/giống có số băng khuếch đại nhiều nhất với 22 băng DNA (chiếm 3,259% trên tổng số băng DNA tạo thành), tiếp theo là HUIB_PN21 và HUIB_PN47 có cùng số băng DNA tạo ra là 21 băng, chiếm 3,1116% trên tổng số băng tạo thành. Những dòng/giống hồ tiêu có cùng số băng DNA tạo thành từ 12 môi RAPD là HUIB_PN27, HUIB_PN34 và HUIB_PN45 (20 băng DNA, chiếm 2,963% tổng số băng tạo thành), HUIB_PN96, HUIB_PN46, HUIB_PN84 và HUIB_PN87 (19 băng DNA tạo thành, chiếm 2,815% tổng số băng tạo thành).

Những dòng/giống hồ tiêu có ít số băng DNA tạo thành nhất là HUIB_PN10, HUIB_PN70 và HUIB_PN93 (14 băng DNA tạo thành).

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.8 cho thấy có tất cả 40 băng DNA đã được khuếch đại từ 12 môi ngẫu nhiên, tất cả đều là băng đa hình (số băng đa hình trên mỗi trung bình là 3,333), kích thước băng dao động từ 200 – 1400 bp. Tỷ lệ các dòng/giống được khuếch đại cao (83,547 %). UBC#303, UBC#352, UBC#359, UBC#347 và UBC#392 với số băng lần lượt là 5, 3, 5, 2 và 4 băng DNA được tạo thành, tiếp đến là UBC#377 (96,774 %) với số băng DNA tạo thành là 5. Mỗi UBC#333 có số lượng dòng/giống được dòng/giống khuếch đại thấp nhất là dòng/giống (38,710 %) (Bảng 3.7, hình 3.8).

Theo Nei và cộng sự (1978), khả năng phân biệt các mẫu nghiên cứu trên cây phả hệ càng lớn khi số băng được khuếch đại càng nhiều, trong đó số băng đa hình tối thiểu là 50 % mới có thể xây dựng cây phả hệ chính xác (Nei, 1978). Với 12 môi sử dụng, chúng tôi đã thu được 40 băng DNA đa hình từ các dòng/giống hồ tiêu khác nhau. Vì vậy, số liệu thu được sau khi phân tích 12 môi RAPD là đủ cho nghiên cứu đa dạng di truyền tập đoàn hồ tiêu.



Hình 3.8. Sản phẩm PCR của các môi UBC#303, UBC#352, UBC#359, UBC#347 khuếch đại các dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PD36, HUIB_PH46, HUIB_PN84,

HUIB_PN87, HUIB_PN114, HUIB_PN21, HUIB_PN27, HUIB_PN29,
HUIB_PN34, HUIB_PN45, HUIB_PN47; M: 100 bp Ladder

Bảng 3.7. Số băng DNA khuếch đại của các dòng/giống hồ tiêu với từng môi

Ký hiệu dòng/giống	UBC #303	UBC #317	UBC #329	UBC #322	UBC #333	UBC #352	UBC #359	UBC #363	UBC #377	UBC #347	UBC #382	UBC #392	Tổng cộng
HUIB_PN10	3	1	0	1	0	1	2	0	0	2	2	2	14
HUIB_PN20	4	1	0	1	0	1	3	0	1	1	2	2	16
HUIB_PN21	1	1	2	1	2	1	3	1	3	1	2	3	21
HUIB_PN27	3	1	1	1	2	1	3	1	2	1	2	2	20
HUIB_PN29	2	1	1	1	4	1	3	2	2	1	2	2	22
HUIB_PH30	3	2	1	0	2	1	2	1	1	1	1	2	17
HUIB_PN34	2	0	1	1	2	1	3	1	2	2	2	3	20
HUIB_PN35	1	1	1	1	2	2	4	1	1	1	1	3	19
HUIB_PD36	3	0	0	0	3	1	4	1	1	1	1	2	17
HUIB_PN38	3	1	0	1	0	1	2	0	0	2	2	2	14
HUIB_PR41	3	0	0	0	3	1	4	1	1	1	1	2	17
HUIB_PN42	2	1	1	1	2	1	3	1	2	2	2	2	20
HUIB_PN43	3	1	0	1	0	3	3	0	1	2	2	1	17
HUIB_PN45	2	1	1	1	2	1	3	1	2	2	2	2	20
HUIB_PH46	3	2	3	1	2	1	2	1	1	1	1	1	19
HUIB_PN47	3	1	1	1	2	1	3	1	2	2	2	2	21
HUIB_PR48	3	2	1	0	2	1	2	1	1	1	1	2	17
HUIB_PN50	3	1	0	1	0	1	3	1	2	1	1	2	16
HUIB_PN52	1	0	1	1	2	1	3	1	3	1	2	2	18
HUIB_PN54	4	1	0	1	0	1	3	0	1	1	2	2	16
HUIB_PN55	3	1	1	1	0	1	3	0	2	2	2	1	17
HUIB_PN56	3	0	1	1	0	1	3	0	2	2	2	1	16
HUIB_PN69	3	1	0	1	0	3	3	0	1	2	2	1	17
HUIB_PN70	3	1	0	1	0	3	2	0	1	2	0	1	14
HUIB_PN84	1	1	1	1	2	2	4	1	1	1	1	3	19
HUIB_PN87	2	1	2	1	1	2	3	1	2	1	2	1	19
HUIB_PN89	3	0	1	1	0	2	3	2	1	2	1	2	18
HUIB_PN91	3	0	0	1	0	1	3	0	2	2	1	2	15
HUIB_PN93	3	0	0	1	0	1	3	0	2	2	1	1	14

HUIB_PN95	3	1	0	1	0	1	3	2	1	2	1	2	17
HUIB_PN96	2	1	0	1	0	2	3	1	2	2	2	3	19
HUIB_PN97	3	0	0	1	0	3	2	0	3	2	1	1	16
HUIB_PN101	3	1	1	1	0	1	3	0	2	2	2	1	17
HUIB_PN102	4	1	0	1	0	2	2	0	2	2	0	1	15
HUIB_PN105	3	1	0	1	0	1	3	1	2	1	1	2	16
HUIB_PN113	3	1	0	1	0	2	3	0	2	2	1	3	18
HUIB_PN114	3	1	0	1	0	1	3	1	2	1	1	2	16
HUIB_PN115	2	1	0	1	0	2	3	0	1	2	1	2	15
HUIB_PN116	2	1	1	1	0	2	2	0	2	2	2	1	16
Tổng cộng	104	33	23	35	35	56	112	25	62	61	57	72	675

Bảng 3.8. Kết quả khuếch đại của các dòng/giống hồ tiêu ở từng môi

Stt	Môi	Số dòng/giống khuếch đại	% dòng/giống khuếch đại	Số băng khuếch đại	Số băng đa hình	Phạm vi kích thước băng (bp)	Tỷ lệ đa hình (%)
1	UBC#303	39	100,00	5	5	220 - 1040	100
2	UBC#317	30	76,92	2	2	370 - 800	100
3	UBC#329	19	48,72	3	3	320 - 450	100
4	UBC#322	35	89,74	2	2	400 - 720	100
5	UBC#333	16	41,03	5	5	200 - 1400	100
6	UBC#352	39	100,00	3	3	300 - 1200	100
7	UBC#359	39	100,00	5	5	230 - 1050	100
8	UBC#363	22	56,41	2	2	400 - 460	100
9	UBC#377	37	94,87	5	5	420 - 1100	100
10	UBC#347	39	100,00	2	2	500 - 590	100
11	UBC#382	37	94,87	2	2	300 - 420	100
12	UBC#392	39	100,00	4	4	330 - 900	100
Tổng cộng			83,547	40	40	200 - 1400	100

Kết quả phân tích đa dạng di truyền và xây dựng cây phả hệ

Phân tích sự đa dạng của các dòng/giống trong quần thể hồ tiêu cho thấy có sự đa dạng di truyền của hồ tiêu là lớn (Bảng 3.9). Trong 12 môi ngẫu nhiên được sử dụng trong nghiên cứu cho thấy môi UBC#329 thể hiện đa dạng cao nhất với giá trị

H_o đạt trung bình 0,5332, tiếp đến là môi UBC#317 ($H_o = 0,4676$). Sự đa dạng thấp nhất là ở môi UBC#322 ($H_o = 0,3311$). Việc nghiên cứu sự đa dạng trong quần thể một loài nhất định cũng đã được nhiều tác giả nghiên cứu, kết quả nhiều nghiên cứu cũng cho thấy sự đa dạng rất cao của các dòng/giống trong quần thể. Khi nghiên cứu trên cây *Eremostachys supera*, Verma và cs., (2007) nhận thấy sự đa dạng trong các quần thể cũng khá cao (H_o từ 0,31 – 0,42) và sự đa dạng trong quần thể chiếm 83,01% sự đa dạng trong loài. Trên cây *Salsola passerina*, sự đa dạng trong các quần thể thấp hơn (H_o từ 0,16 – 0,20) và chiếm 70,96% đa dạng loài (Gao và cs., 2009). Ngược lại, nhiều nghiên cứu cho thấy rằng khi sự khác nhau giữa các quần thể cao thì sự đa dạng của các dòng/giống trong quần thể thấp. Li và Xia (2005) đã đánh giá mức độ đa dạng di truyền của Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis*) từ 5 vùng khác nhau của Trung Quốc bằng kỹ thuật ISSR. Kết quả cho thấy chúng có mức độ đa dạng trong quần thể thấp (H_o từ 0,02 – 0,11) trong khi sự khác biệt giữa các quần thể lớn hơn (52,54%) (Li và Xia, 2005).

Bảng 3.9. Các chỉ số đa dạng di truyền của quần thể theo từng môi RAPD

Môi	na^*	ne^*	h^*	H_o^*
UBC#303	2	1,5058	0,2926	0,4476
UBC#317	2	1,5249	0,3073	0,4676
UBC#329	2	1,6443	0,3614	0,5332
UBC#322	2	1,3268	0,2035	0,3311
UBC#333	2	1,3180	0,2114	0,3468
UBC#352	2	1,4115	0,2636	0,4195
UBC#359	2	1,5444	0,3029	0,4531
UBC#363	2	1,3851	0,2341	0,3697
UBC#377	2	1,4649	0,2754	0,4209
UBC#347	2	1,4246	0,2594	0,4072
UBC#382	2	1,5435	0,3075	0,4625
UBC#392	2	1,4751	0,2850	0,4398
Trung bình (SE)	2(0,172)	1,44 (0,343)	0,266 (0,171)	0,41 (0,226)

See Nei (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* (p. 176 - 187)

**na = Số lượng alleles được quan sát*

**ne = Số lượng alleles có hiệu quả (kimura and crow, 1964)*

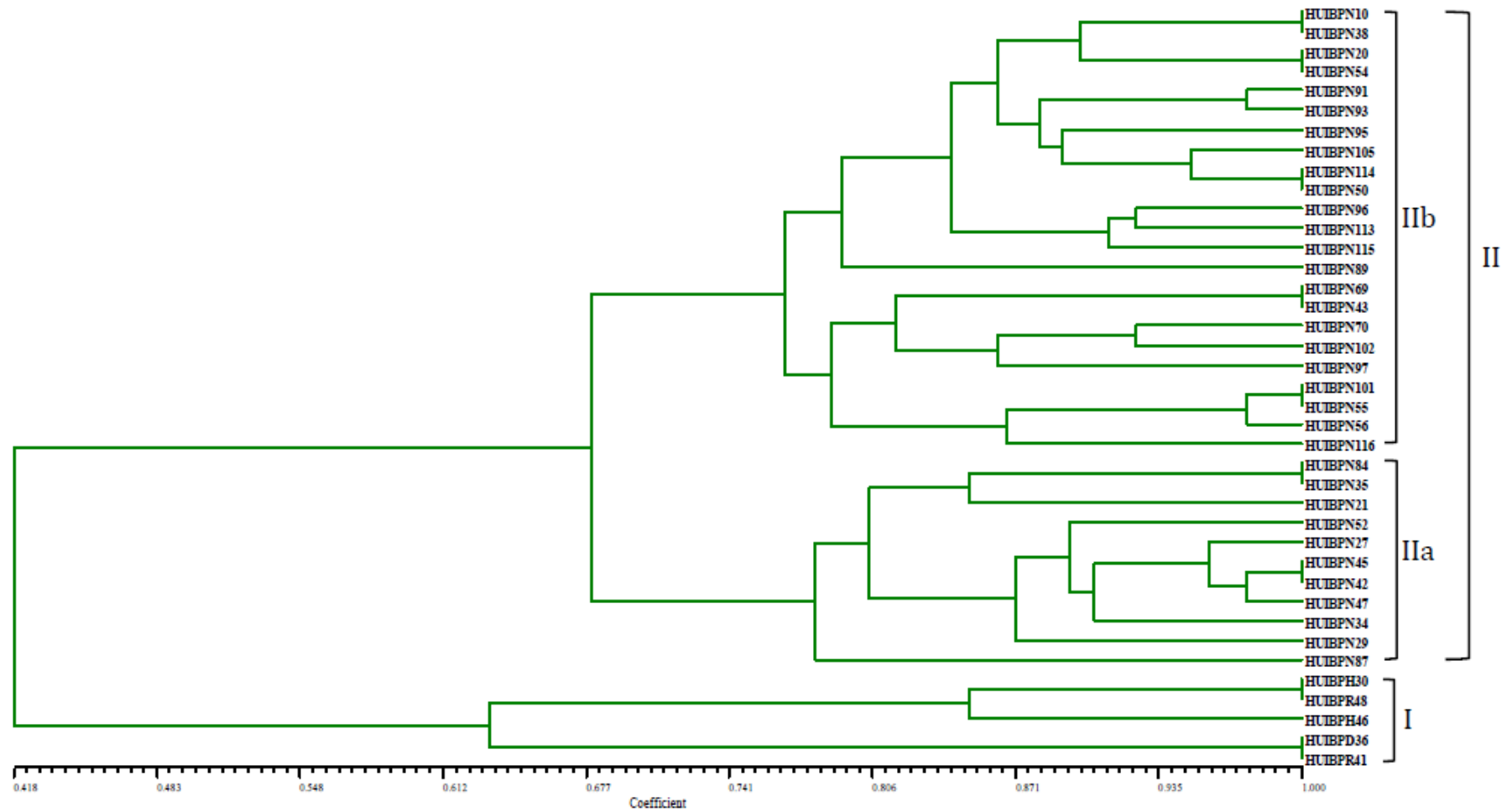
**h = Đa dạng gen Nei's (1973)*

**H₀ = Chỉ số đa dạng di truyền Shannon (Lewontin, 1972)*

Các giá trị hệ số tương tự của 39 dòng/giống phổ biến đã được tính toán và chúng nằm trong khoảng từ tối thiểu 0,418 đến tối đa là 1. Cây phát sinh gen được tạo ra (Hình 3.9) bằng cách sử dụng phân tích cụm UPGMA đã chia 39 dòng/giống cây hồ tiêu thành hai dòng/giống chính. Các nhánh thể hiện sự tương đồng trong khoảng 41,8 – 51% giữa chúng. Mỗi nhánh gồm có các nhóm con với mức độ tương đồng khác nhau. (Hình 3.9).

Nhánh I gồm 5 dòng/giống hồ tiêu là HUIB_PH30, HUIB_PH46, HUIB_PD36, HUIB_PR41 và HUIB_PR48. Tuy nhiên, 5 dòng/giống hồ tiêu này phân thành hai nhóm phụ ở hệ số tương đồng di truyền khoảng 0,635.

Nhóm phụ thứ nhất gồm 3 dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PH46 và HUIB_PR48, nhóm phụ thứ hai gồm hai dòng/giống HUIB_PD36 và HUIB_PR41 có cùng hệ số tương đồng di truyền là 1. Nhánh II gồm 34 dòng/giống hồ tiêu với hệ số tương đồng di truyền là 0,677, các dòng/giống phân thành 2 nhóm phụ IIa (11 dòng/giống) và nhóm phụ IIb (23 dòng/giống). Trong đó, các dòng/giống có hệ số tương đồng cao nhất là HUIB_PN10, HUIB_PN20, HUIB_PH30, HUIB_PN54, HUIB_PN114, HUIB_PN50, HUIB_PN43, HUIB_PN69, HUIB_PN84, HUIB_PN101, HUIB_PN35, HUIB_PN45 (1) và dòng/giống có hệ số tương đồng thấp nhất là HUIB_PN87 (0,772). Như vậy, kết quả phân tích phả hệ DNA cho thấy tính đa dạng cao giữa các dòng/giống trong cùng một quần thể. Sự biến đổi di truyền có thể là do sự khác biệt về điều kiện sinh sản và nguồn gốc cây con.



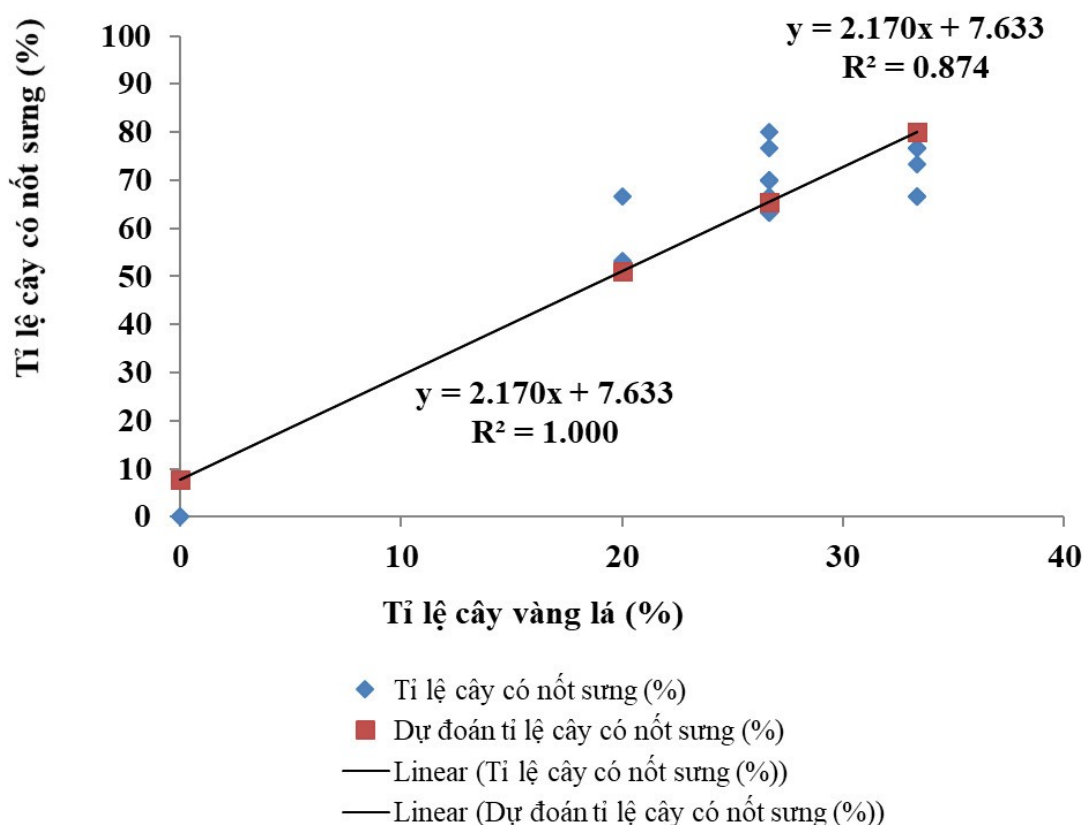
Hình 3.9. Cây UPGMA thể hiện mối quan hệ di truyền của các 39 dòng/giống hồ tiêu

3.2. CHỌN LỌC CÁC DÒNG/GIỐNG HỒ TIÊU CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG TUYẾN TRÙNG VÀ CHỊU ỨNG

3.2.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của tập đoàn hồ tiêu

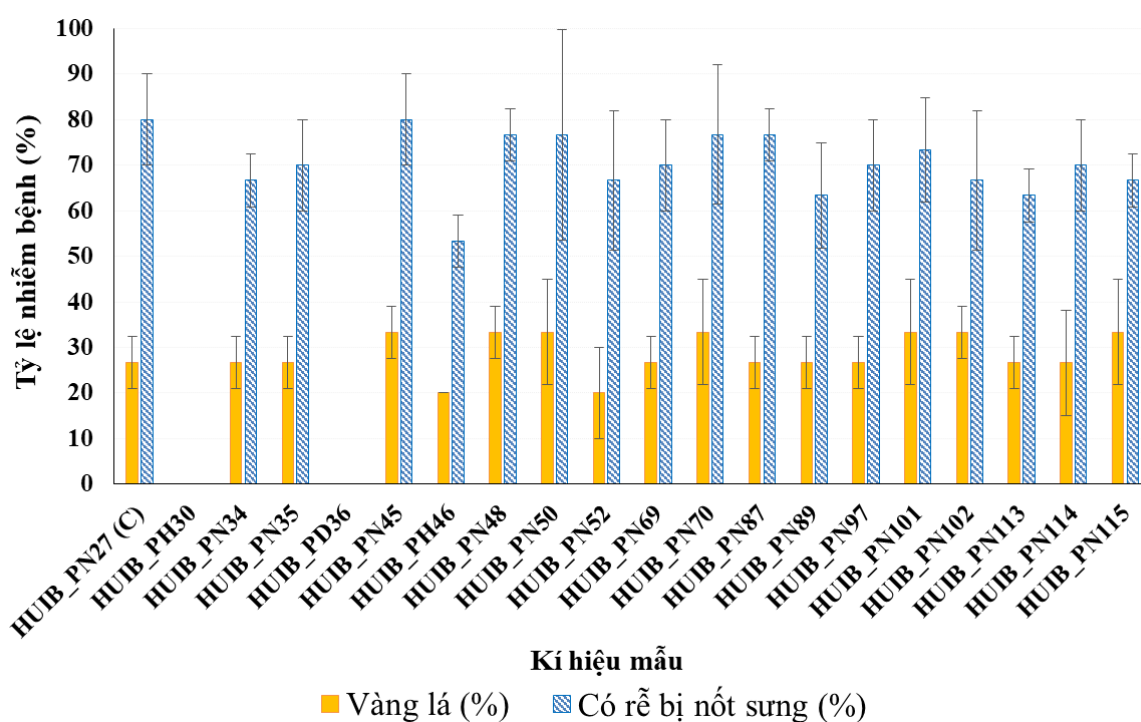
Các tuyến trùng được định danh có tên khoa học là *Meloidogyne incognita*. Trình tự của chúng được công bố trên Genbank với các mã số OQ784598 và OQ784301.

Để đánh giá khả năng kháng *M. incognita*, 39 dòng/giống hồ tiêu đã được lấy nhiễm đối với *M. incognita*. Vàng lá, rễ có nốt sùng là triệu chứng điển hình của sự xâm nhiễm *M. incognita*. Chúng tôi đã tìm thấy mối tương quan chặt chẽ về tỷ lệ nốt sùng trên rễ và tỉ lệ vàng lá (Hình 3.10). Đây là mối tương quan thuận theo phương trình tuyến tính $y = 2,170x + 7,633$ ($R^2 = 0,874$). Cụ thể là, khi tỉ lệ cây nhiễm có nốt sùng cao thì tỉ lệ cây vàng lá cũng cao và ngược lại, khi tỉ lệ cây nhiễm có nốt sùng ít thì tỉ lệ vàng lá thấp.



Hình 3.10. Tương quan giữa tỷ lệ cây có biểu hiện vàng lá và nốt sùng trên rễ

Bốn tháng sau khi thí nghiệm, lá vàng đã được quan sát thấy ở hầu hết các dòng/giống hồ tiêu (20,00% đến 33,33%), ngoại trừ HUIB_PH30 và HUIB_PD36 (0%). Tương tự, khi điều tra rễ, các nốt sùng được tìm thấy ở hầu hết các dòng/giống hồ tiêu (lên đến 80%), ngoại trừ ở HUIB_PH30 và HUIB_PD36. Điều này cho thấy hai dòng/giống HUIB_PH30 và HUIB_PD36 không có dấu hiệu của sự nhiễm *M. incognita*. Trong khi, HUIB_PH46 tương đối nhạy cảm với sự xâm lấn của *M. incognita* (Hình 3.11). Có thể nhận định rằng HUIB_PH30 và HUIB_PD36 là hai dòng/giống hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng mạnh, HUIB_PH46 có khả năng kháng yếu với tuyến trùng (với tỉ lệ vàng lá và tỉ lệ nốt sùng ở rễ thấp hơn so với những dòng/giống hồ tiêu còn lại).



Hình 3.11. So sánh tỷ lệ cây có biểu hiện vàng lá và tỷ lệ cây có nốt sùng sau 4 tháng cấy *Meloidogyne incognita*.

3.2.2. Đánh giá khả năng chịu úng của một số dòng/giống hồ tiêu

Những năm gần đây, một số huyện ở tỉnh Thừa Thiên Huế đã tiến hành canh tác cây hồ tiêu. Tuy nhiên, đây là các vùng trũng thấp nên diện tích hồ tiêu chết sau mùa lụt là rất lớn. Trên thị trường hiện nay chưa có giống hồ tiêu nào có khả năng chịu úng. Do đó, kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng chịu úng kết hợp với

kết quả đánh giá khả năng kháng tuyến trùng ở hồ tiêu sẽ làm cơ sở chọn lựa gốc ghép có khả năng kháng tuyến trùng và chịu úng tốt trong điều kiện mưa lũ của Thừa Thiên Huế.

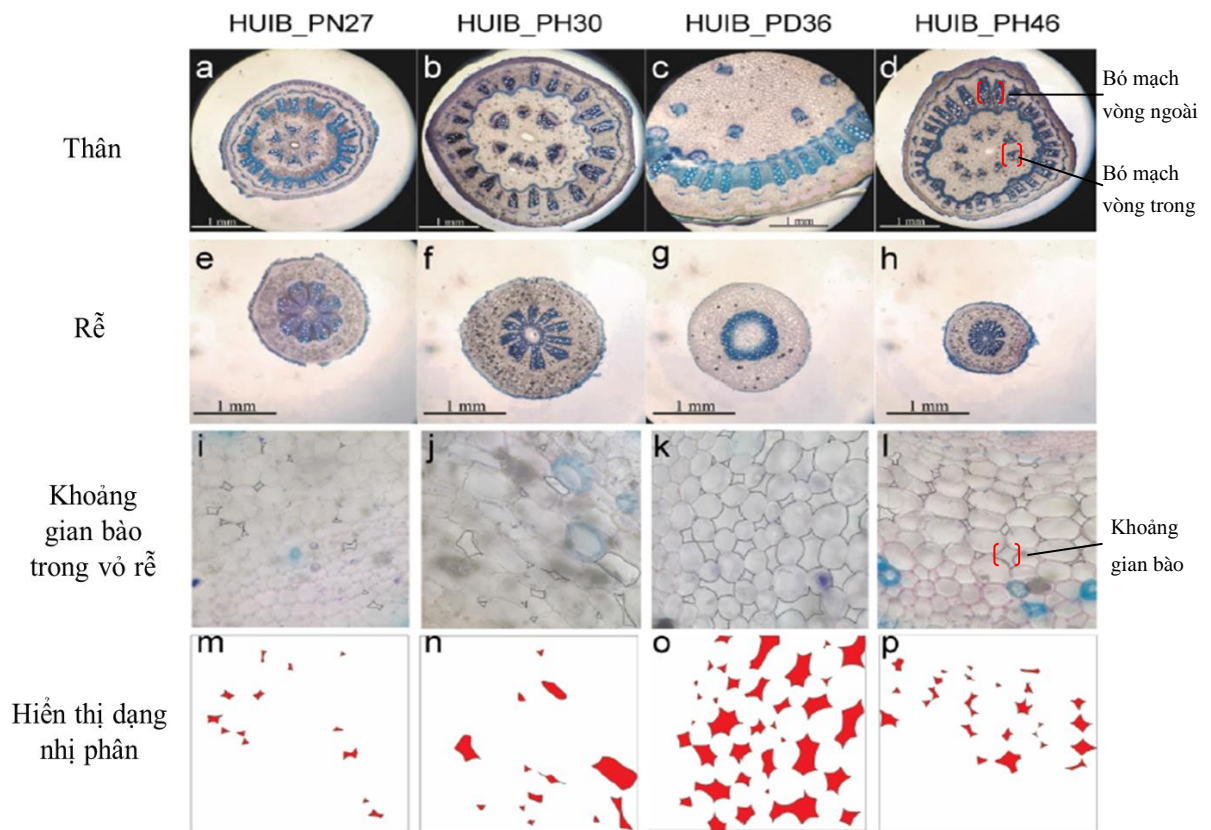
Thí nghiệm xử lý ngập úng cho thấy chỉ ba dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PD36 và HUIB_PH46 có khả năng chịu úng với tỉ lệ sống sót là 100%, trong khi các dòng/giống còn lại đều bị chết do úng nước (tỉ lệ sống sót là 0%) (Bảng 3.10). Sau 15 ngày thử nghiệm ngập úng, chỉ ba dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PD36 và HUIB_PH46 còn sống, cây và lá còn xanh.

Để hiểu rõ hơn về cơ chế chịu úng của ba dòng/giống (HUIB_PH30, HUIB_PD36 và HUIB_PH46), các đặc điểm hình thái vi mô của thân và rễ của 3 dòng/giống đã được quan sát dưới kính hiển vi (Hình 3.12). Dòng/giống HUIB_PN27 được sử dụng để làm đối chứng âm. Kết quả chỉ ra rằng, thân của HUIB_PD36 nổi bật vì đường kính lớn hơn từ ba đến bốn lần so với ba dòng/giống còn lại. HUIB_PD36 có hình dạng của các bó mạch khác với ba dòng/giống còn lại. Đáng chú ý, vỏ rễ của HUIB_PN27 cho thấy rất ít khoảng gian bào ($1,1 \pm 0,1\%$ diện tích mặt cắt vỏ rễ). Trong khi, cả 3 dòng/giống có khả năng chịu úng tốt là HUIB_PH30, HUIB_PD36 và HUIB_PH46 có khoảng gian bào lớn hơn đáng kể (HUIB_PH30: $5 \pm 2\%$, HUIB_PD36: $16 \pm 6\%$ và HUIB_PH46: $5 \pm 2\%$). Chính khoảng gian bào tạo điều kiện cho oxy vào rễ và chồi, do đó, không gian giữa các tế bào lớn hơn giúp giải thích làm thế nào ba dòng/giống này đối phó tốt hơn trong điều kiện ngập úng.

Bảng 3.10. Sàng lọc khả năng sống sót trong ngập úng

Ký hiệu vật liệu	Địa điểm thu thập	Tỉ lệ sống sót sau khi xử lý ngập úng (%)
HUIB_PN10	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN20	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN21	Quảng Nam, Việt Nam	0
HUIB_PN27	Quảng Trị, Việt Nam	0
HUIB_PN29	Quảng Trị, Việt Nam	0
HUIB_PH30	Quảng Trị, Việt Nam	100
HUIB_PN34	Đăk Lăk, Việt Nam	0

HUIB_PN35	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PD36	Gia Lai, Việt Nam	100
HUIB_PN38	Quảng Trị, Việt Nam	0
HUIB_PN41	Quảng Trị, Việt Nam	0
HUIB_PN42	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN43	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN45	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PH46	Quảng Trị, Việt Nam	100
HUIB_PN47	Quảng Nam, Việt Nam	0
HUIB_PN48	Quảng Trị, Việt Nam	0
HUIB_PN50	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN52	Bình Phước, Việt Nam	0
HUIB_PN54	Đông Nai, Việt Nam	0
HUIB_PN55	Kiên Giang, Việt Nam	0
HUIB_PN56	Quảng Ngãi, Việt Nam	0
HUIB_PN69	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN70	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN84	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN87	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN89	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN91	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN93	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN95	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN96	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN97	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN101	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN102	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN105	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN113	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN114	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN115	Gia Lai, Việt Nam	0
HUIB_PN116	Gia Lai, Việt Nam	0



Hình 3.12. Đặc điểm vi phẫu của (a - d) thân và (e - h) rễ thu được từ thí nghiệm ngập úng (i - l) vỏ rễ. Đường kẻ đậm (được vẽ trong CorelDRAW) được chỉ định khoảng gian bào trong vỏ rễ. (m - p) Hình ảnh nhị phân thu được từ vỏ rễ tương ứng (i - l), khoảng gian bào được tô màu đỏ và khoảng trắng đại diện cho các tế bào sống.

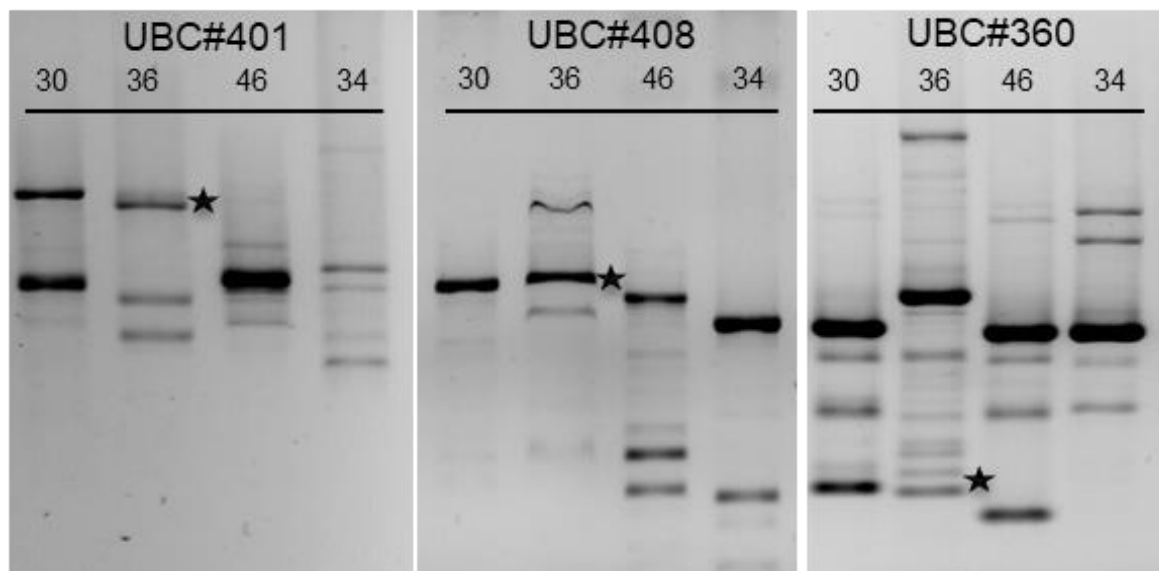
3.3. PHÁT TRIỂN CHỈ THỊ PHÂN TỬ DNA LIÊN KẾT VỚI TÍNH KHÁNG TUYẾN TRÙNG CỦA CÂY HỒ TIÊU BẰNG PHƯƠNG PHÁP BSA

3.3.1. Nghiên cứu nhận diện chỉ thị phân tử liên kết với tính kháng tuyến trùng bằng phương pháp BSA

Kết quả phân tích RAPD

Từ kết quả của công việc đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của tập đoàn hồ tiêu, chỉ hai dòng/giống hồ tiêu là HUIB_PH30, HUIB_PD36 cho thấy khả năng kháng tuyến trùng. Dựa vào đây và kết hợp với kết quả đánh giá đa dạng di truyền (phần 3.1.3) đối với 100 môi RAPD (UBC#301 - 400), kết quả khuếch đại thêm với 100 môi RAPD (UBC#401 - 500), chúng tôi đã tìm thấy 3 môi UBC#401, UBC#408,

UBC#360 cho thấy có sự xuất hiện băng đặc trưng của HUIB_PH30, HUIB_PD36 so với 2 dòng/giống còn lại là dòng/giống HUIB_PH46 và dòng/giống HUIB_PN34 . Ba băng đặc trưng này là các băng đậm, rõ nét và có thể chỉ thị cho khả năng kháng tuyến trùng của các dòng/giống hồ tiêu (Hình 3.13).

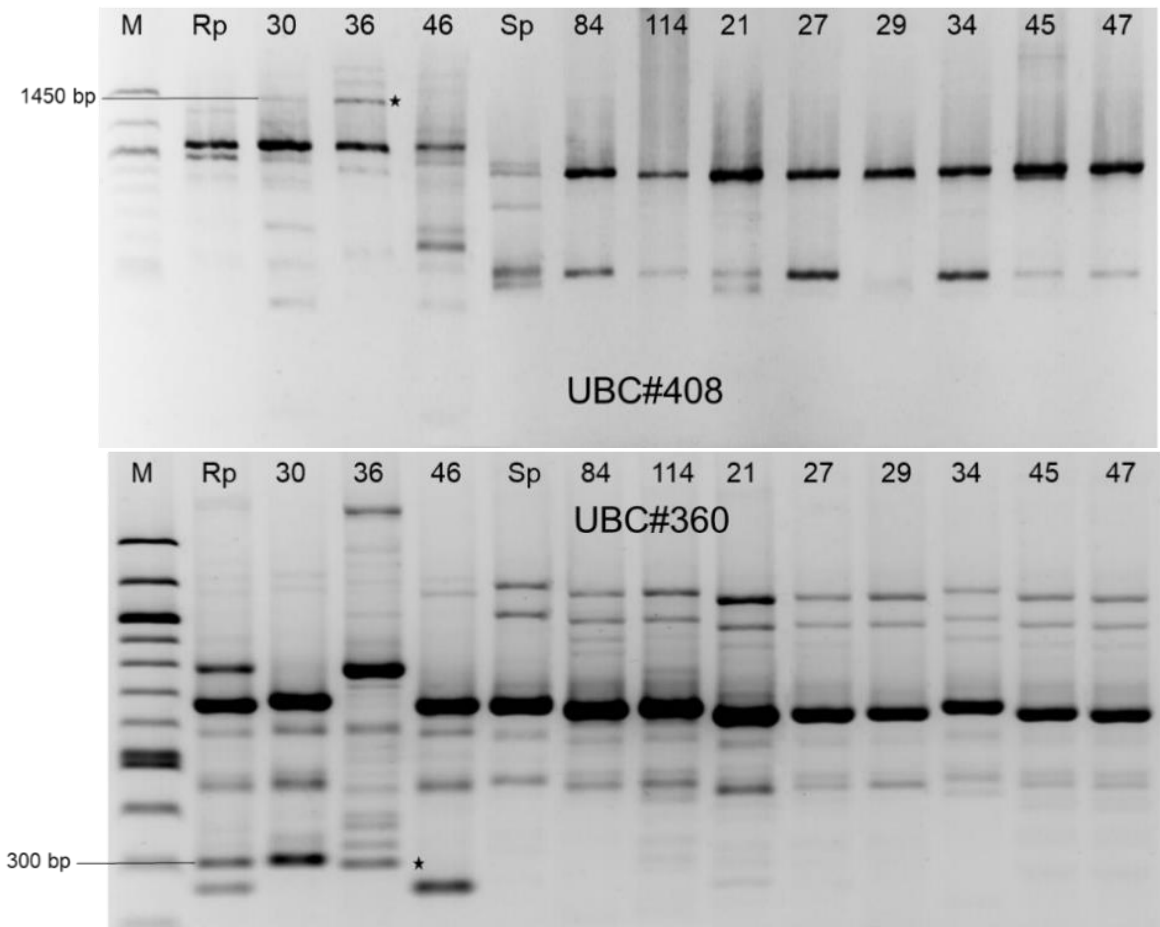


Hình 3.13. Sản phẩm PCR của 3 môi UBC#401, UBC#408, UBC#360 biểu hiện băng đặc trưng cho 2 dòng dòng/giống hồ tiêu kháng (HUIB_PH30 (30), HUIB_PD36 (36)) so với 2 dòng/giống hồ tiêu không kháng tuyến trùng (HUIB_PN46 (46), HUIB_PN34 (34)); ngôi sao là đánh dấu các băng DNA đặc trưng của HUIB_PH30 và HUIB_PD36.

Kết quả BSA

Tiếp theo, 3 môi UBC#401, UBC#408, UBC#360 đã được sử dụng để khuếch đại hai pool Rp, Sp và các dòng/giống hồ tiêu để tạo Rp pool (HUIB_PH30 và HUIB_PD36) và Sp pool (HUIB_PH46, HUIB_PN84, HUIB_PN114, HUIB_PN21, HUIB_PN27, HUIB_PN29, HUIB_PN34, HUIB_PN45, HUIB_PN47). Kết quả cho thấy rằng, chỉ có 2 môi UBC#408 và UBC#360 tạo ra hai băng đặc trưng ổn định cho hai dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PD36 (Hình 3.14). Trong đó, băng đặc trưng hay đoạn DNA liên kết với tính kháng tuyến trùng là băng 1450 bp ở môi UBC#408 và băng 300 bp ở môi UBC#360. Hai trình tự này sau đó được cắt, tinh sạch, đưa vào vector để giải trình tự nhằm thiết kế môi và thực hiện các bước tiếp theo trong nghiên cứu. Trong khi đó, kết quả khuếch đại lại cho

thấy các đoạn DNA đều xuất hiện giữa các dòng kháng và không kháng ở môi UBC#401, vì vậy không thể được sử dụng ở các bước tiếp theo.



Hình 3.14. Kết quả khuếch đại của hai môi UBC#360 và UBC#408 đối với pool kháng (Rp), pool không kháng tuyển trùng (Sp) và các dòng/giống hồ tiêu tạo pool. Trong đó: *HUIB_PH30* (30), *HUIB_PD36* (36), *HUIB_PH46* (46), *HUIB_PN84* (84), *HUIB_PN114* (114), *HUIB_PN21* (21), *HUIB_PN27* (27), *HUIB_PN29* (29), *HUIB_PN34* (34), *HUIB_PN45* (45), *HUIB_PN47* (47); ngôi sao là đánh dấu các băng DNA liên kết với tính kháng tuyển trùng. M: 100 bp Ladder.

3.3.2. Nghiên cứu chuyển đổi chỉ thị RAPD sang chỉ thị SCAR

Nhân dòng và giải trình tự các đoạn RAPD

Từ kết quả “nghiên cứu phát triển chỉ thị phân tử nhận dạng tính kháng tuyển trùng bằng phương pháp BSA” đã tiến hành cắt và tinh sạch 2 phân đoạn DNA khoảng 300 bp của môi UBC#360 và 1450 bp của môi UBC#408 biểu hiện liên kết với tính kháng tuyển trùng. Tuy nhiên, chỉ có phân đoạn DNA khoảng 400 bp của

mồi UBC#360 cho kết quả tinh sạch thành công với nồng độ sau khi tinh sạch là 10 ng/ μ l và kết quả PCR kiểm tra cho băng DNA đặc hiệu, đậm, rõ nét. Do đó, chỉ có phân đoạn 400 bp được lựa chọn để thực hiện các bước tiếp theo.

Chúng tôi đã tiến hành nhân dòng đoạn DNA-RAPD liên kết với tính kháng (300bp) để gửi giải trình tự, thiết kế mồi và thực hiện khuếch đại kiểu gen cho 2 dòng/giống chuẩn kháng và 9 dòng/giống chuẩn nhiễm. Tuy nhiên, kết quả nhân dòng lại không thành công. Do đó, các đoạn DNA đã được gửi dịch vụ nhân dòng và giải trình tự. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.11, với kích thước băng tạo dòng là 403 bp với tỉ lệ GC là 34%.

Bảng 3.11. Kết quả giải trình tự đoạn RAPD liên kết với tính kháng tuyến trùng

Tên đoạn DNA (tên mẫu-tên mồi RAPD)	Trình tự đoạn gen 5'→3'	Kích thước (bp)	Tỉ lệ GC (%)
30-360	CTCTCCAGGCCTTCCCCATCTCTCCAGGC CCCTTGCCTCCTCATCTTGCCAATAATTTT CTACACATATATTTGTTATGATTTTCATATT AATTA ACTCTTGAATAGTTAGATTGATTA AAAATTA ACTTTTTATGATTTTTCAACTTG ATAGTTCTGATAAGCAGAAAAAAGTAA ACAAGAATGTAAGATTTAGGCCTAGAAC ACAAATCATTCCCAAGTTTGTCATAAAA ATCGATTCCTAGTTGGATTTTCGTCCTCTTC TTGATTTCCCTAGCAATTCTCATGGAAAG AAGCTGTAGACCGAGCATCTATACTATCA AGTGGTTTGTCTTCCTTCATTTTTGTTGTC TCCTTCTTTTCAATGTTTTTGGTAACTGG TTTTCCTGGAGAGAAAT	403	34

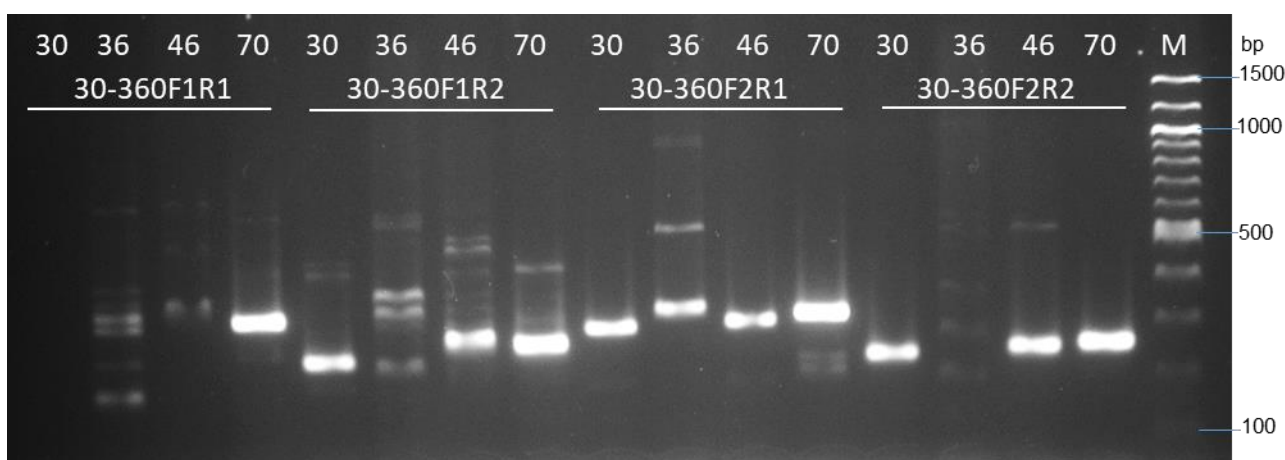
❖ **Thiết kế mồi**

Dựa trên kết quả giải trình tự đoạn DNA liên kết với tính kháng xuất hiện ở dòng chuẩn kháng, đã có 2 cặp mồi SCAR được thiết kế (Bảng 3.12). Từ 2 cặp mồi này có thể ghép cặp để tạo ra 4 cặp mồi nhằm tiến hành phân tích SCAR bao gồm: 30 - 360F1R1, 30 - 360F1R2, 30 - 360F2R1, 30 - 360F2R2. Tiếp đó, chúng tôi tiến hành chọn 2 mẫu DNA dòng/giống kháng và 2 mẫu DNA dòng/giống nhiễm lần

lượt là HUIB_PH30, HUIB_PD36, HUIB_PN46, HUIB_PN70 để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi được thiết kế.

Bảng 3.12. Các mồi được thiết kế cho phân tích SCAR

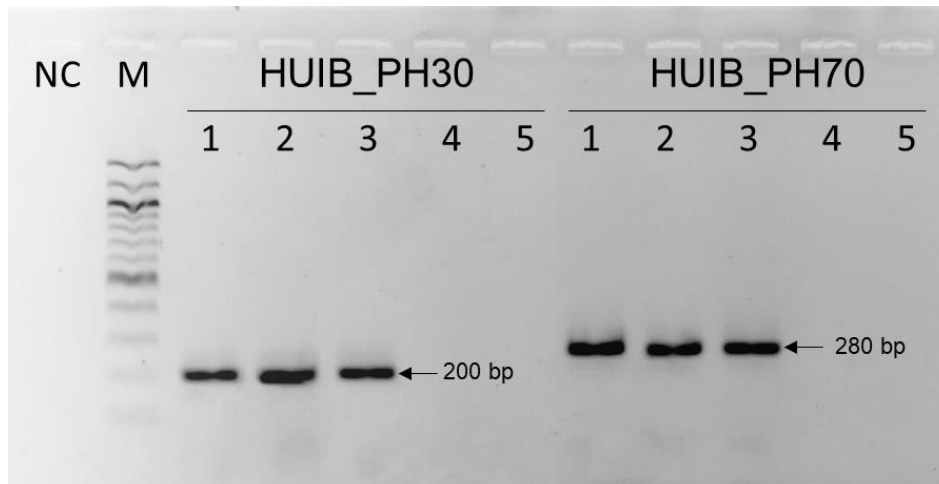
Tên mồi	Trình tự (5' - 3')	Nhiệt độ ủ (°C)
30 - 360F1	CTCTCCAGGCCTTCCCCATC	64,6
30 - 360R1	CTCTCCAGGCAAACCCAGTT	58,4
30 - 360F2	GCCCTCCTCATCTTGCCAAT	60,5
30 - 360R2	TCGGTCTACAGCTTCTTTCCA	59,4



Hình 3.15. Kết quả khuếch đại 4 dòng/giống HUIB_PH30 (30), HUIB_PN36 (36), HUIB_PH46 (46), HUIB_PN70 (70) của các cặp mồi SCAR.

Kết quả phản ứng khuếch đại với cặp mồi SCAR cho thấy: chỉ có cặp mồi 30 - 360F1R2 có thể khuếch đại được cả 4 dòng/giống hồ tiêu, trong đó HUIB_PH30 và HUIB_PD36 có một băng DNA kích thước ngang nhau, trong khi dòng/giống HUIB_PN46 và HUIB_P70 có băng kích thước lớn hơn (Hình 3.15). Dựa vào kết quả này, cặp mồi 30 - 360F1R2 có thể dùng để phân biệt được giữa các dòng/giống kháng/nhiễm tuyến trùng. Tuy nhiên để kết quả PCR là ổn định, chính xác nhất và tránh được sự ảnh hưởng của các băng không đặc hiệu đến kết quả phân tích, chúng tôi cần tiến hành thêm các thí nghiệm nhằm tối ưu các thông số trong quá trình PCR với mục đích cuối cùng là xây dựng thành công bộ Kit chỉ thị phân tử giúp nhận dạng các dòng/giống hồ tiêu mang tính kháng tuyến trùng.

Đánh giá độ nhạy của chỉ thị SCAR

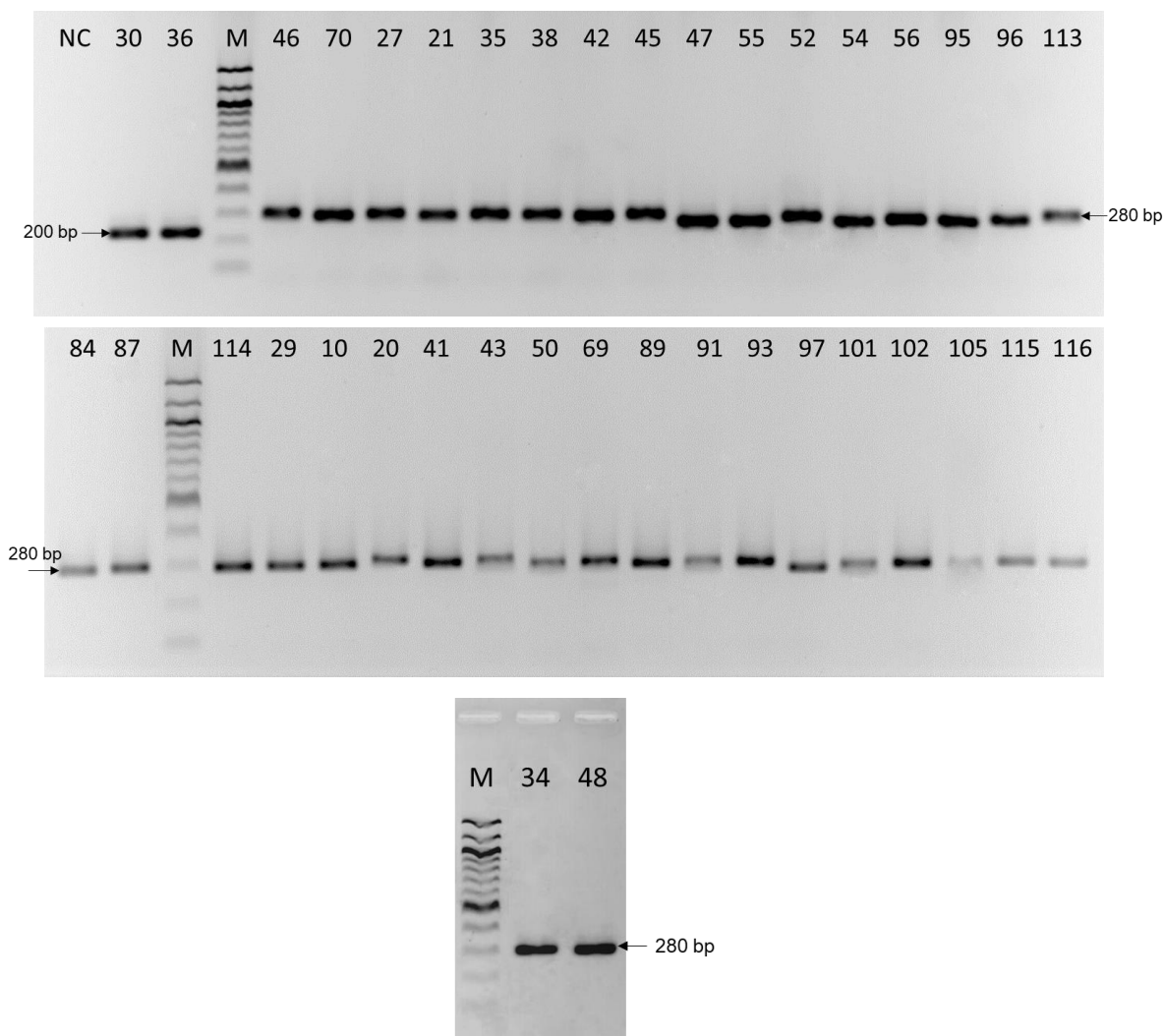


Hình 3.16. Kết quả khuếch đại 2 dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PN70 của cặp mồi 30-360F1R2 ở 5 nồng độ DNA khác nhau là 20; 10; 5; 0,5 và 0,05 ng/ μ L. NC: đối chứng âm (nước cất); M: 100 bp Ladder; 1, 2, 3, 4, 5 lần lượt là các nồng độ DNA 20; 10; 5; 0,5 và 0,05 ng/ μ L

Chúng tôi đã tiến hành các phản ứng PCR với các nồng độ DNA khác nhau của 2 dòng/giống tiêu là HUIB_PH30 và HUIB_PH70 (20; 10; 5; 0,5 và 0,05 ng/ μ L). Các phản ứng này sử dụng các thông số đã tối ưu thành công cho cặp mồi SCAR. Kết quả điện di sản phẩm PCR đã chỉ ra rằng, 10 - 20 ng/ μ l là nồng độ thích hợp nhất của DNA để tạo ra các băng rõ nét và có độ đặc hiệu cao. Từ đó, có thể thấy bộ Kit có độ nhạy với DNA ở nồng độ 10 - 20 ng/ μ l (Hình 3.16).

Đánh giá độ đặc hiệu của chỉ thị SCAR

Thông qua việc tối ưu các thông số của quá trình khuếch đại DNA, bước đầu đã xác định được thành phần của một chỉ thị SCAR nhận biết tính kháng tuyến trùng ở hồ tiêu gồm: 10 pmol mồi, 0,33 mM dNTP, 5X Mytaq reaction buffer. Chu trình nhiệt được tiến hành lần lượt là: 95°C trong vòng 3 phút (1 chu kỳ); 95°C trong 15 giây, 60°C trong 15 giây, 72°C trong 30 giây (35 chu kỳ); 72°C trong 10 phút (1 chu kỳ).



Hình 3.17. Kết quả khuếch đại của cặp mồi 30-360F1R2 với một số dòng/giống hồ tiêu trong tập đoàn hồ tiêu ở nhiệt độ gắn mồi là 60°C trong 15 giây, 35 chu kỳ phản ứng, 10 pmol mồi, có bổ sung 0,33 mM dNTP, sử dụng nồng độ DNA 5-10 ng/ μ l. M: 100 bp Ladder; HUIB_PH30 (30) và HUIB_PD36 (36): dòng/giống kháng; HUIB_PH46 (46), HUIB_PN21 (21), HUIB_PN52 (52), HUIB_PN27 (27), HUIB_PN45 (45), HUIB_PN55 (55), HUIB_PN56 (56), HUIB_PN70 (70), HUIB_PN95 (95), HUIB_PN96 (96), HUIB_PN113 (113), HUIB_PN116 (116), HUIB_PN38 (38), HUIB_PN42 (42), HUIB_PN35 (35), HUIB_PN54 (54), HUIB_PN47 (47), HUIB_PR41 (41), HUIB_PN50 (50), HUIB_PN84 (84), HUIB_PN87 (87), HUIB_PN114 (114), HUIB_PN29 (29), HUIB_PN10 (10), HUIB_PN20 (20), HUIB_PR41 (41), HUIB_PN43 (43), HUIB_PN69 (69), HUIB_PN50 (50), HUIB_PN89 (89), HUIB_PN91 (91), HUIB_PN93 (93),

HUIB_PN97 (97), HUIB_PN101 (101), HUIB_PN102 (102), HUIB_PN105 (105), HUIB_PN115 (115), HUIB_PN116 (116), HUIB_PN34 (34), HUIB_PR48 (48): dòng/giống nhiễm.

Kết quả phân tích độ đặc hiệu của chi thị SCAR đều cho thấy các cặp mồi có độ đặc hiệu cao (100%) cho dòng/giống kháng hoặc nhiễm tuyến trùng. Từ đó có thể làm cơ sở để phân biệt dòng/giống nhiễm/kháng tuyến trùng.

Cụ thể là chúng tôi đã sử dụng các thông số tối ưu cho phản ứng PCR với cặp mồi 30 - 360F1R2 để thực hiện phản ứng SCAR cho tất cả 39 dòng/giống tiêu. Kết quả đã cho thấy rằng, băng khuếch đại ở các dòng/giống đa số là khá đậm và đặc hiệu. Sản phẩm khuếch đại được tạo ra ở 2 dòng/giống HUIB_PH30 (30), HUIB_PD36 (36) có kích thước tương đồng nhau (khoảng 250 bp). Trong khi đó, ở các dòng/giống còn lại các băng DNA có kích thước lớn hơn (khoảng 300 bp) (Hình 3.21). Điều này là phù hợp với các báo cáo trước đó của chúng tôi về khả năng kháng tuyến trùng của 39 dòng/giống tiêu. Cụ thể là, 2 dòng/giống tiêu HUIB_PH30, HUIB_PD36 có khả năng kháng tuyến trùng. Trong khi đó, khả năng không xuất hiện ở các dòng/giống còn lại. Chính vì vậy, có thể thấy rằng việc sử dụng cặp mồi 30 - 360F1R2 với các thông số đã được tối ưu cho phản ứng PCR là phù hợp để xây dựng nên bộ Kit chi thị phân tử giúp nhận dạng các dòng dòng/giống hồ tiêu mang tính kháng tuyến trùng (Hình 3.17).

3.4. ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM RA HOA CỦA MỘT SỐ GIỐNG HỒ TIÊU LOÀI *P. NIGRUM* L. VÀ KHẢ NĂNG LAI TẠO VỚI LOÀI *P. DIVARICATUM* KHÁNG TUYẾN TRÙNG NHẪM TẠO DÒNG/GIỐNG HỒ TIÊU MỚI

3.4.1. Đặc điểm ra hoa của các dòng/giống hồ tiêu

Các dòng/giống hồ tiêu khác nhau sẽ có thời gian sinh trưởng, phát triển gié khác nhau. Sự phát triển gié tiêu có thể chia làm 5 giai đoạn. Cụ thể là:

- (1) Giai đoạn xuất hiện gié (Hình 3.19);
- (2) Giai đoạn kéo dài gié (Hình 3.20);
- (3) Giai đoạn thụ phấn - thụ tinh;
- (4) Giai đoạn sau thụ phấn – quả đầu đình;
- (5) Giai đoạn chín.

Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chỉ tiến hành theo dõi giai đoạn kéo dài gié, giai đoạn phân hóa mầm hoa và khoảng lệch giao giữa nhị và nhụy để phục vụ cho công tác lai dòng/giống hồ tiêu.



Hình 3.18. Giai đoạn phân hóa mầm hoa của dòng/giống Sri Lanka (HUIB_PN97)



Hình 3.19. Giai đoạn gié xuất hiện của dòng/giống Vĩnh Linh (HUIB_PN27)



Hình 3.20. Giai đoạn kéo dài gié của dòng/giống Lộc Ninh (HUIB_PN27)

Giai đoạn kéo dài gié là giai đoạn quyết định số lượng hoa trên gié. Giai đoạn này kéo dài từ 14,0 - 22,1 ngày đối với các dòng/giống hồ tiêu được sử dụng thí nghiệm. Dòng/giống tiêu HUIB_PN101 có thời gian kéo dài gié dài nhất là 22,1 ngày và dài hơn có ý nghĩa so với các dòng/giống tiêu còn lại. Các dòng/giống tiêu HUIB_PN27, HUIB_PN96 và HUIB_PN69 có thời gian kéo dài gié là không khác biệt nhau có ý nghĩa ở mức $P < 0,01$ (Bảng 3.13).

Bảng 3.13. Các giai đoạn phát triển của gié tiêu

Thời gian Dòng/giống	Giai đoạn kéo dài gié (ngày)	Thời gian phân hóa hoa (ngày)	Khoảng lệch giao giữa nhị và nhụy (ngày)
Năm 2021			
HUIB_PN27	15,7 ^b	19,7 ^a	2,4 ^{bc}
HUIB_PN97	13,4 ^c	12,7 ^c	2,9 ^b
HUIB_PN69	17,4 ^b	14,6 ^b	7,3 ^a
HUIB_PN101	22,2 ^a	8,5 ^d	1,8 ^c

	CV (%) = 4,11; F**	CV (%) = 4,19; F**	CV (%) = 13,93; F**
Năm 2022			
HUIB_PN27	17,7 ^b	17,3 ^a	2,5 ^b
HUIB_PN97	14,0 ^c	12,0 ^d	2,8 ^b
HUIB_PN69	17,8 ^b	14,9 ^b	7,6 ^a
HUIB_PN101	22,1 ^a	8,1 ^e	1,7 ^c
HUIB_PN96	17,2 ^b	13,1 ^c	2,4 ^b
CV (%)	CV (%) = 2,04; F**	CV (%) = 2,21; F**	CV (%) = 6,75; F**

Trong cùng một cột các giá trị cùng kí tự có khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$)

*** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.*

Gié tiêu có xu hướng nở theo hướng từ trên xuống dưới, từ cuống tới chóp gié. Thời gian phân hóa hoa là khoảng thời gian từ khi xuất hiện hoa đầu tiên đến khi gié nở toàn bộ. Có sự khác biệt về thời gian phân hóa hoa của các dòng/giống hồ tiêu và sự khác biệt này rất có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$). Thời gian phân hóa hoa dao động từ 8,1 - 17,3 ngày. Trong đó, dài nhất là dòng/giống HUIB_PN27 (17,3 ngày), kế đến là dòng/giống HUIB_PN69 (14,9 ngày), dòng/giống HUIB_PN97 là 12,0 ngày và HUIB_PN101 là dòng/giống có thời gian phân hóa mầm hoa ngắn nhất, 8,1 ngày. Ở Malaysia (vùng Sarawak), dòng/giống tiêu Kuching tính từ khi gié xuất hiện đến khi nhụy xuất hiện là 16 ngày, nhụy có khả năng tiếp nhận hạt phấn sau 22 ngày và bao phấn xuất hiện sau 27 ngày (Anonymous, 1979). Mỗi dòng/giống khác nhau sẽ có thành phần hoa trên gié khác nhau.

Cây hồ tiêu có hiện tượng lệch giao (biệt giao): Nhụy thường xuất hiện trước nhị từ 1 - 14 ngày (K.A.U. 1978). Khoảng cách lệch giao của các dòng/giống nghiên cứu từ 1,7 - 7,6 ngày. Dòng/giống HUIB_PN101 có khoảng cách xuất hiện nhụy và nhị ngắn nhất (1,7 ngày) và ngắn hơn có ý nghĩa so với các giống còn lại. Khoảng lệch giao giữa nhị và nhụy của các dòng/giống HUIB_PN27, HUIB_PN97 và HUIB_PN96 không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,01$). Khoảng lệch

giao giữa nhị và nhụy của dòng/giống tiêu HUIB_PN69 có sự khác biệt rõ rệt nhất so với các dòng/giống còn lại với khoảng lệch giao lên tới 7,6 ngày. Khả năng nhận phấn của đầu nhụy có thể tiếp nhận lên đến 10 ngày sau khi hoa nở và một lượng nhỏ hạt phấn vẫn được tìm thấy trong bao phấn sau 5 ngày hoặc thậm chí nhiều ngày sau khi bao phấn mở (Krishnamoorthy & Parthasarathy, 2009).

Helen và Lauren (2002) cho rằng, thời gian xuất hiện của đầu nhụy không tương quan với khả năng tiếp nhận. Đầu nhụy có khả năng tiếp nhận ở bất kỳ giai đoạn nào trước khi nhận phấn. Sau khi đầu nhụy nhận phấn, các tế bào đầu nhụy khô héo và tàn lụi, đồng thời các hạt phấn hydrat hóa và nảy mầm. Nếu không được thụ phấn, đầu nhụy có thể tiếp tục tồn tại trong một thời gian dài hơn (Helen & Lauren, 2002).

3.4.2. Kết quả lai tạo các tổ hợp lai với *P. divaricatum* (HUIB_PD36)

Tỉ lệ rụng gié và đậu quả của các tổ hợp lai

Sau giai đoạn thụ phấn – thụ tinh, nếu có 1 hoa trên gié được thụ phấn, quả sẽ bắt đầu phát triển và hình thành quả đầu đỉnh, trường hợp tất cả các hoa trên gié đều không được thụ phấn – thụ tinh thành công, gié sẽ rụng ngay sau đó.

Từ kết quả theo dõi cho thấy, tỉ lệ rụng gié sau khi thụ phấn của các tổ hợp lai khác loài từ 30,00 - 56,67%. Trong đó, tổ hợp lai ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97 có tỉ lệ rụng gié cao nhất (56,67%), tổ hợp lai ♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27 có tỉ lệ rụng gié thấp nhất (30,00%) (Bảng 3.14). Sự khác biệt này rất có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Nghiên cứu của Iljas (1960) đã phát hiện ra rằng các gié được bọc trong túi polyethylene vẫn cho bộ quả tốt không phụ thuộc vào côn trùng hay nước mưa. Sasikumar (1992) cũng cho biết nước mưa không cần thiết cho quá trình thụ phấn ở cây tiêu, nhưng nước mưa có thể làm tăng khả năng thụ phấn, tỉ lệ đậu quả ở các gié được bảo vệ khỏi nước mưa thấp hơn so với các gié để thụ phấn tự do (Sasikumar và cs., 1992).

Khi tiến hành lai xa khác loài giữa tiêu trồng với tiêu rừng Nam Mỹ (HUIB_PD36) thì tỉ lệ đậu quả của các tổ hợp lai rất thấp, chỉ đạt 4,67 - 7,33%. Tổ hợp ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN96 có tỉ lệ đậu quả thấp nhất (4,67%), 2 tổ hợp ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27 và ♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27 có tỉ lệ đậu quả cao nhất (7,33%), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

Sasikumar (1992) đã lai tạo thành công cây lai của 2 loài khác biệt *P. nigrum* x *P. attenuatum* và *P. nigrum* x *P. barberi*. Thể hệ cây lai khác biệt về đặc điểm giải phẫu và hình thái với số nhiễm sắc thể $2n = 26$. Các nghiên cứu về Isozyme cho thấy các biểu hiện đặc trưng của thể cây lai tốt như thể hệ cha mẹ (Sasikumar và cs., 1992).

Bảng 3.14. Tỷ lệ rụng gié và tỉ lệ đậu quả của các tổ hợp lai

TT	Tổ hợp lai	Tỷ lệ rụng gié (%)	Tỷ lệ đậu quả (%)
Năm 2021			
1	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN69	68,1	3,5
2	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97	52,3	5,0
3	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27	62,7	3,9
4	♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27	40,0	5,8
		CV (%) = 42,62; F^{ns}	CV (%) = 65,72; F^{ns}
Năm 2022			
1	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27	33,33 ^{bc}	5,33
2	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97	56,67 ^a	7,33
3	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN96	43,33 ^b	4,67
4	♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27	30,00 ^c	7,33
		CV (%) = 17,32; F[*]	CV (%) = 16,78; F^{ns}

Trong cùng một cột các giá trị cùng kí tự có khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$)

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

** Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.*

Số hạt lai thu được và số hạt lai nảy mầm

Năm 2021, đã thu được hạt lai và gieo ươm lên cây 2 lá mầm của tổ hợp lai ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97 (Bảng 3.15). Tuy nhiên, cây lai này không phát triển thêm mà chỉ dừng lại ở giai đoạn lá mầm rồi suy yếu và chết (Hình 3.21, 3.22, 3.23). Do đó, không đánh giá được hình thái của cây con so với cây bố mẹ. Năm 2022, đã thu hoạch được 37 hạt lai của 4 tổ hợp lai và tiến hành gieo ươm. Tuy nhiên, chỉ có 2 hạt của tổ hợp lai ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27 nảy mầm sau 21 ngày gieo ươm và phát triển thành cây 2 lá mầm (Hình 3.24, 3.25, 3.26). Các hạt lai

còn lại đều không nảy mầm. Vanaja (2008) đã tạo cây lai giữa 2 loài *P. divaricatum* với *P. nigrum*. Hình thái, giải phẫu và phân tử của cây lai đã được xác định. Dòng/giống lai này được coi là bước đột phá thành công trong nghiên cứu lai tạo dòng/giống hồ tiêu (Vanaja và cs., 2008).



Hình 3.21. Hạt lai của tổ hợp ♂HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97



Hình 3.22. Hạt lai nảy mầm của tổ hợp ♂HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97



Hình 3.23. Cây lai của tổ hợp ♂HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97



Hình 3.24. Hạt lai thu được của 2 tổ hợp ♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27 (trái) và ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27 (phải)



Hình 3.25. Hạt lai nảy mầm của tổ hợp ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27



Hình 3.26. Cây lai của tổ hợp ♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27

Bảng 3.15. Số hạt thu được và số hạt nảy mầm của các tổ hợp lai

TT	Tổ hợp lai	Số hạt lai đã thu (hạt)	Số hạt nảy mầm (hạt)	Số hạt lên (phát triển thành) cây còn sống (cây)
Năm 2021				
1	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN69	1	0	0
2	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97	6	2	1
3	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27	0	0	0
4	♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27	4	2	-

Năm 2022				
1	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27	8	2	2
2	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97	11	0	0
3	♂ HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN96	7	0	0
4	♂ HUIB_PN97 x ♀ HUIB_PN27	11	0	0

3.5. CHỌN LỌC GỐC GHÉP KHÁNG TUYẾN TRÙNG VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GHÉP THÀNH CÔNG TRÊN GỐC GHÉP KHÁNG TUYẾN TRÙNG ĐỐI VỚI MỘT SỐ GIỐNG TIÊU THƯƠNG MẠI

3.5.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các gốc ghép hồ tiêu

❖ Khả năng kháng tuyến trùng của các vật liệu gốc ghép

Tuyến trùng *Meloidogyne incognita* khi xâm nhiễm vào cây tạo ra các nốt sưng ở rễ, ảnh hưởng đến khả năng hút nước và dinh dưỡng của cây làm cho cây sinh trưởng kém, còi cọc và lá có thể bị vàng. Đây là một trong những nguyên nhân chính gây ra bệnh vàng lá chết chậm ở cây hồ tiêu.

Khả năng sinh trưởng của các vật liệu gốc ghép trong điều kiện nhiễm tuyến trùng M. incognita

Từ kết quả tổng hợp ở trên cho thấy, giai đoạn trước thí nghiệm đến sau khi lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita* 60 ngày, sinh trưởng chiều cao cây của các vật liệu hồ tiêu không có sự khác biệt về mặt thống kê. Càng về các giai đoạn sau sinh trưởng của các vật liệu có sự khác biệt càng lớn. Sau thí nghiệm 90 ngày đến khi kết thúc thí nghiệm, vật liệu HUIB_PH30 có sinh trưởng chiều cao cây vượt trội và khác biệt rất có ý nghĩa so với 4 vật liệu còn lại. Vật liệu HUIB_PD36 là cây thân bụi nhưng có sinh trưởng chiều cao cây rất tốt và tương đương với 3 vật liệu thân leo còn lại. Các vật liệu còn lại sinh trưởng chiều cao cây mức tương đương nhau.

Tốc độ tăng trưởng về chiều cao cây bị ảnh hưởng đáng kể bởi dòng/giống và sự gây hại của tuyến trùng *M. incognita*. Sự khác biệt về tăng trưởng chiều cao ở các công thức rất có ý nghĩa thống kê trong thời gian sau lây nhiễm 90 ngày. Trong đó, HUIB_PH30 có tốc độ tăng trưởng nhanh nhất ở tất cả các thời điểm theo dõi (từ sao 30-120 ngày theo dõi), đạt trung bình 22,75 cm/30 ngày, tiếp theo là vật liệu HUIB_PN105 (11,75 cm/30 ngày và HUIB_PN27 (10,92 cm/30 ngày). Hai vật liệu

HUIB_PN42 và HUIB_PD36 có tốc độ tăng chiều cao thấp nhất đạt lần lượt là 9,81 và 8,22 cm/30 ngày (Bảng 3.16).

Bảng 3.16. Sinh trưởng chiều cao cây của các vật liệu gốc ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita*

Ký hiệu vật liệu	Tên địa phương của vật liệu	Sinh trưởng chiều cao cây của các vật liệu làm gốc ghép (cm)					Tốc độ tăng trưởng (cm/30 ngày)
		Trước khi lây nhiễm	Sau lây nhiễm 30 ngày	Sau lây nhiễm 60 ngày	Sau lây nhiễm 90 ngày	Sau lây nhiễm 120 ngày	
HUIB_PN105	Tiêu địa phương Đăk Nông	20,00	32,56	42,11	55,78 ^b	67,00 ^b	11,75 ^b
HUIB_PH30	Tiêu rừng lá tròn	19,56	29,00	44,33	76,78 ^a	110,56 ^a	22,75 ^a
HUIB_PN45	Tiêu địa phương Lộc Ninh	20,22	29,22	40,89	53,11 ^b	59,44 ^c	9,81 ^c
HUIB_PD36	Tiêu rừng Nam Mỹ	20,11	29,78	37,56	45,67 ^c	53,00 ^d	8,22 ^d
HUIB_PN27	Tiêu Vĩnh Linh (Đ/C)	20,56	30,00	42,00	52,67 ^b	64,22 ^{bc}	10,92 ^{bc}
CV%		5,47	5,78	6,79	4,45	3,74	4,69
F		ns	ns	ns	**	**	**

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

Giai đoạn trước thí nghiệm đến 30 ngày sau thí nghiệm khả năng ra lá của các vật liệu không có sự khác biệt về mặt thống kê. Giai đoạn từ 60-120 ngày sau thí nghiệm số lá của các công thức có sự khác biệt. Vật liệu HUIB_PH30 luôn có số lá cao vượt trội và đạt 15,67 lá tại thời điểm 120 ngày sau lây nhiễm, 4 vật liệu còn lại có số lá tương đương nhau. Tốc độ tăng trưởng số lá của các vật liệu dao động rất lớn từ 1,42 lá/30 ngày - 2,53 lá/30 ngày. Vật liệu HUIB_PH30 có tốc độ

tăng trưởng số lá cao nhất khác biệt rất rõ ràng so với nhóm 4 vật liệu còn lại (Bảng 3.17).

Bảng 3.17. Khả năng ra lá của các vật liệu gốc ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita*

Ký hiệu vật liệu	Tên địa phương của vật liệu	Sinh trưởng số lá của các vật liệu làm gốc ghép (lá)					Tốc độ ra lá (lá/30 ngày)
		Trước lây nhiễm	Sau lây nhiễm 30 ngày	Sau lây nhiễm 60 ngày	Sau lây nhiễm 90 ngày	Sau lây nhiễm 120 ngày	
HUIB_PN105	Tiêu địa phương Đăk Nông	5,44	7,22	8,67^b	10,33 ^b	12,44 ^b	1,75 ^b
HUIB_PH30	Tiêu rừng lá tròn	5,56	7,11	10,11^a	12,67 ^a	15,67 ^a	2,53 ^a
HUIB_PN45	Tiêu Lộc Ninh	5,56	6,89	8,55^b	9,89 ^b	11,33 ^b	1,44 ^c
HUIB_PD36	Tiêu rừng Nam Mỹ	5,44	6,89	7,89^b	9,44 ^b	11,89 ^b	1,61 ^{bc}
HUIB_PN27	Tiêu Vĩnh Linh (Đ/C)	5,67	6,89	8,45^b	9,78 ^b	11,33 ^b	1,42 ^c
CV%		5,02	4,91	5,57	7,31	5,00	6,10
F		ns	ns	*	**	**	**

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

* Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

Khả năng kháng tuyến trùng của các vật liệu gốc ghép

Sau khi lây nhiễm 120 ngày, mật số tuyến trùng *M. incognita* trong giá thể bầu ươm biến động từ 0 - 25,67 con/100 g đất và từ 0 - 57 con/5 g rễ, tỷ lệ nốt sùng từ 0 - 58,17%, tất cả đều khác biệt rất có ý nghĩa thống kê. Trong đó, không thấy xuất hiện tuyến trùng *M. incognita* trong giá thể và trong rễ của vật liệu HUIB_PD36, cho thấy khả năng kháng rất cao với tuyến trùng *M. incognita*. Vật liệu HUIB_PH30 chỉ xuất hiện tuyến trùng *M. incognita* trong giá thể với mật độ rất thấp 6,00 con/100 g đất, không xuất hiện tuyến trùng *M. incognita* trong rễ và rễ không xuất hiện nốt sùng như

vật chứng tỏ đây cũng là vật liệu có khả năng kháng cao với tuyến trùng. Ba vật liệu còn lại có khả năng chống chịu với tuyến trùng *M. incognita* rất kém, không phù hợp để làm gốc ghép cho hồ tiêu (Bảng 3.18).

Bảng 3.18. Mật độ tuyến trùng *M. incognita* và tỷ lệ rễ bị nốt sần của các vật liệu gốc ghép

Ký hiệu vật liệu	Tên địa phương của vật liệu	Mật độ tuyến trùng		Tỷ lệ rễ bị nốt sần (%)
		Trong đất (con/100 g đất)	Trong rễ (con/5 g rễ)	
HUIB_PN105	Tiêu địa phương Đắk Nông	15,33 ^b	57,00 ^a	58,17 ^a
HUIB_PH30	Tiêu rừng lá tròn	6,00 ^c	0,00 ^b	0,0 ^c
HUIB_PN45	Tiêu Lộc Ninh	20,67 ^{ab}	43,00 ^a	53,28 ^{ab}
HUIB_PD36	Tiêu rừng Nam Mỹ	0,00 ^d	0,00 ^b	0,0 ^c
HUIB_PN27	Tiêu Vĩnh Linh (Đ/C)	25,67 ^a	53,00 ^a	50,07 ^b
CV%		10,39	11,47	6,84
F		**	**	**

Các số liệu là số đếm được chuyển đổi $y_i = \log(x_i + 1)$, số liệu % chuyển sang góc $y_i = \arcsin\sqrt{\%}$. Trong cùng 1 cột, các giá trị có ký tự khác biệt là có ý nghĩa thống kê.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

Kết quả ở bảng trên cho thấy có sự khác biệt rất rõ ràng về tỷ lệ vàng lá và chỉ số hại giữa các vật liệu gốc ghép, điều này thể hiện được khả năng chống chịu với tuyến trùng của mỗi vật liệu là khác nhau. Trong suốt thời gian thí nghiệm, hai vật liệu HUIB_PH30 và HUIB_PD36 không có biểu hiện bị vàng lá chứng tỏ hai vật liệu này không bị tuyến trùng *M. incognita* gây hại. 03 vật liệu còn lại có tỷ lệ vàng lá và chỉ số hại tương đương nhau ở mức rất cao.

Tại thời điểm 30 ngày sau khi lây nhiễm, vật liệu HUIB_PN105 có tỷ lệ vàng lá cao nhất đạt 15,37%, tiếp theo là vật liệu Lộc Ninh (11,37%). Vật liệu dòng/giống Vĩnh Linh có tỷ lệ vàng lá khá thấp (4,86%).

Tại thời điểm 60 ngày sau thí nghiệm, vật liệu HUIB_PN105 vẫn là vật liệu có tỷ lệ vàng lá cao nhất đạt 25,62%, tiếp theo là vật liệu Vĩnh Linh (22,44%). Tỷ lệ vàng lá của vật liệu Lộc Ninh có tỷ lệ vàng lá chậm lại (29,91%).

Tại thời điểm 90 ngày sau thí nghiệm, đã thấy rõ sự khác biệt tỷ lệ vàng lá của các vật liệu, 3 vật liệu HUIB_PN105; Lộc Ninh và Vĩnh Linh có tỷ lệ vàng lá cao nhất đạt 48,31%, 45,05% và 41,09%. Đến thời điểm 120 ngày sau lây nhiễm, tỷ lệ vàng lá của 3 vật liệu này rất cao lần lượt đạt 71,30%, 64,78% và 63,98%.

Chỉ số hại dựa trên tỷ lệ vàng lá phản ánh mức độ vàng lá của các dòng/giống cho thấy: nhóm dòng/giống không bị vàng lá gồm 2 vật liệu HUIB_PH30 và HUIB_PD36, 03 vật liệu còn lại có chỉ số hại rất cao dao động từ 77,78 - 88,89%. Cả ba vật liệu này tỏ ra không có khả năng chống chịu tuyến trùng với mức kháng rất thấp chỉ đạt 1/5 (Bảng 3.19).

Như vậy, từ kết quả đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các vật liệu gốc ghép, nhận thấy có 2 vật liệu gốc ghép rất triển vọng đó là HUIB_PD36 (tiêu rừng Nam Mỹ); HUIB_PH30 (tiêu rừng lá tròn) kháng rất cao với tuyến trùng *M. incognita*. Các kết quả nghiên cứu về vật liệu dòng/giống dùng làm gốc ghép kháng tuyến trùng gây bệnh hồ tiêu trước đó của Nam (2009), Hiền (2019) và Quyên (2020) cũng đã kết luận vật liệu HUIB_PD36 có khả năng kháng tuyến trùng rất cao trong vườn ươm và ngoài đồng ruộng.

Bảng 3.19. Tỷ lệ vàng lá và mức độ gây hại do tuyến trùng *M. incognita* của các tổ hợp ghép

Ký hiệu vật liệu	Tên địa phương của vật liệu	Tỷ lệ vàng lá (%)				Chỉ số hại (%)	Mức kháng
		Sau lây nhiễm 30 ngày	Sau lây nhiễm 60 ngày	Sau lây nhiễm 90 ngày	Sau lây nhiễm 120 ngày		
HUIB_PN105	Tiêu địa phương Đắk Nông	15,37 ^a	25,62 ^b	48,31 ^a	71,30 ^a	88,89 ^a	1/5
HUIB_PH30	Tiêu rừng lá tròn	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	5/5
HUIB_PN45	Tiêu Lộc Ninh	11,30 ^b	29,91 ^a	45,05 ^a	64,78 ^a	77,78 ^a	1/5
HUIB_PD36	Tiêu rừng Nam Mỹ	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	5/5
HUIB_PN27	Tiêu Vĩnh Linh (Đ/C)	4,86 ^c	22,44 ^b	41,09 ^b	63,98 ^a	77,78 ^a	1/5

Ký hiệu vật liệu	Tên địa phương của vật liệu	Tỷ lệ vàng lá (%)				Chỉ số hại (%)	Mức kháng
		Sau lây nhiễm 30 ngày	Sau lây nhiễm 60 ngày	Sau lây nhiễm 90 ngày	Sau lây nhiễm 120 ngày		
CV%		5,95	3,76	2,91	3,92	4,45	
F		**	**	**	**	**	

Các số liệu là % chuyển sang góc $y_i = \arcsin \sqrt{\%}$.

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

3.5.2. Đánh giá khả năng ghép thành công và khả năng tiếp hợp của các tổ hợp ghép

Đánh giá khả năng sinh trưởng và tỷ lệ cây ghép sống của các tổ hợp ghép

Tại thời điểm sau ghép 30 ngày, đã bắt đầu xuất hiện rải rác cây ghép bị chết. Tuy nhiên tỷ lệ cây ghép sống ở thời điểm này rất cao và không rõ ràng giữa các tổ hợp ghép. Sau ghép 60 ngày, tỷ lệ cây ghép sống đạt từ 80% - 96,67%. Tại thời điểm 90 và 120 ngày sau ghép không xuất hiện cây ghép bị chết cho nên tỷ lệ cây sống là ổn định và giữa các tổ hợp ghép có sự khác biệt rất rõ ràng về mặt thống kê.

Tỷ lệ cây ghép sống không bị ảnh hưởng bởi loại gốc ghép. Cả ba loại gốc ghép đều có tỷ lệ cây sống khá cao và tương đương nhau về mặt thống kê. Loại ngọn ghép có ảnh hưởng rất rõ ràng đến tỷ lệ cây ghép sống. Nhóm tổ hợp ghép với ngọn Vĩnh Linh có tỷ lệ cây ghép sống rất cao (trung bình 94,44%), thấp nhất là nhóm tổ hợp ghép với ngọn Lộc Ninh chỉ đạt 67,78%. Hai nhóm ngọn ghép Sri Lanka và Ấn Độ có tỷ lệ sống tương đương nhau lần lượt là 80,00% và 83,33%. Không có sự tương tác giữa gốc ghép và ngọn ghép đến tỷ lệ cây ghép sống. Tổ hợp ghép HUIB_PH30 - Vĩnh Linh có tỷ lệ cây ghép sống cao nhất đạt 96,67%, tiếp đến là hai tổ hợp ghép HUIB_PD36 - Vĩnh Linh và HUIB_PH46 - Vĩnh Linh đều đạt 93,33%. Tổ hợp ghép HUIB_PH30 - Lộc Ninh và HUIB_PH46 - Lộc Ninh có tỷ lệ cây ghép sống thấp nhất chỉ đạt 66,67%, tiếp đến là HUIB_PD36 - Lộc Ninh (70%), khác biệt này là có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.20).

Bảng 3.20. Tỷ lệ ghép sống của các tổ hợp ghép

Nội dung	Tỷ lệ sống của các tổ hợp ghép (%)					
	Gốc ghép	Ngọn ghép				TB (A)
		Vĩnh Linh	Lộc Ninh	Sri Lanka	Ấn Độ	
Sau ghép 30 ngày	HUIB_PD36	100,00	96,67	96,67	96,67	97,50
	HUIB_PH30	100,00	96,67	96,67	96,67	97,50
	HUIB_PH46	96,67	93,33	96,67	96,67	95,83
	TB (B)	98,89	95,56	96,67	96,67	
	CV(%) = 0,87; F _A =0,41 ^{ns} ; F _B = 0,65 ^{ns} ; F _{A*B} = 0,14 ^{ns} ; F _{AB} = 0,33 ^{ns}					
Sau ghép 60 ngày	HUIB_PD36	93,33 ^a	70,00 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	81,67
	HUIB_PH30	96,67 ^a	66,67 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	81,67
	HUIB_PH46	93,33 ^a	66,67 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	80,83
	TB (B)	94,44A	67,78C	80,00B	83,33B	
	CV(%) = 2,23; F _A =0,05 ^{ns} ; F _B = 10,99 ^{**} ; F _{A*B} = 0,06 ^{ns} ; F _{AB} = 3,04 [*]					
Sau ghép 90 ngày	HUIB_PD36	93,33 ^a	70,00 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	81,67
	HUIB_PH30	96,67 ^a	66,67 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	81,67
	HUIB_PH46	93,33 ^a	66,67 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	80,83
	TB (B)	94,44A	67,78C	80,00B	83,33B	
	CV(%) = 2,23; F _A =0,05 ^{ns} ; F _B = 10,99 ^{**} ; F _{A*B} = 0,06 ^{ns} ; F _{AB} = 3,04 [*]					
Sau ghép 120 ngày	HUIB_PD36	93,33 ^a	70,00 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	81,67
	HUIB_PH30	96,67 ^a	66,67 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	81,67
	HUIB_PH46	93,33 ^a	66,67 ^b	80,00 ^{ab}	83,33 ^{ab}	80,83
	TB (B)	94,44A	67,78C	80,00B	83,33B	
	CV(%) = 2,23; F _A =0,05 ^{ns} ; F _B = 10,99 ^{**} ; F _{A*B} = 0,06 ^{ns} ; F _{AB} = 3,04 [*]					

Các số liệu % chuyển sang góc $y_i = \arcsin\sqrt{\%}$. Trên cùng 1 cột, các ký tự khác biệt là có ý nghĩa thống kê.

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

* Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

Tại thời điểm sau ghép 30 ngày, chiều cao chồi ghép không bị ảnh hưởng bởi yếu tố gốc ghép, nhưng bị chi phối rất mạnh bởi yếu tố ngọn ghép. Nhóm tổ hợp ghép với ngọn ghép Sri Lanka có chiều cao chồi vượt trội đạt 6,04 cm, tiếp đến là nhóm tổ hợp ghép với ngọn ghép Vĩnh Linh (3,95 cm), ngọn ghép Ấn Độ đạt 3,33 cm và nhóm ngọn ghép Lộc Ninh đạt 3,44 cm. Có sự tương tác giữa gốc ghép và ngọn ghép đến sinh trưởng chiều cao chồi. Tổ hợp ghép HUIB_PD36 – Sri Lanka có chiều cao chồi lớn nhất đạt 6,21 cm, tiếp đến là tổ hợp ghép HUIB_PH46 - SR (6,14 cm) và HUIB_PH30 – Sri Lanka (5,76 cm). Nhóm tổ hợp ghép với ngọn ghép Lộc Ninh và Ấn Độ có chiều cao chồi thấp nhất dao động từ 3,34 – 3,56 cm, khác biệt này là rất rõ ràng.

Tại thời điểm sau ghép 60 ngày, sinh trưởng chiều cao chồi ghép lại có xu hướng ngược lại với giai đoạn 30 ngày. Trong giai đoạn này, chiều cao chồi lại chịu ảnh hưởng của loại gốc ghép mà không chịu ảnh hưởng của loại ngọn ghép. Nhóm tổ hợp ghép trên gốc HUIB_PH30 có chiều cao chồi tốt nhất đạt 11,64 cm, chiều cao chồi của các tổ hợp ghép trên hai nhóm gốc ghép HUIB_PD36 và HUIB_PH46 tương đương nhau. Có sự tương tác giữa gốc ghép và ngọn ghép đến sinh trưởng chiều cao chồi. Tổ hợp ghép HUIB_PH30 - Sri Lanka vẫn là tổ hợp có chiều cao chồi lớn nhất đạt 13,17 cm, thấp nhất là tổ hợp ghép HUIB_PD36 - Ấn Độ (9,56 cm). Hai tổ hợp ghép HUIB_PH46 - Vĩnh Linh và HUIB_PH30 - Ấn Độ có sự tăng trưởng chiều cao chồi vượt trội đạt lần lượt là 11,72 cm và 11,67 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Tại thời điểm 90 và 120 ngày sau ghép, giai đoạn này vết ghép đã bắt đầu tiếp hợp tốt. Có thể nhận thấy mức độ tiếp hợp của vết ghép chi phối mạnh đến sinh trưởng chiều cao chồi. Ở cả hai thời điểm theo dõi đều cho kết quả các tổ hợp ghép trên gốc HUIB_PH30 có sự sinh trưởng chiều cao chồi tốt nhất, đạt trung bình là 18,3 cm (90 ngày) và 24,53 cm (120 ngày). Các tổ hợp ghép với ngọn ghép Vĩnh Linh sinh trưởng chiều cao chồi tốt nhất lần lượt đạt 19,98 cm (90 ngày) và 26,2 cm (120 ngày). Có sự tương tác giữa gốc ghép và ngọn ghép đến sinh trưởng chiều cao chồi.

Tăng trưởng chiều cao chồi chịu sự tương tác của gốc ghép và ngọn ghép vì vậy vết ghép tiếp hợp tốt sẽ giúp chiều cao chồi tăng trưởng tốt hơn. Điều này

chúng tỏ giai đoạn sau ghép 30 ngày đến 60 ngày các vết ghép còn rất mới. Sự phát triển của chồi ghép chủ yếu là do sức bật có sẵn của ngọn ghép vì vậy ngọn Sri Lanka rất to và khỏe nên sinh trưởng vượt trội, trong khi ngọn Lộc Ninh là dây thân nên khả năng bật chồi chậm hơn dẫn đến chiều cao chồi thấp. Giai đoạn sau ghép 60 ngày đến 120 ngày, các vết ghép đã bắt đầu tiếp hợp tốt, lúc này thấy rõ rằng những ngọn ghép có kích thước tương đồng với gốc ghép sẽ có lợi thế hơn, sinh trưởng tốt hơn (Bảng 3.21).

Bảng 3.21. Tăng trưởng chiều cao chồi của các tổ hợp ghép

Nội dung	Tăng trưởng chiều cao chồi của các tổ hợp ghép (cm)					
	Gốc ghép	Ngọn ghép				TB (A)
		Vĩnh Linh	Lộc Ninh	Sri Lanka	Ấn Độ	
Sau ghép 30 ngày	HUIB_PD36	4,16 ^b	3,40 ^c	6,21 ^a	3,56 ^c	4,33
	HUIB_PH30	4,20 ^b	3,41 ^c	5,76 ^a	3,34 ^c	4,18
	HUIB_PH46	3,50 ^c	3,50 ^c	6,14 ^a	3,10 ^c	4,06
	TB (B)	3,95B	3,44C	6,04A	3,33C	
	CV(%) = 7,01; F_A=2,52^{ns}; F_B = 166,07^{**}; F_{A*B} = 2,28^{ns}; F_{AB} = 46,99^{**}					
Sau ghép 60 ngày	HUIB_PD36	11,00 ^{bcd}	10,28 ^{cde}	11,39 ^{bc}	9,56 ^e	10,56B
	HUIB_PH30	10,83 ^{bcd}	10,89 ^{bcd}	13,17 ^a	11,67 ^b	11,64A
	HUIB_PH46	11,72 ^b	10,17 ^{cde}	9,89 ^{de}	11,00 ^{bcd}	10,69B
	TB (B)	11,19AB	10,44C	11,48A	10,74BC	
	CV(%) = 6,24; F_A=8,93[*]; F_B = 4,08[*]; F_{A*B} = 6,09[*]; F_{AB} = 6,05[*]					
Sau ghép 90 ngày	HUIB_PD36	19,11 ^{ab}	16,28 ^{cd}	16,50 ^c	16,50 ^c	17,10B
	HUIB_PH30	18,94 ^{ab}	16,00 ^{cd}	17,94 ^b	19,22 ^a	18,03A
	HUIB_PH46	18,89 ^{ab}	15,67 ^{cd}	15,30 ^d	18,44 ^{ab}	17,08B
	TB (B)	18,98A	15,98C	16,58C	18,06B	
	CV(%) = 3,62; F_A=8,92[*]; F_B = 42,39^{**}; F_{A*B} = 6,65[*]; F_{AB} = 16,81^{**}					
Sau ghép 120 ngày	HUIB_PD36	26,83 ^a	21,83 ^d	20,83 ^{de}	23,94 ^c	23,36B
	HUIB_PH30	25,83 ^{ab}	21,61 ^d	23,67 ^c	26,99 ^a	24,53A
	HUIB_PH46	25,94 ^{ab}	20,17 ^e	19,78 ^e	25,50 ^b	22,85B
	TB (B)	26,20A	21,20C	21,43C	25,48B	
	CV(%) = 2,84; F_A=19,75^{**}; F_B = 138,95^{**}; F_{A*B} = 10,09^{**}; F_{AB} = 46,99^{**}					

Tại thời điểm 30 ngày sau ghép, vết ghép bắt đầu tiếp hợp, chồi ghép bắt đầu phát triển và xuất hiện những lá đầu tiên. Giai đoạn này số lá của các tổ hợp ghép còn rất ít và chưa ổn định dao động từ 0,33 – 1,11 lá.

Tại thời điểm sau ghép 60 - 120 ngày, sinh trưởng số lá của các tổ hợp ghép bắt đầu ổn định. Nhận thấy rằng, số lá của các tổ hợp ghép phụ thuộc vào loại ngọn ghép, trong đó các tổ hợp ghép với ngọn ghép Vĩnh Linh và Ấn Độ có số lá nhiều hơn hẳn hai loại ngọn ghép còn lại, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Tác động của yếu tố loại gốc ghép đến sinh trưởng số lượng lá của chồi ghép là tương đương nhau.

Sau ghép 60 ngày, số lá của các tổ hợp ghép là tương đương nhau, không có sự khác biệt về mặt thống kê, dao động từ 2,22 lá – 2,78 lá. Tổ hợp ghép HUIB_PH30- Sri Lanka có số lá ít nhất và tổ hợp ghép HUIB_PD36 – Vĩnh Linh có số lá nhiều nhất.

Tại thời điểm từ sau ghép 90 - 120 ngày, đã có sự tương tác của loại gốc ghép và ngọn ghép đến sinh trưởng số lá của các tổ hợp ghép. Tại thời điểm 90 ngày sau ghép, số lá của các tổ hợp ghép có sự chênh lệch khá rõ ràng, dao động từ 2,67 lá – 4,22 lá. Tổ hợp ghép HUIB_PH46 – Lộc Ninh có số lá ít nhất và tổ hợp ghép HUIB_PH30 – Vĩnh Linh có số lá nhiều nhất. Thời điểm 120 ngày sau ghép, sự chênh lệch số lá của các tổ hợp ghép thể hiện rất rõ và khác biệt rất có ý nghĩa, dao động từ 3,22 lá – 5,56 lá. Hai tổ hợp ghép HUIB_PH46 – Lộc Ninh và HUIB_PD36 – Sri Lanka có số lá ít nhất; Tổ hợp ghép HUIB_PH30 – Vĩnh Linh vẫn là tổ hợp có số lá nhiều nhất (Bảng 3.22).

Bảng 3.22. Tăng trưởng số lá của các tổ hợp ghép

Nội dung	Tăng trưởng số lá của các tổ hợp ghép (lá)					
	Gốc ghép	Ngọn ghép				TB (A)
		Vĩnh Linh	Lộc Ninh	Sri Lanka	Ấn Độ	
Sau ghép 30 ngày	HUIB_PD36	0,89	0,33	0,78	0,56	0,64
	HUIB_PH30	1,11	0,78	0,56	0,78	0,81
	HUIB_PH46	0,78	0,33	0,78	0,78	0,67
	TB (B)	0,93	0,48	0,70	0,70	
Sau ghép 60 ngày	HUIB_PD36	2,78	2,22	2,56	2,56	2,53
	HUIB_PH30	2,67	2,44	2,11	2,56	2,44
	HUIB_PH46	2,56	2,22	2,33	2,67	2,44
	TB	2,67A	2,30B	2,33B	2,59A	
	CV(%) = 9,93; F_A=0,47^{ns}; F_B =5,18[*]; F_{A*B} = 1,22^{ns}; F_{AB} = 2,16^{ns}					
Sau ghép 90 ngày	HUIB_PD36	3,89 ^{ab}	3,22 ^{cd}	2,78 ^{de}	3,67 ^{bc}	3,39
	HUIB_PH30	4,22 ^a	3,22 ^{cd}	2,89 ^{de}	3,89 ^{ab}	3,56
	HUIB_PH46	4,11 ^{ab}	2,67 ^e	3,11 ^{de}	3,89 ^{ab}	3,44
	TB (B)	4,07A	3,04B	2,93B	3,81A	
	CV(%) = 8,41; F_A=1,02^{ns}; F_B =34,22^{**}; F_{A*B} = 1,73^{ns}; F_{AB} = 10,46^{**}					
Sau ghép 120 ngày	HUIB_PD36	5,56 ^a	3,89 ^b	3,22 ^c	5,00 ^a	4,42
	HUIB_PH30	5,44 ^a	3,78 ^{bc}	3,89 ^b	5,44 ^a	4,64
	HUIB_PH46	5,00 ^a	3,22 ^c	3,78 ^{bc}	5,22 ^a	4,31
	TB (B)	5,33A	3,63B	3,63B	5,22A	
	CV(%) = 7,23; F_A=3,32^{ns}; F_B =78,81^{**}; F_{A*B} = 2,68[*]; F_{AB} = 23,56^{**}					

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức P < 0,05.

** Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P < 0,05.*

*** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức P < 0,01.*

Có thể nhận thấy, tăng trưởng số lượng lá của các tổ hợp ghép có mối quan hệ tỷ lệ thuận với tăng trưởng chiều cao chồi của các tổ hợp ghép. Sự phát triển này chịu ảnh hưởng rất lớn từ khả năng tiếp hợp của vết ghép. Giai đoạn đầu cho đến 60

ngày sau ghép các vết ghép còn rất mới sự phát triển của chồi ghép chủ yếu là do sức bật có sẵn của ngọn ghép. Giai đoạn sau ghép 60 ngày đến 120 ngày, các vết ghép đã bắt đầu tiếp hợp tốt, lúc này thấy rõ sinh trưởng của các tổ hợp ghép có sự khác biệt rất lớn. Điều này đã phản ánh phần nào mối tương quan giữa loại gốc ghép và ngọn ghép.

→ Như vậy, ngọn ghép Lộc Ninh tỏ ra không tương thích với cả 3 gốc ghép nên có tỷ lệ sống sau ghép thấp hơn hẳn. Ngọn ghép Vĩnh Linh có khả năng tương thích tốt nhất với tỷ lệ sống rất cao và tốc độ tăng trưởng chiều cao và số lượng lá của chồi ghép tốt nhất. Gốc ghép HUIB_PH30 tương thích tốt với cả 3 loại ngọn ghép Vĩnh Linh, Sri Lanka và Ấn Độ với tỷ lệ sống và sinh trưởng chiều cao, số lá của chồi khá tốt.

Đánh giá khả năng tiếp hợp bằng vi phẫu

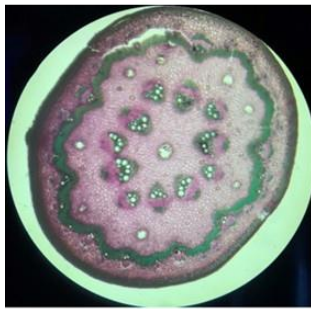
Cấu tạo giải phẫu của các vật liệu dùng làm gốc ghép và ngọn ghép khá đồng nhất về các lớp mô từ ngoài vào trong, đặc trưng cho loài. Lát cắt ngang qua thân có tiết diện bầu dục hoặc gần tròn. Biểu bì gồm một lớp tế bào hình đa giác, đều nhau, lớp cutin dày có u lồi. Trên lớp biểu bì thì thoáng có các lông tiết ngăn chặn đơn bào đầu đơn bào, hiếm khi có lỗ khí, rải rác có lỗ vỏ.

Ở phần thân non thấy rõ mô dày góc hoặc mô dày tròn (hồng đậm) nằm ngay dưới lớp biểu bì gồm 2 - 4 lớp tế bào hình đa giác, kích thước không đều, xếp lộn xộn.

Vùng vỏ có lớp mô cứng (màu xanh) thì thoáng gián đoạn với các tế bào hình đa giác thấy rõ ở những phần thân đã trưởng thành giúp thân cây cứng rắn hơn, thân càng già thì lớp này càng dày, đầu tiên xuất hiện những tế bào riêng lẻ, rồi dần dần phát triển thành một vòng mô cứng rõ rệt nằm phía trong các bó mạch ở vòng ngoài.

Mô mềm vỏ (màu hồng) với các tế bào hình bầu dục hoặc gần tròn, kích thước không đều, càng vào trong tế bào càng to dần.

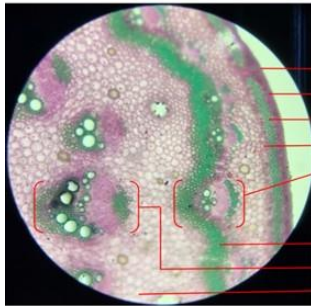
Lớp vỏ trụ dễ thấy ở những phần thân còn non, có khoảng 3 lớp tế bào hình đa giác, kích thước không đều, hóa mô cứng thành các cụm trên các bó mạch;



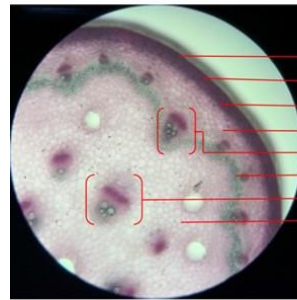
A



B



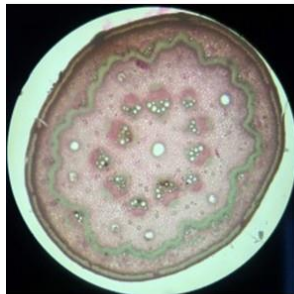
- Biểu bì
- Mô dày
- Mô cứng
- Mô mềm vỏ
- Bó mạch vòng ngoài
- Lớp mô cứng lượn sóng
- Bó mạch vòng trong
- Mô mềm tủy



- Biểu bì
- Mô dày
- Mô cứng
- Mô mềm vỏ
- Bó mạch vòng ngoài
- Lớp mô cứng lượn sóng
- Bó mạch vòng trong
- Mô mềm tủy

Tiêu bản ngọn ghép giống Vinh Linh

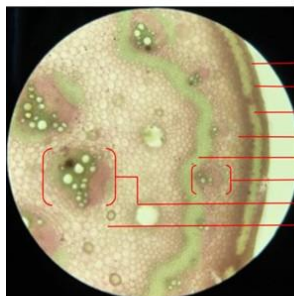
Tiêu bản ngọn ghép M2- giống Lộc Ninh



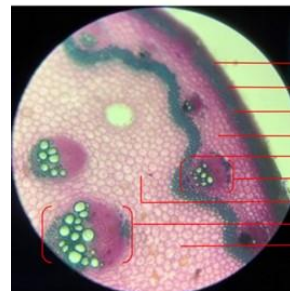
C



D



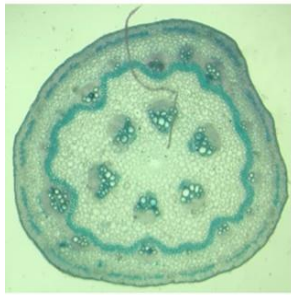
- Biểu bì
- Mô dày
- Mô cứng
- Mô mềm vỏ
- Lớp mô cứng lượn sóng
- Bó mạch vòng ngoài
- Bó mạch vòng trong
- Mô mềm tủy



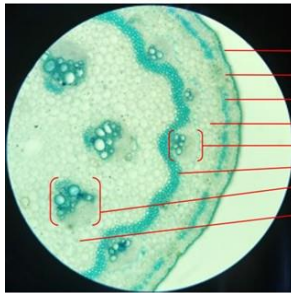
- Biểu bì
- Mô dày
- Mô cứng
- Mô mềm vỏ
- Lớp mô cứng lượn sóng
- Bó mạch vòng ngoài
- Bó mạch vòng trong
- Mô mềm tủy

Tiêu bản ngọn ghép M3- giống Srilanka

Tiêu bản ngọn ghép M4- giống Ấn Độ

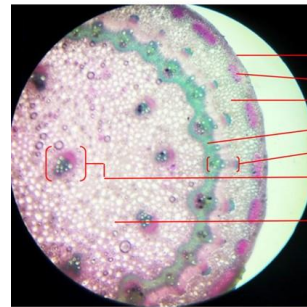


E



Biểu bì
Mô dày
Mô cứng
Mô mềm vỏ
Bó mạch vòng ngoài
Lớp mô cứng lượn sóng
Bó mạch vòng trong
Mô mềm tủy

Gốc cây M5 HUIB_PH30



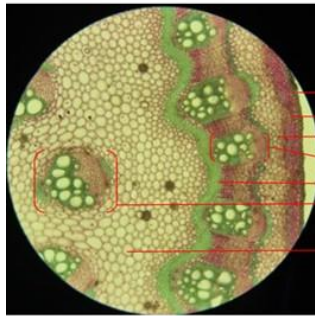
F

Biểu bì
Mô dày
Mô mềm vỏ
Lớp mô cứng lượn sóng
Bó mạch vòng ngoài
Bó mạch vòng trong
Mô mềm tủy

Gốc cây M1 HUIB_PD36



G



Biểu bì
Mô dày
Mô mềm vỏ
Bó mạch vòng ngoài
Lớp mô cứng lượn sóng
Bó mạch vòng trong
Mô mềm tủy

Gốc cây M9 HUIB_PH46

Hình 3.27. Vi phẫu của ngọn ghép Vĩnh Linh (A), Lộc Ninh (B), Sir Lanka (C), Ấn Độ (D) và gốc ghép HUIB_PH30 (E), HUIB_PD36 (F), HUIB_PH46 (G)

Hệ thống mạch dẫn xếp thành 2 vòng rõ rệt, các bó dẫn kiểu bó mạch chông chất với mô phloem (mô libe) nằm ngoài, mô xylem (mô gỗ) nằm trong, ở giữa là tượng tầng hay còn gọi là tầng phát sinh. Ở thân già, lớp tượng tầng giữa các bó mạch tạo nhiều dây tế bào mới, những tế bào bên trong vách tầng chất gỗ tạo thành mô xylem thứ cấp, bên ngoài tế bào vách bằng cellulose phân hóa thành mô phloem

thứ cấp. Thân càng già thì các bó mạch càng kéo dài nhờ hoạt động của tương tầng. Phía trong của vòng mô dẫn bên ngoài có vòng mô cứng (màu xanh sau nhuộm) uôn lượn nối liền các bó mạch dẫn với nhau gồm các tế bào hình đa giác, vách dày (Hình 3.27).

Sau khi ghép 2 tháng, mức độ tiếp hợp của các tổ hợp ghép là khác nhau:

Gốc ghép HUIB_PD36 – ngọn ghép Vĩnh Linh: Có sự tiếp hợp khá tốt ở cả miền vỏ và miền trụ dẫn. Tuy đường kính của phần chồi ghép nhỏ hơn phần gốc ghép nhưng vẫn có sự tiếp hợp khá tốt ở những phần mô tiếp xúc.

- Góc ghép HUIB_PD36 – ngọn ghép Lộc Ninh: Có sự tiếp hợp nơi vết cắt nhưng không được hoàn toàn. Có dải tế bào chết (màu nâu) hình thành từ ngoài vào trong vết ghép tạo thành lớp ngăn cách giữa các mô của chồi ghép và gốc ghép. Tuy nhiên các tế bào chết (màu nâu) lại vẫn có sự xen lẫn với các tế bào sống được hình thành để nối liền mỗi ghép nên vết ghép vẫn dính liền không bị tách rời.

Gốc ghép HUIB_PD36 – ngọn ghép Sir Lanka: Nhìn chung ở lát cắt có thể thấy đường kính chồi ghép và gốc ghép khác biệt nhiều dẫn đến sự tương thích vị trí giữa các mô không cao. Hai lát cắt ở 2 vị trí ghép cho thấy 2 tình trạng khác nhau. Hình trên là phần trên của đoạn ghép, mỗi ghép bị hở và lớp tế bào chết hình thành ngăn cách các lớp mô giữa chồi ghép và gốc ghép. Ở phần dưới của đoạn ghép, các mô ghép được nối liền mạch, tuy có một lớp mỏng tế bào tối màu ngăn cách nhưng các tế bào mới được hình thành nhiều và mạnh giúp nối liền giữa hai bên.

Gốc ghép HUIB_PD36 – ngọn ghép Ấn Độ: Có sự tiếp hợp khá tốt ở cả miền vỏ, miền trụ dẫn và ở những phần mô tiếp xúc.

Gốc ghép HUIB_PH30 – ngọn ghép Vĩnh Linh: Có sự tiếp hợp khá tốt ở cả miền vỏ và miền trụ dẫn. Đã thấy nhiều tế bào mới được hình thành để nối liền thân của hai phần chồi và gốc ghép.

Gốc ghép HUIB_PH30 – ngọn ghép Lộc Ninh: Sự tiếp hợp nơi vết cắt rất kém, chỉ có một phần mô mềm tủy có sự nối liền mô mềm của chồi ghép với mô mềm của ghép. Có một dải tế bào chết dày hình thành từ ngoài vào trong vết ghép tạo thành lớp ngăn cách nên phần mô của chồi ghép rất dễ bị tách hẳn ra khỏi gốc ghép.

Gốc ghép HUIB_ PH30 – ngọn ghép Sir Lanka: Có sự tiếp hợp khá tốt ở cả miền vỏ và miền trụ dẫn. Có một số tế bào chết rải rác nơi mặt tiếp xúc. Thấy tế bào mới hình thành ở vết ghép chưa nhiều, có thể do thời gian ghép chưa lâu.

Gốc ghép HUIB_ PH30 – ngọn ghép Ấn Độ: Có sự tiếp hợp khá tốt ở cả miền vỏ và miền trụ dẫn.

Gốc ghép HUIB_ PH46 – ngọn ghép Vĩnh Linh: Sự tiếp hợp nơi vết cắt kém, chỉ khoảng 2/3 mô mềm tùy có sự nối liền mô mềm của chồi ghép với mô mềm của gốc ghép. Có một dải tế bào chết (màu nâu) hình thành từ ngoài vào trong vết ghép tạo thành lớp ngăn cách giữa các mô của chồi ghép và gốc ghép.

Gốc ghép HUIB_ PH46 – ngọn ghép Lộc Ninh: Sự tiếp hợp nơi vết cắt kém, chỉ khoảng 2/3 mô mềm tùy có sự nối liền mô mềm của chồi ghép với mô mềm của gốc ghép. Có dải tế bào chết (màu nâu) hình thành từ ngoài vào trong vết ghép tạo thành lớp ngăn cách giữa các mô của chồi ghép và gốc ghép

Gốc ghép HUIB_ PH46 - ngọn ghép Sir Lanka: Có sự tiếp hợp ở vết ghép, số tế bào mới hình thành nhiều nhưng sự gắn kết mô giữa gốc ghép, chồi ghép chưa thật sự tốt.

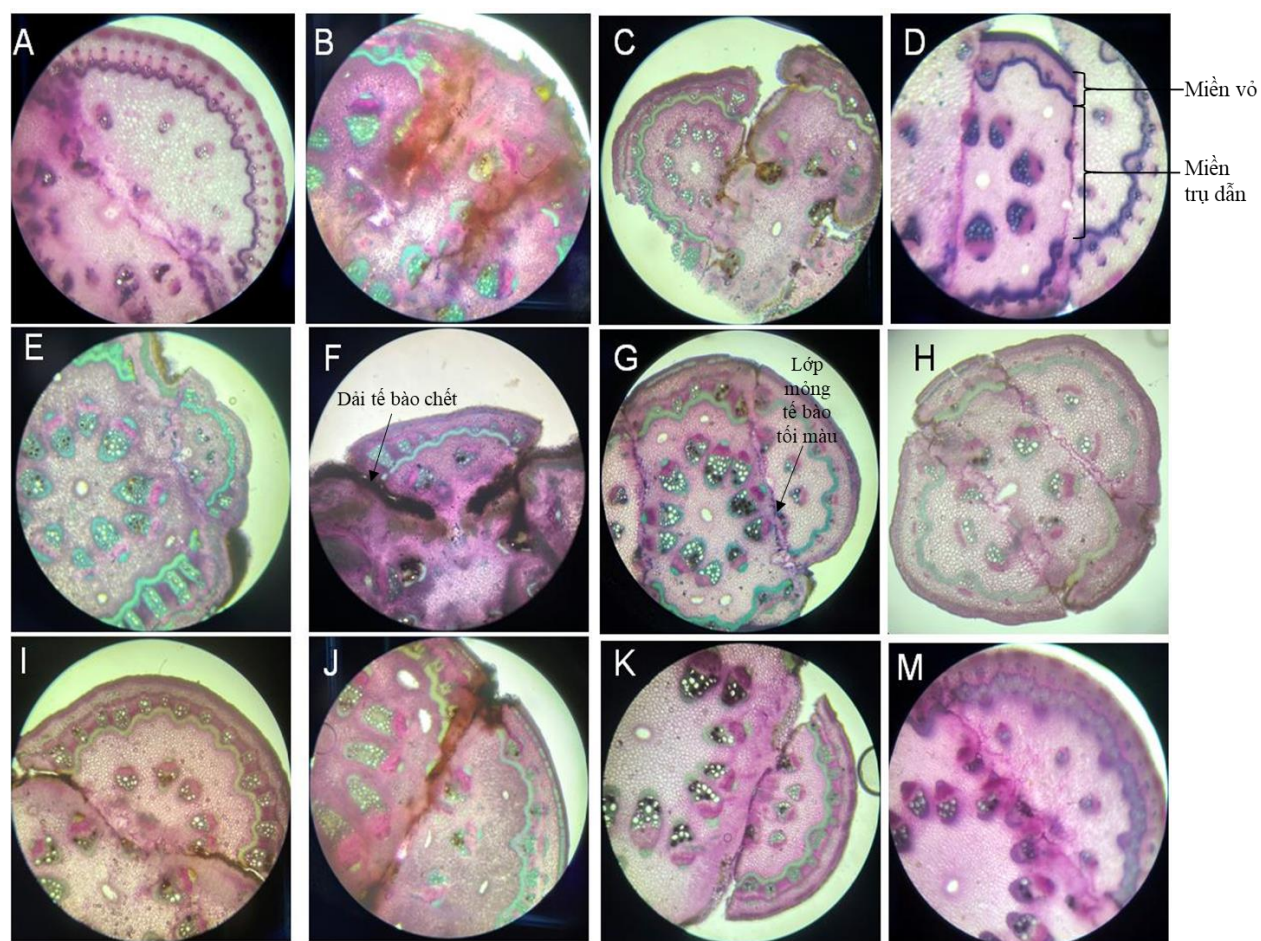
Gốc ghép HUIB_ PH46 – ngọn ghép Ấn Độ: Có sự tiếp hợp khá tốt ở cả miền vỏ và miền trụ dẫn. Phần ngọn ghép và gốc ghép trong cây ghép được giao có kích thước phù hợp nhau nên các mô tiếp hợp khá tốt, lớp tế bào do tầng phát sinh tạo ra dày, tiếp dẫn giữa hai bên (Hình 3.28).

Như vậy, 3 loại gốc ghép không cùng loài đã ảnh hưởng đến khả năng tiếp hợp giữa gốc ghép và ngọn ghép. Tổ hợp có gốc HUIB_ PH30 có vết ghép liền mạch, tiếp hợp tốt nhất, hình ảnh giải phẫu cũng cho thấy cấu tạo của vật liệu này khá tương đồng với các vật liệu là ngọn ghép. Tiếp đến là các tổ hợp ghép trên gốc HUIB_ PD36. Các tổ hợp ghép trên gốc HUIB_ PH46 có sự tiếp hợp kém nhất.

Một số kết quả nghiên cứu về khả năng tiếp hợp và sinh trưởng của cây ghép cho thấy khả năng tiếp hợp phụ thuộc rất nhiều vào sự tương đồng trong cấu tạo giải phẫu. Các kết quả của Nguyễn Trần Quyên, 2020; Nguyễn Quang Ngọc, 2021 cho thấy tổ hợp ghép HUIB_ PD36 - Vĩnh Linh có sự tiếp hợp rất tốt và sinh trưởng tốt

trong giai đoạn vườn ươm, tuy nhiên khi khảo nghiệm ngoài đồng ruộng lại yêu cầu độ ẩm cao với chu kỳ tưới 7 ngày/lần.

Một số nghiên cứu trên thế giới sử dụng các dòng/giống tiêu hoang đại ghép với các dòng/giống thương mại cũng cho thấy đa phần đều có khả năng tiếp hợp rất tốt trong giai đoạn vườn ươm. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên đồng ruộng lại cho thấy vết ghép đã ảnh hưởng đến tuổi thọ của cây ghép. Mathew và Rema (2000) cho rằng cây ghép trên gốc *Piper colubrinum* cho năng suất tốt nhưng tuổi thọ chỉ được khoảng 9 năm. Trong khi Paulus, 2005 kết luận rằng *Piper colubrinum* ghép với các dòng/giống tiêu thương mại của Malaysia không cho kết quả tiếp hợp tốt và tuổi thọ chỉ đạt khoảng 4 năm.



Hình 3.28. Khả năng tiếp hợp của vật liệu gốc ghép HUIB_PH30, HUIB_PD36, HUIB_PH46 với các ngọn ghép Vĩnh Linh (A), Lộc Ninh (B), Sri Lanka (C), Ấn Độ (D)

Trong đó: A: Tổ hợp ghép HUIB_PH30 - Vĩnh Linh
B: Tổ hợp ghép HUIB_PH30 - Lộc Ninh
C: Tổ hợp ghép HUIB_PH30 - Sri Lanka
D: Tổ hợp ghép HUIB_PH30 - Ấn Độ
E: Tổ hợp ghép HUIB_PD6 - Vĩnh Linh
F: Tổ hợp ghép HUIB_PD36 - Lộc Ninh
G: Tổ hợp ghép HUIB_PD36 - Sri Lanka
H: Tổ hợp ghép HUIB_PD36 - Ấn Độ
I: Tổ hợp ghép HUIB_PH46 - Vĩnh Linh
J: Tổ hợp ghép HUIB_PH46 - Lộc Ninh
K: Tổ hợp ghép HUIB_PH46 - Sri Lanka
M: Tổ hợp ghép HUIB_PH46 - Ấn Độ

Kết quả giải phẫu cũng chỉ ra rằng sự không tương đồng về kích thước của gốc ghép và ngọn ghép có ảnh hưởng lớn tỷ lệ sống và sinh trưởng của tổ hợp ghép. Ngọn ghép Vĩnh Linh có sự tiếp hợp tốt nhất với các loại gốc ghép, tiếp theo là ngọn ghép Ấn Độ. Ngọn ghép Sri Lanka có kích thước khá lớn nên khả năng tiếp hợp bị hạn chế. Trong khi đó ngọn ghép Lộc Ninh có sự tiếp hợp không hoàn toàn, có sự hình thành tế bào chết nhiều, điều này có thể là do ngọn ghép là dây thân nên sẽ có đường kính lớn và bị già.

3.5.3. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các tổ hợp ghép hồ tiêu

Sinh trưởng của các tổ hợp ghép trong điều kiện nhiễm tuyến trùng

Chiều cao chồi của các tổ hợp ghép trước khi lây nhiễm là tương đương nhau, dao động từ 10,39 - 12,72 cm.

Giai đoạn sau lây nhiễm từ 30 - 120 ngày, 02 tổ hợp ghép với ngọn ghép Vĩnh Linh là HUIB_PH30 - VL; HUIB_PD36 - VL sinh trưởng chiều cao chồi tốt hơn các tổ hợp ghép còn lại, khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Các tổ hợp ghép có tốc độ tăng trưởng chiều cao chồi rất khác nhau. Tổ hợp ghép HUIB_PH30 – VL có tốc độ tăng trưởng chiều cao chồi tốt nhất (11,03 cm/30 ngày), tiếp đến là HUIB_PD36 - Vĩnh Linh (8,79 cm/30 ngày) và HUIB_PH30 - AD đều đạt 7,46 cm/30 ngày. Tổ hợp ghép HUIB_PH30 - LN có tốc độ tăng trưởng chiều cao chồi thấp nhất 5,00 cm/30 ngày (Bảng 3.23).

Bảng 3.23. Sinh trưởng chiều cao chồi của các tổ hợp ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng *M.incognita*

Ký hiệu vật liệu	Sinh trưởng chiều cao chồi ghép (cm)					Tốc độ tăng trưởng (cm/30 ngày)
	Trước khi lây nhiễm	Sau lây nhiễm 30 ngày	Sau lây nhiễm 60 ngày	Sau lây nhiễm 90 ngày	Sau lây nhiễm 120 ngày	
HUIB_PD36 - VL	11,94	16,83 ^{bc}	28,67 ^b	36,72 ^a	47,12 ^b	8,79 ^b
HUIB_PD36 - LN	11,94	14,83 ^{cd}	21,72 ^b	28,67 ^{bc}	34,61 ^e	5,67 ^e
HUIB_PD36 - SR	12,72	16,00 ^{bc}	23,00 ^b	27,67 ^{bc}	35,56 ^{de}	5,71 ^e
HUIB_PD36 - AD	11,17	15,28 ^{bcd}	24,06 ^b	28,61 ^{bc}	37,11 ^d	6,49 ^d
HUIB_PH30 - VL	11,22	20,56 ^a	32,17 ^a	39,22 ^a	55,33 ^a	11,03 ^a
HUIB_PH30 - LN	10,39	13,22 ^d	18,89 ^d	24,50 ^d	30,39 ^f	5,00 ^f
HUIB_PH30 - SR	11,83	17,44 ^b	22,44 ^b	27,00 ^{cd}	34,33 ^e	5,63 ^e
HUIB_PH30 - AD	11,39	16,83 ^{bc}	22,56 ^b	30,44 ^b	41,22 ^c	7,46 ^c
CV%	7,58	7,98	6,11	5,32	3,39	3,56
F	ns	**	**	**	**	**

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

(VL: Vĩnh Linh; LN: Lộc Ninh; SR: Sri Lanka; AD: Ấn Độ)

Trước khi lây nhiễm các tổ hợp ghép có số lá dao động từ 23,11 - 3,44 lá. Tại thời điểm sau lây nhiễm 30 ngày các tổ hợp ghép có số lá tương đương nhau và không có sự khác biệt về mặt thống kê.

Sau 60 ngày, sinh trưởng số lá của các tổ hợp ghép đã có sự khác biệt, dao động từ 4,56 - 5,89 lá. Tổ hợp ghép HUIB_PD36 - VL có số lá cao nhất và thấp nhất là HUIB_PH30 - SR.

Sau lây nhiễm 90 ngày, sinh trưởng số lá của các tổ hợp ghép có sự khác biệt nhau rất rõ ràng. Hai tổ hợp ghép HUIB_PD36 - VL và HUIB_PH30 - VL có số lá nhiều nhất lần lượt là 7,22 lá và 7,44 lá. 02 tổ hợp ghép với ngọn ghép Sri Lanka có số lá ít nhất HUIB_PD36 - SR (5,67 lá) và HUIB_PH30 - SR (5,44 lá).

Tại thời điểm 120 ngày sau khi lây nhiễm, số lá của các tổ hợp ghép khác biệt rất rõ ràng về mặt thống kê. Tổ hợp ghép HUIB_PD36 - VL; HUIB_PH30 - VL và HUIB_PH30 - AD là 3 tổ hợp ghép có số lá nhiều nhất. Các tổ hợp ghép với ngọn ghép Sri Lanka tỏ ra sinh trưởng yếu hơn, số lá thấp hơn hẳn so với các tổ hợp ghép có ngọn ghép khác.

Tốc độ tăng trưởng số lá của tổ hợp ghép HUIB_PH30 - VL là tốt nhất đạt 1,44 lá/tháng, tiếp đến là tổ hợp ghép HUIB_PH30 - AD (1,22 lá/30 ngày), HUIB_PH30 - VL (1,17 lá/30 ngày). Các tổ hợp ghép còn lại có tốc độ tăng trưởng số lá khá chậm chỉ đạt trung bình từ 0,75 - 0,86 lá/30 ngày (Bảng 3.24).

Bảng 3.24. Khả năng ra lá của các tổ hợp ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita*

Ký hiệu vật liệu	Sinh trưởng số lá của chồi ghép (lá)					Tốc độ ra lá (lá/30 ngày)
	Trước khi lây nhiễm	Sau lây nhiễm 30 ngày	Sau lây nhiễm 60 ngày	Sau lây nhiễm 90 ngày	Sau lây nhiễm 120 ngày	
HUIB_PD36 - VL	3,44	4,44	5,89 ^a	7,22 ^{ab}	8,11 ^b	1,17 ^b
HUIB_PD36 - LN	3,33	4,33	5,44 ^{ab}	6,11 ^{cde}	6,78 ^c	0,86 ^{cd}
HUIB_PD36 - SR	3,22	3,78	4,67 ^b	5,67 ^{de}	6,44 ^c	0,81 ^{cd}
HUIB_PD36 - AD	3,11	3,89	4,78 ^b	6,67 ^{bc}	8,00 ^b	1,22 ^b
HUIB_PH30 - VL	3,44	4,33	5,44 ^{ab}	7,44 ^a	9,22 ^a	1,44 ^a
HUIB_PH30 - LN	3,22	4,11	5,33 ^{ab}	6,22 ^{cde}	6,89 ^c	0,92 ^c
HUIB_PH30 - SR	3,33	3,67	4,56 ^b	5,44 ^d	6,33 ^c	0,75 ^d
HUIB_PH30 - AD	3,33	4,00	5,44 ^{ab}	6,44 ^{cd}	8,22 ^b	1,22 ^b
CV%	7,04	7,44	9,30	6,48	4,26	7,11
F	ns	ns	*	**	**	**

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$. * Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$, ** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

(VL: Vĩnh Linh; LN: Lộc Ninh; SR: Sri Lanka; AD: Ấn Độ)

Khả năng kháng tuyến trùng của các tổ hợp ghép

Bảng 3.25. Mật độ tuyến trùng *M. incognita* và tỷ lệ rễ bị nốt sùng của các tổ hợp ghép

STT	Ký hiệu tổ hợp ghép	Mật độ tuyến trùng		Tỷ lệ rễ bị u sùng (%)
		Trong đất (con/100 g đất)	Trong rễ (con/5 g rễ)	
1	HUIB_PD36 - VL	0,0	0,0	0,0
2	HUIB_PD36 - LN	0,0	0,0	0,0
3	HUIB_PD36 - SR	0,0	0,0	0,0
4	HUIB_PD36 - AD	0,0	0,0	0,0
5	HUIB_PH30 - VL	0,0	0,0	0,0
6	HUIB_PH30 - LN	0,0	0,0	0,0
7	HUIB_PH30 - SR	0,0	0,0	0,0
8	HUIB_PH30 - AD	0,0	0,0	0,0

Chú thích: VL: Vĩnh Linh; LN: Lộc Ninh; SR: Sri Lanka; AD: Ấn Độ

Bảng 3.26. Tỷ lệ vàng lá của các tổ hợp ghép sau khi lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita*

Ký hiệu vật liệu	Tỷ lệ vàng lá (%)				Chỉ số hại (%)	Mức kháng
	Sau lây nhiễm 30 ngày	Sau lây nhiễm 60 ngày	Sau lây nhiễm 90 ngày	Sau lây nhiễm 120 ngày		
HUIB_PD36 - VL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/5
HUIB_PD36 - LN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/5
HUIB_PD36 - SR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/5
HUIB_PD36 - AD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/5
HUIB_PH30 - VL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/5
HUIB_PH30 - LN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/5
HUIB_PH30 - SR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/5
HUIB_PH30 - AD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5/5

Chú thích: VL: Vĩnh Linh; LN: Lộc Ninh; SR: Sri Lanka; AD: Ấn Độ

Kết quả theo dõi mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong đất, rễ và tỷ lệ rễ bị nốt sùng cho thấy không xuất hiện tuyến trùng *M. incognita* gây hại trong đất và

trong rễ vì vậy cũng không có rễ bị nốt sùng trên tất cả các tổ hợp ghép. Tỷ lệ rễ bị nốt sùng là 0% ở tất cả các tổ hợp ghép được lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita*. Điều này chứng tỏ các tổ hợp ghép có khả năng kháng tuyến trùng rất tốt (Bảng 3.25).

Không xuất hiện tuyến trùng *M. incognita* gây hại trong đất và trong rễ, rễ cũng không có dấu hiệu bị nốt sùng trên tất cả các tổ hợp ghép. Do vậy mà không xuất hiện vàng lá do tuyến trùng *M. incognita* gây hại (Bảng 3.26). Điều này chứng tỏ tuyến trùng đã không ảnh hưởng đến sinh trưởng của các tổ hợp ghép bởi vì 02 loại gốc ghép được chọn lọc có khả năng kháng rất cao với tuyến trùng.

3.6. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY GHÉP HỒ TIÊU KHÁNG TUYẾN TRÙNG TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ MÀNG

Động thái tăng trưởng chiều cao

Sau 30 ngày trồng ở nhà màng, sự tăng trưởng chiều cao cây của các tổ hợp ghép là khác nhau, cao nhất là tổ hợp ghép M1 36 - VL (21.10 cm), thấp nhất là tổ hợp ghép M4 36 - AD (0.00 cm). Ở giai đoạn sau 60 - 90 ngày trồng, tốc độ tăng trưởng chiều cao ở 2 tổ hợp ghép M1 36 - VL và M5 30 - VL là lớn nhất. Trong khi ở giai đoạn 120 ngày, sự tăng trưởng vượt trội này là ở 3 tổ hợp ghép M5 30 - VL, M3 36 - SR và M1 36 - VL (Bảng 3.27).

Kết quả này là khá tương đồng với kết quả đánh giá sự tăng trưởng chiều cao ban đầu của các tổ hợp ghép trong nghiên cứu của chúng tôi. Cụ thể là, hai tổ hợp ghép M5 30 - VL, M1 36 - VL có sự tăng trưởng chiều cao lớn nhất (Bảng 3.27). Điều này có thể được giải thích dựa trên sự tiếp hợp tốt giữa hai gốc ghép HUIB_PH30, HUIB_PD36 và ngọn ghép Vĩnh Linh. Từ đó, nước và các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển của cây tiêu được dẫn truyền từ dưới lên một cách dễ dàng. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Mai và cộng sự (2022) cho thấy sự gia tăng chiều cao của các cây hồ tiêu sau 20 tuần trồng ra đất là từ 7,96 - 17,60 cm. Kết quả này là gần giống với sự tăng chiều cao sau 30 ngày trồng ngoài nhà màng (tương đương với tổ hợp ghép 20 tuần tuổi) của một số tổ hợp ghép ưu việt như M5 30 - VL, M3 36 - SR và M1 36 - VL. Do đó, có thể nói rằng 3 tổ hợp ghép

này có sự sinh trưởng về chiều cao là khá giống như một cây tiêu được nhân giống truyền thống.

Bảng 3.27. Động thái tăng trưởng chiều cao của các tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng

STT	Tổ hợp ghép	Tăng trưởng chiều cao cây (cm)			
		Sau 30 ngày	Sau 60 ngày	Sau 90 ngày	Sau 120 ngày
1	M7 30-SR	0,18 ^e	2,54 ^{de}	12,78 ^e	27,88 ^d
2	M6 30-LN	1,64 ^{cd}	4,70 ^d	7,80 ^e	11,06 ^e
3	M5 30-VL	14,80 ^b	50,00 ^a	64,60 ^a	77,20 ^a
4	M8 30-AD	2,30 ^c	19,30 ^c	29,50 ^d	36,10 ^c
5	M3 36-SR	14,00 ^b	34,40 ^b	53,90 ^b	82,12 ^a
6	M2 36-LN	0,90 ^{de}	19,00 ^c	38,20 ^c	51,80 ^b
7	M1 36-VL	21,10 ^a	52,70 ^a	64,90 ^a	76,90 ^a
8	M4 36-AD	0,00 ^e	0,50 ^e	1,80 ^f	4,00 ^e
	CV%	15,64	9,39	11,35	12,90
	F	**	**	**	**

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

(VL: Vĩnh Linh; LN: Lộc Ninh; SR: Sri Lanka; AD: Ấn Độ)

Động thái tăng trưởng số lá và màu sắc lá

Sau 30 ngày trồng ở nhà màng các tổ hợp ghép tăng 1,00 - 4,40 lá và phát triển nhanh chóng ở các giai đoạn tiếp theo. Ở giai đoạn sau 60 - 120 ngày, sự tăng trưởng số lá nhiều nhất là M1 36 - VL đạt 18,53 lá và ra lá ít nhất là M4 36 - AD đạt 4,00 lá (Bảng 3.28). Ngoài ra màu sắc lá cũng có sự khác biệt giữa các tổ hợp ghép, đa số tổ hợp ghép có lá mới ra màu tím, chỉ trừ tổ hợp ghép M7 30 - SR và M3 36 - SR có màu xanh. Màu lá non của tổ hợp ghép cũng chính là màu lá của ngọn ghép, vì vậy màu xanh khác biệt này là do ngọn ghép Sri Lanka.

Khác với sự tăng trưởng chiều cao, sự tăng trưởng số lá của các tổ hợp ghép từ kết quả trước của chúng tôi cho thấy các tổ hợp ghép với chồi Vĩnh Linh và Ấn Độ là có sự tăng số lá lớn nhất (Bảng 3.28). Điều này là không còn đúng khi đưa các tổ

hợp ghép ra sinh trưởng ở nhà màng, vì theo quan sát thực tế thì chỉ có 2 tổ hợp ghép M5 30 - VL và M1 36 - VL (với ngọn ghép Vĩnh Linh) là tăng số lá lớn nhất. Có thể ở giai đoạn đầu tiếp hợp, ngọn ghép Vĩnh Linh và Ấn Độ có khả năng tiếp hợp là gần như nhau nhưng càng về sau thì ngọn Vĩnh Linh lại càng cho kết quả tốt hơn.

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Mai và cộng sự (2022) cũng cho thấy số lá mới tạo ra của các cây hồ tiêu sau 20 tuần trồng ra đất là 3,87 - 5,93 lá, tương tự như số lá tạo mới ở 2 tổ hợp ghép M5 30 - VL và M1 36 - VL sau 30 ngày trồng ở nhà màng.

Bảng 3.28. Động thái tăng trưởng số lá và màu sắc lá của các tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng

STT	Tổ hợp ghép	Tăng trưởng số lá (lá)				Màu sắc lá mới
		Sau 30 ngày	Sau 60 ngày	Sau 90 ngày	Sau 120 ngày	
1	M7 30-SR	1,00 ^c	2,00 ^d	3,80 ^e	6,00 ^e	Xanh
2	M6 30-LN	1,40 ^c	2,40 ^d	3,46 ^e	5,40 ^e	Tím
3	M5 30-VL	4,20 ^a	10,80 ^a	13,00 ^b	15,20 ^{bc}	Tím
4	M8 30-AD	1,20 ^c	5,80 ^c	10,60 ^{cd}	13,20 ^{cd}	Tím
5	M3 36-SR	2,60 ^b	7,40 ^b	10,93 ^c	17,53 ^{ab}	Xanh
6	M2 36-LN	1,60 ^c	6,60 ^{bc}	9,20 ^d	12,60 ^d	Tím
7	M1 36-VL	4,40 ^a	11,46 ^a	16,00 ^a	18,53 ^a	Tím
8	M4 36-AD	1,00 ^c	2,00 ^d	3,00 ^e	4,00 ^e	Tím
	CV%	24,96	16,09	12,44	15,90	
	F	**	**	**	**	

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.

Chú thích: VL: Vĩnh Linh; LN: Lộc Ninh; SR: Sri Lanka; AD: Ấn Độ

Động thái tăng trưởng số đốt và màu sắc đốt

Số đốt trong 30 ngày sau đưa ra nhà màng của các tổ hợp ghép là khác nhau có ý nghĩa thống kê, nhiều nhất là tổ hợp ghép M1 36 - VL (4,60 đốt), thấp nhất là tổ hợp ghép M7 30 - SR, M6 30 - LN và M4 36 - AD (1,00 đốt). Tổ hợp ghép có tốc độ

tăng trưởng đốt nhanh nhất ở giai đoạn 60 ngày đến 120 ngày sau khi trồng là M1 36 - VL đạt 18.53 đốt, tổ hợp ghép M4 36 - AD có số lượng đốt thấp nhất là 6,60 đốt. Ngoài ra, tổ hợp ghép M5 30 - VL và M3 36 - SR cũng cho thấy sự tăng trưởng lớn về số đốt sau 120 ngày (Bảng 3.29).

Bảng 3.29. Động thái tăng trưởng số đốt và màu sắc đốt của các tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng

STT	Tổ hợp ghép	Tăng trưởng số đốt (đốt)				Màu sắc đốt
		Sau 30 ngày	Sau 60 ngày	Sau 90 ngày	Sau 120 ngày	
1	M7 30-SR	1,00 ^d	1,20 ^d	3,60 ^e	7,40 ^c	Xanh
2	M6 30-LN	1,00 ^d	2,00 ^d	3,60 ^e	7,80 ^c	Tím
3	M5 30-VL	3,60 ^b	11,00 ^a	13,20 ^b	16,60 ^a	Tím
4	M8 30-AD	1,20 ^d	5,80 ^c	10,20 ^{cd}	12,80 ^b	Tím
5	M3 36-SR	2,80 ^c	7,80 ^b	11,20 ^c	17,53 ^a	Xanh
6	M2 36-LN	1,40 ^d	6,60 ^c	9,00 ^d	12,60 ^b	Tím
7	M1 36-VL	4,60 ^a	11,26 ^a	16,00 ^a	18,53 ^a	Tím
8	M4 36-AD	1,00 ^d	2,00 ^d	3,20 ^e	6,60 ^c	Tím
	CV%	19,43	14,06	12,70	18,98	
	F	**	**	**	**	

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

*** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.*

Chú thích: VL: Vĩnh Linh; LN: Lộc Ninh; SR: Sri Lanka; AD: Ấn Độ

Có thể có một sự tương quan giữa sự tăng số đốt với sự tăng số lá và chiều cao cây ghép vì cả 3 kết quả đều cho thấy 2 tổ hợp ghép là M5 30 - VL và M1 36 - VL có kết quả tốt nhất. Sự tương quan giữa sự tăng trưởng lá và đốt có thể hiểu là vì ở các cây hồ tiêu một lá được tạo ra sẽ đồng nghĩa với việc một đốt mới được hình thành. Từ đó, sự kéo dài mỗi đốt sẽ tạo nên sự tăng trưởng về chiều cao cây.

Động thái tăng trưởng số cành

Hầu hết các tổ hợp ghép chỉ tăng trưởng 1 cành sau 30 ngày trồng ngoài nhà mang, trừ tổ hợp ghép M5 30 - VL (tăng 2,4 cành). Các tổ hợp ghép có tốc độ tăng trưởng cành nhanh nhất ở giai đoạn 60 ngày đến 120 ngày sau khi trồng ngoài nhà

màng là M1 36 - VL đạt 5,40 cành và tổ hợp ghép M5 30 - VL đạt 4,8 cành. Trong khi, tổ hợp ghép M6 30 - LN có số lượng cành thấp nhất là 2,40 cành ở 120 ngày sau khi trồng (Bảng 3.30).

Ở tiêu, cành bên là bộ phận được tạo ra ở giai đoạn sau của cây. Nó là vị trí để tạo gié, ra hoa và tạo quả, báo hiệu cho sự bắt đầu của giai đoạn phát triển. Vì vậy, ở những tháng đầu tiên thì cành thường không được tạo ra. Từ tuổi thứ 5 của cây ghép (tức là sau 30 ngày trồng ở nhà màng) thì bắt đầu có sự tạo cành (1,0 - 2,4 cành). Ở những tháng tiếp theo, số cành được tạo ra sẽ tăng lên. Với khả năng tiếp hợp tốt của ngọn ghép Vĩnh Linh và 2 loại gốc ghép thì sự tăng trưởng cành lớn nhất có thể được giải thích.

Bảng 3.30. Động thái tăng trưởng số cành của các tổ hợp ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng

STT	Tổ hợp ghép	Tăng trưởng số cành (cành)			
		Sau 30 ngày	Sau 60 ngày	Sau 90 ngày	Sau 120 ngày
1	M7 30-SR	1,00 ^b	2,00 ^b	1,80 ^c	3,00 ^{cd}
2	M6 30-LN	1,00 ^b	2,00 ^b	2,00 ^c	2,40 ^d
3	M5 30-VL	2,40 ^a	2,20 ^b	4,20 ^a	4,80 ^a
4	M8 30-AD	1,00 ^b	2,00 ^b	2,00 ^c	3,00 ^{cd}
5	M3 36-SR	1,00 ^b	2,00 ^b	2,00 ^c	3,20 ^c
6	M2 36-LN	1,00 ^b	2,00 ^b	2,00 ^c	3,00 ^{cd}
7	M1 36-VL	1,00 ^b	2,60 ^a	3,80 ^a	5,40 ^a
8	M4 36-AD	1,00 ^b	2,00 ^b	3,00 ^b	4,00 ^b
	CV%	16,48	12,40	14,63	14,52
	F	**	**	**	**

Trong cùng 1 cột, các giá trị có cùng ký tự là không khác biệt về mặt thống kê.

*** Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,01$.*

Chú thích: VL: Vĩnh Linh; LN: Lộc Ninh; SR: Sri Lanka; AD: Ấn Độ

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

- Cây phát sinh loài đã chia quần thể 39 dòng/giống hồ tiêu thành 2 nhóm. Nhóm I. gồm 5 dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PH46, HUIB_PD36, HUIB_PR41 và HUIB_PR48. Nhóm 2 gồm 34 dòng/giống hồ tiêu còn lại.

- Đã chọn được 2 dòng/giống hồ tiêu là HUIB_PD36 và HUIB_PH30, có khả năng kháng tuyến trùng và chịu úng tốt.

- Kỹ thuật BSA đã xác định 2 phân đoạn DNA (1450 bp và 300 bp) biểu hiện liên kết với tính kháng tuyến trùng từ 2 chỉ thị RAPD UBC#360 và UBC#408. Dựa vào trình tự 300 bp do mỗi UBC#360 khuếch đại đã phát triển được một chỉ thị SCAR 30 – 360F1R2 liên kết chặt với tính kháng tuyến trùng.

- Kết quả đánh giá đặc điểm ra hoa của *P. nigrum* cho thấy: Giai đoạn kéo dài gié dao động 14,0 - 22,1 ngày, thời gian phân hóa hoa kéo dài 8,1 - 17,3 ngày, khoảng cách lệch giao của các dòng/giống hồ tiêu từ 1,7 - 7,6 ngày. Khi lai *P. nigrum* và *P. divaricatum*, có tỉ lệ đậu và khả năng nảy mầm của các hạt lai rất thấp.

- Kết quả giải phẫu chỉ ra: ngọn ghép hồ tiêu Vĩnh Linh có sự tiếp hợp tốt nhất với 2 loại gốc ghép. Gốc ghép HUIB_PH30 tương thích tốt với cả 3 loại ngọn ghép tiêu Vĩnh Linh, tiêu Sri Lanka và tiêu Ấn Độ với tỷ lệ sống và sinh trưởng tốt. Ngoài ra các tổ hợp ghép cũng cho thấy khả năng kháng tuyến trùng tốt.

- Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển của cây ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng trong điều kiện nhà màng cho thấy tổ hợp ghép HUIB_PD36 – tiêu Vĩnh Linh và tổ hợp ghép HUIB_PH30 - tiêu Vĩnh Linh có khả năng sinh trưởng tốt nhất.

2. KIẾN NGHỊ

- Phát triển thêm các chỉ thị phân tử (AFLD, SSR,...) và giải trình tự các vùng gen trong các dòng/giống hồ tiêu để tìm ra gen kháng tuyến trùng ở hồ tiêu.

- Tiếp tục theo dõi sinh trưởng và phát triển của các tổ hợp ghép trong điều kiện nhà màng. Đồng thời, đưa hai tổ hợp ghép HUIB_PD36 - Vĩnh Linh và HUIB_PH30 - Vĩnh Linh trồng ngoài đồng ruộng để theo dõi, đánh giá khả năng kháng bệnh, chống úng và sự sinh trưởng, phát triển.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Sonexay Rasphone**, Long Thanh Dang, Nhi Thi Hoang Ho, Co Quang Nguyen, Hai Thi Hong Truong. Phylogenetic analysis of black peper (*Piper* spp.) population collected in different locations of vietnam based on the ITSu1-4 gene region. *Research Journal of Biotechnology*, 2022, Vol. 17(7). 1 - 9.
2. **Sonexay Rasphone**, Nhi Thi Hoang Ho, Long Dang Thanh, Bao Le Quy Nguyen, Hai Thi Hong Truong. Genetic diversity analysis of black pepper (*Piper nigrum* L.) by RAPD marker. *Hue University Journal Science: Nature science*, 2022, Vol. 131, No. 1D, 49 - 59.
3. Hai Thi Hong Truong, **Sonexay Rasphone**, Bao Le Quy Nguyen, Han Ngoc Ho, Co Quang Nguyen, Tu Thi Tran, Thao Xuan Hoang, Thuy Thanh Duong. Identification of *Piper* species that are resistant to *Phytophthora capsici*, *Meloidogyne incognita* and waterlogging in Vietnam. *Plant Pathology*, 2023.
4. Trương Thị Hồng Hải, Nguyễn Quang Ngọc, Dương Thị Oanh, **Sonexay Rasphone**. Khảo sát đặc điểm ra hoa và bước đầu lai tạo một số giống hồ tiêu (*Piper* spp.) ở Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 07/2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. An, N. V. (2012). Đánh giá sự đa dạng di truyền tính trạng hình thái các giống tiêu (*Piper nigrum* L.) hiện đang trồng phổ biến ở phía Nam. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn*, 5, 20 - 26.
2. Ban, N. C. (1956). *Trồng cây tiêu ở Cao Nguyên Miền Nam*. Tủ sách Nông học Việt Nam. Bộ Canh nông xuất bản, số 3.
3. Biên, P. V. (1989). *Phòng trừ sâu bệnh hại tiêu*. Nhà xuất bản nông nghiệp.
4. Cường, H. M., Dũng, N. V., Kiên, B. C., Nghị, Đ. Q., & Yên, Đ. T. P. (2021). *Hướng dẫn kỹ thuật canh tác cây hồ tiêu thích ứng với biến đổi khí hậu*. Bộ nông nghiệp và phát triển nông thôn. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.
5. Cường, V. Đ. (2020). *Đánh giá ảnh hưởng chế phẩm sinh học chitosan oligomer và nano đông chitosan đến sinh trưởng phát triển và bệnh hại trên cây hồ tiêu tại xã Thuận Hạnh, Huyện Đắc Song, Tỉnh Đắc Nông* (Luận văn thạc sĩ khoa học cây trôn. Mã ngành: 8.62.01.01)
6. Châu, N. N. (1995a). Thành phần sâu bệnh hại ở cây hồ tiêu Nông trường Tân Lâm, Quảng Trị. *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, 139(1). 14 - 18.
7. Châu, N. N. (1995b). Thành phần sâu bệnh hại hồ tiêu ở Tân Lâm-Quảng Trị. *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, Số. 1.
8. Châu, N. N., & Thanh, N. V. (2000). Tuyển trùng ký sinh thực vật ở Việt Nam. *Động vật chí Việt Nam*, 4.
9. Duyên, N. T., Linh, L. T. M., Tiên, N. H., & Pháp, T. Q. (2016). Bước đầu điều tra thành phần loài tuyển trùng ký sinh gây hại trên cà rốt ở Hải Dương. *Tạp chí Sinh học*, 38(1). 6 - 13.
10. Hà, C. Đ., Nguyệt, N. T. M., Mỹ, T. T. H., ... , & Nhựt, D. T. (2019). Ứng dụng chỉ thị phân tử trong phân biệt các loại sâm trên thế giới. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 122.
11. Hà, T. T. T., & Tôn, N. T. (2011). Nghiên cứu thành phần và mật số tuyển trùng gây hại trên cây hồ tiêu tại Cam Lộ, Quảng Trị. *Hue University Journal of Science Agriculture and rural development*, 67(4), 5 - 12
12. Hiền, T. T. D., Quyên, N. T., Ngọc, N. Q., & Oanh, D. T. (2019). Khả năng kháng nấm *Phytophthora capsici* và tuyển trùng *Meloidogyne incognita* của một số vật liệu làm gốc ghép cho gây hồ tiêu tại Việt Nam. *Tạp chí khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 1(98), 99 - 104.

13. Hòa, T. V. (2001). *101 câu hỏi thường gặp trong sản xuất nông nghiệp – Tập 9*. Nhà xuất bản Trẻ.
14. Hiệp, H. (2021). Báo cáo thị trường hồ tiêu quý II. https://cdn.vietnambiz.vn/1714648760_16439296_/2021/7/25/bao-cao-thi-truong-ho-tieu-quy-ii-2021-16271492419673960546_29.pdf
15. Khương, L. T., Tường, C. H., & Vượng, Đ. N. (2018). Tăng cường ứng dụng KH & CN trong phát triển các sản phẩm nông nghiệp chủ lực của vùng Tây nguyên. *Tạp chí khoa học công nghệ Việt Nam*, 3, 34 - 36.
16. Mai, N. T., Hồng, T., Hiền, N. H., & Thảo, N. T. (2021). Xây dựng quy trình kỹ thuật ươm và chăm sóc cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) giai đoạn sau in vitro. *Khoa học nông nghiệp. Trồng trọt*, 64(9), 36 - 42.
17. Linh, L. T. M. (2019). *Nghiên cứu sự đa dạng tuyến trùng ký sinh gây sần rễ Meloidogyne spp. ở tây nguyên* (Luận án tiến sĩ, Viện Hàn Lâm và Khoa học Việt Nam, Hà Nội).
18. Linh, M. T. Đ., & Hợp, D. V. (2017). Nghiên cứu đa dạng nấm rễ nội cộng sinh (*Arbuscular Mycorrhizal Fungi*) phân lập từ đất trồng ngô ở Hà Nội. *Tạp chí Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 33(2S), 312 - 318.
19. Loang, T. K. (2007). *Một số ý kiến về phòng trừ sâu, bệnh hại rễ cây hồ tiêu tại Tây Nguyên*. Trong: Hội thảo sâu bệnh hại tiêu và biện pháp phòng trừ. Đắk Nông.
20. Mai, T. T. X., Tâm, N. T., Liên, N. T., & Ngôn, T. T. (2014). Hiệu quả của chỉ thị phân tử trợ giúp chọn lọc trong chọn tạo giống lúa. *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ, Nông nghiệp thủy sản và Công nghệ Sinh học*, 33, 78 – 84.
21. Nam, T. N. T. & Loang, T. K. (2001). *Kỹ thuật trồng và chăm sóc hồ tiêu*. Tài liệu tập huấn, Viện Khoa Học Kỹ Thuật Nông Lâm Nghiệp Tây Nguyên, Đắk Lắk.
22. Nam, T. N. T. (2009). *Nghiên cứu chọn tạo giống và kỹ thuật tổng hợp thâm canh Hồ tiêu*. Viện Khoa học kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên.
23. Nga, B. T. T., Loan, H. T., Quảng, N. X., & Hiếu, D. Đ. (2015). Đa dạng quần xã tuyến trùng đất trong hệ sinh thái nông nghiệp hồ tiêu tỉnh đồng nai. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(4A), 1359 - 1367.
24. Ngọc, N. Q., Oanh, D. T., Hoài, P. T., Hiền, T. T. D., & Tuyết, N. T. (2021). Đánh giá một số tổ hợp ghép có khả năng kháng tuyến trùng trên cây hồ tiêu. *Tạp chí khoa học và nông nghiệp Việt Nam*, 06(127), 29 - 36.
25. Quyên, H. B. T., Nguyệt, N. T. A., & Hoàng, P. N. Đ. (2019). *Đánh giá khả năng ký sinh của các chủng Metarhizium anisopliae đối với tuyến trùng*

- Meloidogyne spp.* gây sần rễ tiêu. Ngày 20/ 7 / 2019. Hồ Chí Minh City Open University. Từ [http://iasvn.org/chuyen-muc/Danh-gia-kha-nang-gay-benh-cua-cac-chung-Metarh-izium-anisopliae-doi-voi-thanh-trung-bo-ha-\(Cylas-formicarius\)-gay-hai-tren-kh-oai-lang-7958.html](http://iasvn.org/chuyen-muc/Danh-gia-kha-nang-gay-benh-cua-cac-chung-Metarh-izium-anisopliae-doi-voi-thanh-trung-bo-ha-(Cylas-formicarius)-gay-hai-tren-kh-oai-lang-7958.html).
26. Quyện, N. T., Oanh, D. T., Hiền, T. T. D., Ngọc, N. Q. (2020). *Nghiên cứu về giống và các biện pháp kỹ thuật tổng hợp phát triển hồ tiêu bền vững*. Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.
 27. Sơn, P. T. (2004). *Xác định loài tuyến trùng Meloidogyne trên rễ cây hồ tiêu ở tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu và phòng trị Meloidogyne spp. bằng phân hữu cơ* (Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp. Đại học Nông lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam).
 28. Sùng, P. Q. (2001). *Tìm hiểu về kỹ thuật trồng và chăm sóc cây hồ tiêu*. Nhà xuất bản nông nghiệp. Thành Phố Hồ Chí Minh.
 29. Tân, P. G. (2001). *Kỹ thuật thâm canh cây tiêu. Tài liệu tập huấn, Đại học NôngLâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam*.
 30. Tôn, N. T., Hương, N. T., Liên, P. M., ..., & Mộng, N. (2015). *Quy trình kỹ thuật nhân giống tiêu bằng phương pháp ghép với gốc tiêu dại (Piper sp.)*. Viện khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền nam.
 31. Tú, D. X., Thành, P. T., Diệp, T. T., ..., & Hoàn, N. T. (2018). Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá cho các tỉnh phía Bắc. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60(2).
 32. Thành, N. Đ. (2014). Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật. *Tạp chí khoa học*, 36(3), 265 - 294.
 33. Thúy, Đ. T. K. (2021). Xác định và bảo tồn giống hồ tiêu sạch bệnh virus cho vùng Đông Nam Bộ. *Nhiệm vụ nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp Thành phố Hồ Chí Minh, do Viện Sinh học Nhiệt đới chủ trì*. 21/3/2022, từ <https://cesti.gov.vn/bai-viet/CTDS5/xac-dinh-va-bao-ton-giong-ho-tieu-sach-benh-virus-cho-vung-dong-nam-bo-912deba4-9416-4a83-b014-17750a7930cd>.
 34. Thuy, Q. H. B., Nguyệt, N. T. A., & Hoàng, P. N. Đ. (2019). Đánh giá khả năng ký sinh của các chủng *Metarhizium anisopliae* đối với tuyến trùng *Meloidogyne spp.* gây sần rễ tiêu. *Bộ tài liệu*, 42.
 35. Triệu, N. T. C., & Nhung, N. T. (2019). *Giới thiệu đặc điểm hoa của cây hồ tiêu (Piper nigrum)*. Trung tâm nghiên cứu và phát triển cây hồ tiêu, Viện khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệp tây nguyên.

36. Trinh, P. H., Thăng, V. Đ., Mai, T. T., & Tuấn, B. Đ. (1988). *Kỹ thuật trồng tiêu*. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.
37. Vietnambiz (2023). *Báo cáo thị trường hồ tiêu 2022*. Truy cập tại <https://mediacdn.vietnambiz.vn/1881912202208555/files/2023/01/27/bao-cao-thi-truong-ho-tieu-2022-20230127172048186.pdf>
38. Xuân, L. M. (1981). Kết quả điều tra cây hồ tiêu ở Bình Trị Thiên. *Tạp chí Khoa học và Kỹ thuật Nông nghiệp*, 225, 146 - 150.
39. Xuân, L. M & Phần, N. V. (1983). Kết quả điều tra giống tiêu nhập nội Lada Belangtoeng trồng ở Bình Trị Thiên. *Tạp chí Khoa học và Kỹ thuật Nông nghiệp*, 12, 548 - 522.
40. Xuyên N. T. (2000). *Nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng phòng chống tuyến trùng nốt sừng Meloidogyne incognita (Kofoid et white, 1919/Chitwood, 1949) trên một số cây trồng vùng Hà Nội và phụ cận* (Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội).
41. Xuyên, L. H., Thái, N. Q., Trường, N. N., & Hội, L. H. (2019). Ảnh hưởng của dịch trích lá và rễ cây trám ta (*Melaleuca cajuputi Poell*) lên tuyến trùng *Meloidogyne spp.* Gây bước rễ, nấm *Phytophthora spp.* Và *Fusarium spp.* Gây hại trên cây hồ tiêu (*Piper nigrum L.*) trong điều kiện phòng thí nghiệm. *Tạp chí khoa học trường Đại học Trà Vinh*, 34, 43 - 51.

TIẾNG ANH

42. Abd El-Hack, M.E., El-Saadony, M.T., Saad, A.M., ..., & AbuQamar, S.F. (2022). Essential oils and their nanoemulsions as green alternatives to antibiotics in poultry nutrition: a comprehensive review. *Poultry science*, 101.
43. Abd-Elgawad, M. M., & Askary, T. H. (2015). Impact of phytonematodes on agriculture economy. In *Biocontrol agents of phytonematodes*, 3 - 49.
44. Abd-Elgawad, M. M., & Askary, T. H. (2018). Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. *Egyptian journal of biological pest control*, 28(1), 1 - 24.
45. Abdulazeez, M. A., Sani, I., James, B. D., & Abdullahi, A. S. (2016). Black pepper (*Piper nigrum L.*) oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 277 - 285.
46. Aimanah, E. W., & Munif, A. (2022). Phytonematodes associated with the yellowing disease of Javanese long pepper plants in Sumenep, East Java. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 974(1), 012032.

47. Ajith, P. M., & Rini, C. R. (2023). Comparison of Hydroponic and Conventional Grafting Techniques in Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Current Journal of Applied Science and Technology*, 42(4), 7 - 15.
48. Alagawany, M., El-Saadony, M. T., Elnesr, S. S., ..., & Reda, F. M. (2021). Use of lemongrass essential oil as a feed additive in quail's nutrition: its effect on growth, carcass, blood biochemistry, antioxidant and immunological indices, digestive enzymes and intestinal microbiota. *Poultry science*, 100(6), 101172.
49. Anonymous, (1979). *Annual Report Research Branch, Dept. Agric., Sarawak, Malaysia*, 123 - 128.
50. Ashokkumar, K., Dhanya, M. K., Murugan, M., ..., & Nimisha, M. (2020). Optimization of DNA Isolation Protocol from Emerging Leaves of Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Current Opinion in Crop Science*, 1(1).
51. Ashokkumar, N., Poornima, K., & Kalaiarasan, P. (2019). Embryogenesis, penetration and post penetration development of *Meloidogyne enterolobii* in guava (*Psidium guajava* L.). *Annals of Plant Protection Sciences*, 27(1), 140 - 145.
52. Bhai, S., Eapen, S., Muthuswamy, A., & Saji, K. V. (2010). Identification of *Phytophthora* and nematode - resistant source - from opens pollinated progenies of black pepper (*Piper nigrum*) using a modified protocol. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 80(10), 893 - 897.
53. Bhat, A. A., Shakeel, A., Waqar, S., Handoo, Z. A., & Khan, A. A. (2023). Microbes vs. Nematodes: Insights into Biocontrol through *Antagonistic Organisms* to Control Root - Knot Nematodes. *Plants*, 12(3), 451.
54. Bhat, A. A., Shakeel, A., Waqar, S., Handoo, Z. A., & Khan, A. A. (2023). Microbes vs. Nematodes: Insights into Biocontrol through *Antagonistic Organisms* to Control Root - Knot Nematodes. *Plants*, 12(3), 451.
55. Brooks, F. (2021). *Symptoms and signs*. *Phytopathology News*.
56. Burns, A. R., Baker, R. J., Kitner, M., ..., & Snider, J. (2023). Selective control of parasitic nematodes using bioactivated nematicides. *Nature*, 1 - 8.
57. Butler, E. J. (1918). The wilt disease of pigeonpea and pepper. *Agriculture. Journal Indian*, 1, 25 - 26.
58. Caillaud, M. C., Dubreuil, G., Quentin, M., ..., & Favery, B. (2008). Root - knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 104 - 113.

59. Campos, V., Sivapalan, P., & Gnanapragasam, N. (1990). Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 387 - 430.
60. Chandrkrachang, S. (2002). The application of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. *Advances in Chitin Science*, 5, 458 - 462.
61. Chen, C. Y. S., & Tawan, C. (2020). Botany, Diversity, and Distribution of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Cultivars in Malaysia. *Borneo Journal of Resource Science and Technology*, 10(1), 10 - 23.
62. Cheng T., Xu C., Lei L., ..., & Zhou S. (2016). Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resource* 16(1):138 - 149.
63. Chu, Y., Clevenger, J., Hovav, R., ..., & Ozias – Akins, P. (2016). Chapter 7 - Application of Genomic, Transcriptomic, and Metabolomic Technologies in Arachis Species, *Peanuts. Genetics, Processing, and Utilization*. 209 - 240.
64. Damanhour, Z. A., & Ahmad, A. (2014). A review on therapeutic potential of *Piper nigrum* L. (Black Pepper): The King of Spices. *Medicinal & Aromatic Plants*, 3(3), 161.
65. Darvasi, A., & Soller, M. (1994). Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics*, 138(4), 1365 - 1373.
66. Dávila Negrón, M. & Dickson, D. W. (2013). Comparative thermal time requirements for development of *M. arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* at constant temperatures. *Nematropica*, 43(2), 152 - 163.
67. De Souza, R. A., Alves, F. R., De Oliveira, C. M. G., ..., & Moraes, W. B. (2021). Occurrence of in black pepper (L.) in the extreme south of the State of Bahia, Brazil. *Helminthologia*, 58(2), 213 - 216.
68. Desaegeer, J., Wram, C., & Zasada, I. (2020). New reduced-risk agricultural nematicides - rationale and review. *Journal of Nematology*, 52(1), 1 - 16.
69. Desoky, E. S. M., Merwad, A. R. M., Semida, ..., Rady, M. M. (2020a). Heavy metals - resistant bacteria (HM-RB): Potential bioremediators of heavy metals - stressed *Spinacia oleracea* plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
70. Desoky, E. S. M., Saad, A. M., El - Saadony, M. T., Merwad, A. R. M., & Rady, M. M. (2020b). Plant growth - promoting rhizobacteria: Potential improvement in antioxidant defense system and suppression of oxidative stress

- for alleviating salinity stress in *Triticum aestivum* (L.) plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101878.
71. Devasahayam, S. (2000). Insect pests of black pepper. In: Ravindran, P.N. (Ed.). *Black Pepper (Piper nigrum L.)*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 309 - 334.
 72. Dongare, M. D., Alex, S., Soni, K. B., ..., & Jose, E. (2023). Cross - species transferability of IRAP retrotransposon markers and polymorphism in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1 - 13.
 73. Eapen, S. J., & Rakesh Pandey, R. P. (2018). Nematode parasites of spices and medicinal plants. *In Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 755 - 794.
 74. El - Ashry, R.M., El - Saadony, M.T., El - Sobki, A.E., ..., & Elshaer, N. (2022). Biological silicon nanoparticles maximize the efficiency of nematicides against biotic stress induced by *Meloidogyne incognita* in eggplant. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 920 - 932.
 75. El - Nagdi, W. M., & Youssef, M. M. A. (2015). Nematicidal effect of some aqueous extracts of botanicals and a commercial bacterial byproduct for biocontrolling root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting sugar beet. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 10 (2), 55 - 58.
 76. El - Nagdi, W. M., Youssef, M. M. A., El - Khair, H., Abd - Elgawad, M. (2019). Effect of certain organic amendments and *Trichoderma* species on the root - knot nematode, *Meloidogyne incognita*, infecting pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 1 - 9.
 77. El - Saadony, M. T., Elsadek, M. F., Mohamed, A. S., ..., & Saad, A. M. (2020). Effects of chemical and natural additives on cucumber juice's quality, shelf life, and safety. *Foods*, 9(5), 639.
 78. El - Saadony, M. T., Abd El - Hack, M. E., Swelum, A. A., ..., & Nader, M. M. (2021a). Enhancing quality and safety of raw buffalo meat using the bioactive peptides of pea and red kidney bean under refrigeration conditions. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 762 - 776.
 79. El-Saadony, M. T., Khalil, O. S., Osman, A., ..., & Saad, A. M., (2021b). Bioactive peptides supplemented raw buffalo milk: biological activity, shelf life and quality properties during cold preservation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4581 - 4591.

80. El - Saadony, M.T., Saad, A.M., Taha, T.F., ..., & Salama, A. (2021c). Selenium nanoparticles from *Lactobacillus paracasei* HM1 capable of antagonizing animal pathogenic fungi as a new source from human breast milk. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 6782 - 6794.
81. El - Tarabily, K.A., El-Saadony, M.T., Alagawany, M., ..., & Abd El - Hack, M.E. (2021). Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(9).
82. Fan, R., Qin, X. W., Hu, R. S., ..., & Hao, C. Y. (2020). Studies on the chemical and flavour qualities of white pepper (*Piper nigrum* L.) derived from grafted and non - grafted plants. *European Food Research and Technology*, 246.
83. Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., ..., & Valè, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 82, 317 – 342.
84. Francis Y, Rongcai Y, Timothy B. POPGENE. (2000). *City of Edmonton: University of Alberta*. Version 1.32.
85. Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915 – 925.
86. Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetic*, 133, 693 – 709.
87. George, C. K., Abdullah, A., & Chapman, K. (2005). Pepper production guide for Asia and the Pacific. *International Pepper Community, Bangkok*.
88. Haggerty, A., & Crosse, U. L. (2011). *The Life of Black Pepper*.
89. Hallmann, J., Davies, K. G., & Sikora, R. (2009). Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In *Root - knot nematodes*. *CABI*, 380 - 411
90. Hasan, S. T., & Abood, I. D. (2018). Identification of *Meloidogyne* spp. According to Morphological characteristics, PCR - SCAR Marker and 18S rDNA region in Iraq. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*.
91. Hassanin, A. A., Saad, A. M., Bardisi, E. A., Salama, A., & Sitohy, M. Z. (2020). Transfer of anthocyanin accumulating delila and roseal genes from the transgenic tomato micro - tom cultivar to moneymaker cultivar by conventional breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(39), 10741 - 10749.

92. Helen, J. Y., & Lauren, G. (2002). Reproductive Biology: The effects of stigma age on receptivity in *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*, 89(8), 1237 - 1241.
93. Hoop, D. J. (1986). Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Her Majesty's Stationery Office, London, U.K.* 5.
94. Hooper, D. J., Hallmann, J., & Subbotin, S. A. (2005). Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 53 - 86.
95. Hu, L., Xu, Z., Wang, M., Fan, R., ..., & Jin, S. (2019). The chromosome-scale reference genome of black pepper provides insight into piperine biosynthesis. *Nature Communications*, 10(1), 1 - 11.
96. Humphreys-Pereira, D. A., Flores-Chaves, L., Gómez, M., ..., & Elling, A. A. (2014). *Meloidogyne lopezi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root - knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee - parasitising *Meloidogyne* species. *Nematology*, 16(6), 643 - 661.
97. IISR (2005). *Annual Report 2004-2005*. Indian Institute of Spices Research.
98. Iljas, H.B. (1960). Some notes on the floral biology of black pepper (*Piper nigrum* L.) *Pemb. Balai. Besar Penji. Pert. Bogor*, 157, 1 - 22.
99. Iwahori, H., Truc, N., Ban, D., & Ichinose, K. (2009). First report of root - knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on guava in Vietnam. *Plant disease*, 93(6).
100. Janani, P. (2009). Studies on grafting in black pepper (*Piper nigrum* L.) with reference to resistance to quick wilt and slow wilt diseases M. Sc. (Hort.) Thesis, *Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore*, 150 - 154.
101. Jones, M. G., & Goto, D. B. (2011). Root - knot nematodes and giant cells. *Genomics and molecular genetics of plant - nematode interactions*, 83-100.
102. Joy, N., Asha, S., Mallika, V., & Soniya, E. V. (2013). De novo transcriptome sequencing reveals a considerable bias in the incidence of simple sequence repeats towards the downstream of 'pre - miRNAs' of black pepper. *PLoS One*.
103. Khew, C. Y., Harikrishna, J. A., Wee, W. Y., Lau, E. T., & Hwang, S. S. (2020). Transcriptional sequencing and gene expression analysis of various genes in fruit development of three different black pepper (*Piper nigrum* L.) varieties. *International journal of genomics*.

104. Khew, C. Y., Koh, C. M. M., Chen, Y. S., Sim, S. L., & Mercer, Z. J. A. (2022). The current knowledge of black pepper breeding in Malaysia for future crop improvement. *Scientia Horticulturae*, 300(12), 111074.
105. Khuong, G. B. (1983). Plant - parasitic nematodes of South viet nam. *Journal of Nematology*, 15(2), 319.
106. Kimber, G. (1984). Technique selection for the introduction of alien variation in wheat. *Z pXanzenziichtg*, 92, 15 – 21.
107. Koshy, P. K., Eapen, S. J., & Rakesh Pandey, R. P. (2005). Nematode parasites of spices, condiments and medicinal plants. In *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 751 - 791.
108. Krishnamoorthy, B., Parthasara & thy, V. A. (2009). Improvement of black pepper. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. *Nutrition and Natural Resources*, 4, No. 085.
109. Kumar, N. U., Ravichandra, N. G., & Nataraja, A. (2018). Ecofriendly management of wilt complex in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Indian Journal of Nematology*, 48(2), 146 - 155.
110. Kumari, R., Wankhede, D. P., Bajpai, A., ..., & Pang, X. (2019). Genome wide identification and characterization of microsatellite markers in black pepper (*Piper nigrum*): A valuable resource for boosting genomics applications. *Plos one*, 14(12), e0226002.
111. Lau, J. L.C. (2005). *Malaysian pepper industry outlook*. Paper presented at Pepper and Spices Outlook held at Caravelle Hotel, Ho Chi Minh City, 30 - 31 May, 2005. <http://iasvn.org/chuyen-muc/Ket-qua-nghien-cuu-ve-cay-tru-tieu-289.html>.
112. Lawal, I., Fardami, A. Y., Ahmad, F. I. I., ..., & Maiyadi, K. A. (2022). A Review on Nematophagus Fungi: A Potential Nematicide for the Biocontrol of Nematodes. *Journal of Environmental Bioremediation and Toxicology*, 5(1).
113. Leong, S. S., Leong, S. C. T., Pau, C. G., & Beattie, G. A. C. (2021). *In vitro* bioassay of *Purpureocillium lilacinum* and *Bacillus thuringiensis* for control of *Meloidogyne incognita* on black pepper (*Piper nigrum* L.) in Sarawak, Malaysia, Northern Borneo. *Journal of the Entomological Research Society*, 23.
114. Li, J., Fan, R., Wu, B., Ji, X., & Hao, C. (2021). Genome - Wide Identification and Functional Exploration of SBP - Box Gene Family in Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Genes*, 12(11), 1740.

115. Long, H., Sun, Y., Chen, Y., ..., & Che, H. (2023). Occurrence of root - knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on peppers in Hainan, China, and resistance of field cultivars to *M. enterolobii* and *M. incognita*. *Plant Disease*.
116. Mandou, M. S., Souleymanou, A., & Chotangui, A. H. (2023). Arbuscular *Mycorrhizal* Fungi Inoculation and Intercropping Combine to Control Nematodes in Bananas. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35(14).
117. Manohara, D., Mulya, k., & Wahyuno, D. (2004). Phytophthora disease on black pepper and the control measures. In Focus on pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of the Pepper Industry, Jakarta, Indonesia*.
118. Marques, M. L. S., Oliveira, M. F., Pereira, P. S., & Rocha, M. R. (2020). Penetration and development of *Meloidogyne enterolobii* in resistant and susceptible *Capsicum* spp. *European Journal of Horticultural Science*, 85(2).
119. Mathew, P.A., & Rema, J. (2000). *Grafting black pepper to control foot rot* . Spice India.
120. McClean, Phillip (1992). "*Specialized Mapping Topics*". North Dakota State University.
121. Mhatre, P. H., Karthik, C., Kadirvelu, K., ..., & Shanmuganathan, R. (2019). Plant growth promoting *rhizobacteria* (PGPR): a potential alternative tool for nematodes bio - control. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17, 119 - 128
122. Mhatre, P. H., Malik, S. K., Kaur, S., ..., & Sirohi, A. (2015). Histopathological changes and evaluation of resistance in Asian rice (*Oryza sativa* L.) against rice root - knot nematode, *Meloidogyne graminicola* Golden and Birch. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 75(01), 41 - 48.
123. Michelmore, R. W., Paran, I., & Kesseli, R. (1991). Identification of markers linked to disease - resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the national academy of sciences*, 88(21).
124. Mitiku, M. (2018). Plant - parasitic nematodes and their management: A review. *Journal of Biology Agriculture and Healthcare*, 8(1), 34 - 42.
125. Moens, M., Perry, R. N. & Starr, J. L. (2009). *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. *Root - knot nematodes*, 1 - 13.
126. Mukhtar, T., Hussain, M. A., & Kayani, M. Z. (2013). Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and

- Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. *Phytopathol. Mediterr*, 52(1), 66 - 76.
127. Mustika, I. (1990). *Study on interaction of Meloidogyne incognita, Radopholus similis and Fusarium solani on pepper (Piper nigrum L)* (Doctoral dissertation, PhD Thesis Wegeningen Agricultural University).
128. Naik, B. G., Manu, T. G., Nagamma, G., & Balagar, M. (2017). Survey for the incidence of slow wilt of black pepper in southern parts of Karnataka. *Trends in Biosciences*, 10(4), 1162 - 1164.
129. Narayana, R., Thomas, S., & Sheela, M. S. (2018). Management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting black pepper. *Indian Journal of Nematology*, 48(1), 51 - 55.
130. Nas, Y., Özalp, T., & Devran, Z. (2023). Screening of Urfa pepper landraces for resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130(1), 77 - 83.
131. Negi, A., George Kokkat, J., Jasrotia, R. S., ..., & Kumar, D. (2021). Drought responsiveness in black pepper (*Piper nigrum* L.): Genes associated and development of a webgenomic resource. *Physiologia Plantarum*, 172(2).
132. Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York Chichester, West Sussex: Columbia University Press.
133. Nisha, M. S., Anusree, S. S., & Sooraj, S. (2019). Efficacy of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees against root-knot nematode in pepper, *Piper nigrum* L. *Journal of Entomology and Zoology. Studies*, 7(4), 539 - 545.
134. Nuryani, Y. (1981). *Ketidak sesuaian jaringan dalam penyambungan tanaman lada dengan Piper chaba Hunter*.
135. Paulus, A. D., & Wong, T. H. (2000). Development of pepper Industry in Sarawak, Malaysia. Agriculture Research Centre, Sarawak, Malaysia. *Pepper Market Review*. http://w.w.w.iHUIB_PNnet.org/art07.htm.
136. Paulus, A. D., & Eng, L. (2005). *Current practices and technology in the control of Phytophthora foot rot and virus disease of pepper in Sarawak, Malaysia*. The paper presented at international pepper community 30th peppertech meeting. Inna Putri Bali Hotel, Nusa Duna, Bali, Indonesia.
137. Pepper Statistical Yearbook. (2017). *International Pepper Community*.

138. Pervez, R., & Eapen, S. J. (2015). Distribution of plant parasitic nematodes associated with Black pepper in Idukki district, India. *Annals of Plant Protection Sciences*, 23(1), 192 - 194.
139. Qurota'ayun, S. D., Rosa, E., Pratami, G. D., & Kanedi, M. (2022). Potential of Pepper Leaf (*Piper nigrum* L.) Ethanol Extract As Ovicide for *Aedes aegypti*. *Jurnal Sains Natural*, 12(4), 170 - 175.
140. R Development Core Team (2008). "R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna." <http://www.R-project.org>
141. Rahanandeh, H., Khodakaramian, G., Hassanzadeh, N., ..., & Tarang, A. R. (2012). Inhibition of tea root lesion nematode, *Pratylenchus loosi*, by rhizosphere bacteria. *Journal of Ornamental and Horticultural Plant*, 2 (4).
142. Rai, S. P., Rai, S. K., Apoorva, Rai, K. K., & Kumar, S. (2022). Molecular Markers and Descriptor's Suitable for Quantitative Trait Loci and Genome Mapping in *Catharanthus roseus*. In *The Catharanthus Genome*, 123 - 140.
143. Ramana, K. V., Sarma, Y. R., & Mohandas, C. (1992). Slow decline disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) and role of plant parasitic nematodes and *Phytophthora capsici* in the disease complex. *Journal Plant Crops*, 20(Suppl).
144. Rasphone, S., Dang, L. T., Ho, N. T. H, Nguyen, C. Q. & Truong, H. T. H. (2022). Phylogenetic analysis of black piper (*Piper* spp.) population collected in different locations of Viet Nam based on the ITSU1-4 gene region. *Research Journal of Biotechnology*, 17(7), 1 - 9.
145. Ravindra, H., Sehgal, M., Manu, T. G., ..., & Latha, M. (2013). Status of plant parasitic nematode problems of Karnataka and their management with special reference to genus *Meloidogyne*. *Current Nematology*, 24(1,2), 39 - 48.
146. Ravindran P N. (2000). Black pepper: *Piper nigrum*. *Harwood academic publishers, New Jersey*, 1 - 10.
147. Ravindran, P. N., Nirmal Babu, K., & Shiva, K. N. (2006). *Black pepper*. Agrobios.
148. Raz, V., & Ecker, J. (1997). *Analyzing DNA: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 24 - 25.
149. Rozen, S., & Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols*, 365 - 386.

150. Rusinque, L., Nóbrega, F., Cordeiro, L., ..., & Inácio, M. L. (2022). Root-Knot Nematode Species Associated with Horticultural Crops in the Island of Azores, Portugal. *Horticulturae*, 8(2), 101.
151. Saad, A. M., El- Saadony, M. T., Mohamed, A. S., Ahmed, A. I., & Sitohy, M. Z. (2021a). Impact of cucumber pomace fortification on the nutritional, sensorial and technological quality of soft wheat flour- based noodles. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(7).
152. Saad, A. M., Mohamed, A. S., El-Saadony, M. T., & Sitohy, M. Z. (2021b). Palatable functional cucumber juices supplemented with polyphenols-rich herbal extracts. *LWT*, 148, 111668.
153. Saad, A. M., Sitohy, M. Z., Ahmed, A. I., ..., & El-Saadony, M. T. (2021c). Biochemical and functional characterization of kidney bean protein alcalase-hydrolysates and their preservative action on stored chicken meat. *Molecules*.
154. Saad, A. M., Mohamed, A. S., Ramadan, M. F. (2020a). Storage and heat processing affect flavors of cucumber juice enriched with plant extracts. *International Journal of Vegetable Science*, 1 – 11
155. Saad, A. M., Osman, A. O. M., Mohamed, A. S., & Ramadan, M. F. (2020b). Enzymatic hydrolysis of Phaseolus vulgaris protein isolate: Characterization of hydrolysates and effect on the quality of minced beef during cold storage. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26.
156. Saad, A. M., Salem, H. M., El-Tahan, A. M., ..., & Swelum, A. A. (2022). Biological control: An effective approach against nematodes using black pepper plants (*Piper nigrum* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 2047 - 2055.
157. Saeki, Y., Kawano, E., Yamashita, C., Akao, S. & Nagatomo, Y. (2003). Detection of plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus coffeae* by multiplex PCR using specific primers. *Soil science and plant nutrition*, 49, 291 - 295.
158. Sairkar, P. K., Sharma, A., & Shukla, N. P. (2016). SCAR marker for identification and discrimination of *Commiphora wightii* and *C. myrrha*. *Molecular Biology International*.
159. Sasikumar, B., Johnson., George, K., & Ravindran, P. N. (1992). Breeding behaviour of black pepper. *Indian Journal of Genetics*, 52 (1), 17 - 21.

160. Sheeja, T. E., Sabeesh, C., Shabna, O. V., Shalini, R. S., & Krishnamoorthy, B. (2013). A comparative analysis of genetic diversity of wild and related genera of *Myristica* using RAPD and ISSR markers. *Journal Spices Aromat Crops*, 22.
161. Shi, X., Dai, X., Liu, G., & Bao, M. (2009). Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.): osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. *Trees*, 23(5), 1033 - 1042.
162. Sikandan, A., Zhang, M., Wang, Y., ..., & Duan, Y. (2020). *In vitro* evaluation of *Penicillium chrysogenum* Snef1216 against *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). *Scientific reports*, 10(1), 1 - 9.
163. Skupinova, S., Vejl, P., Sedlak, P., ..., & Tesarova, B. (2004). Using DNA markers for characterisation of tomato resistance against root nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Soil and Environment*, 50(2), 59 - 64.
164. Smant, G., Helder, J., & Govere, A. (2018). Parallel adaptations and common host cell responses enabling feeding of obligate and facultative plant parasitic nematodes. *The Plant Journal*, 93(4), 686 - 702.
165. Speijer, P. R., & De Waele, D. (1997). Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. *INIBAP Technical Guidelines 1. INIBAP, Montpellier, France*, 47.
166. Statista. (2021). <https://www.statista.com/statistics/744331/india-pepper-production-volume-by-state/>.202.
167. Strobeck, C. (1987). Average number of nucleotide differences in a sample from a single subpopulation: a test for population subdivision. *Genetics*, 117(1).
168. Subedi, S., Thapa, B., & Shrestha, J. (2020). Root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and its management: a review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 3(2), 21 – 31.
169. Subha, S.P., & Balamurugan, S.(2020). Economic analysis of pepper cultivation in India. *International Journal of Economics and Management Studies*.
170. Subila, K. P., & Suseela Bhai, R. (2020). *Pythium deliense*, a pathogen causing yellowing and wilt of black pepper in India. *New Disease Reports*, 42, 6 - 6.
171. Swelum, A. A., Shafi, M. E., Albaqami, N. M., ..., & Abd El-Hack, M. E. (2020). COVID-19 in human, animal, and environment: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 578.

172. Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, *10*, 512 - 526.
173. Tanksley, S. D., & Nelson, J. C. (1996). Advanced backcross QTL analysis: A method for simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet*, *92*.
174. Tesařová, B., Zouhar, M., & Ryšánek, P. (2003). Development of PCR for 449 specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant 450 Protection Science*, *3*, 23.
175. Thangaselvabal, T., Gailce Leo Justin, C., & Leelamathi, M. (2008). Black pepper (*Piper nigrum* L.) ‘the king of spices’—A review. *Agricultural Reviews*, *29*(2), 89 - 98.
176. Thuy, T. T. T., Yen, N. T., Tuyet, N. T. A., Te, L. L., & De Waele, D. (2012). Plant-parasitic nematodes and yellowing of leaves associated with black pepper plants in Vietnam. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *45*(10).
177. Tran, D. M., Nguyen, T. H., Huynh, T. U., ..., & Nguyen, A. D. (2022). Analysis of endophytic microbiome dataset from roots of black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivated in the Central Highlands region, Vietnam using 16S rRNA gene metagenomic next-generation sequencing. *Data in Brief*, *42*.
178. Trinh, Q. P., Le, T. M. L., Nguyen, T. D., ..., & Nguyen, T. A. D. (2019). *Meloidogyne daklakensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) in the Western Highlands, Vietnam. *Journal of helminthology*, *93*(2).
179. Truong, H. T. H., Elisabeth Éch., Wang, J. F. (2008). Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in wild tomato germplasm. *Eur Journal Plant Pathol*, *122*, 471 -479.
180. Truong, H. T. H., Choi, H., Cho, M. C., & Lee, H. E. (2011). Conversion of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker UBC# 116 linked to *Fusarium crown* and root rot resistance gene (Frl) into a co-dominant sequence characterized amplified region (SCAR) marker for marker-assisted selection of tomato. *African Journal of Biotechnology*, *10*(54), 11130 - 11136.
181. Truong, H. T. H., Tran, H. N., Choi, H. S., Park, P. H., & Lee, H. E. (2013a). Development of a co-dominant SCAR marker linked to the Ph-3 gene for

- Phytophthora infestans* resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *European journal of plant pathology*, 136, 237 - 245.
182. Truong, H. T. H., Kim, J. H., Cho, M. C., Chae, S. Y., & Lee, H. E. (2013b). Identification and development of molecular markers linked to *Phytophthora* root rot resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *European journal of plant pathology*, 135, 289 - 297.
183. Truong, H. T. H., Kim, S., Tran, H. N., ..., & Hoang, T. K. (2015). Development of a SCAR marker linked to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) resistance in tomato line Hawaii 7996 using bulked-segregant analysis. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56, 506 - 515.
184. Usman, M., Gulzar, S., Wakil, W., ..., & Shapiro - Ilan, D. (2020). Virulence of entomopathogenic fungi to *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) and interactions with entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*, 113(6), 2627 - 2633.
185. Vanaja, T., Neema, V. P., Mammooty, K. P., & Rajeshkumar, R. (2008). Development of a promising interspecific hybrid in black pepper (*Piper nigrum* L.) for *Phytophthora* foot rot resistance. *Euphytica*, 161, 437 - 445.
186. Vanaja, T., Neema, V. P., Rajesh, R., & Mammooty, K. P. (2007). Graft recovery of *Piper nigrum* L. runner shoots on *Piper colubrinum* Link. rootstocks as influenced by varieties and month of grafting. *Journal of Tropical Agriculture*, 45(1 - 2), 61 - 62.
187. Wang, B., Zhang, Y., Huang, J., ..., & Fu, X. (2017). Antiinflammatory activity and chemical composition of dichloromethane extract from *Piper nigrum* and *P. longum* on permanent focal cerebral ischemia injury in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(3), 369 - 74.
188. Whitehead, A. G. (1997). Sedentary endoparasites of roots and tubers. *Plant nematode control*, 146 - 208
189. Williamson, V. M., & Roberts, P. A. (2009). Mechanisms and genetics of resistance. In: Perry RN, Moens M, Starr JL, eds. *Root-knot Nematodes*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 301 - 325.
190. Winoto-S, R. (1972). Effect of Meloidogyne species on the growth of *Piper nigrum* L. *Malaysian agricultural research*, 86 - 90.
191. Yang, S. H., Wang, D., Chen, C., Xu, C. L., & Xie, H. (2020). Evaluation of *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Laelapidae) for controlling the root-knot

- nematode, *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae). *Scientific reports*, 10(1), 1 - 8.
192. Youssef, M., & El-Nagdi, W. (2021). Controlling Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* Infecting Field Dry Pea (*Pisum sativum* L.) by Certain Moringa Residues and Extracts. *Egyptian Journal of Agronematology*, 20.
193. Zargar, S. M., Farhat, S., Mahajan, R., Bhakhri, A., & Sharma, A. (2016). Unraveling the efficiency of RAPD and SSR markers in diversity analysis and population structure estimation in common bean. *Saudi journal of biological sciences*, 23(1), 139 - 149.