

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

TÓM TẮT 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

TÓM TẮT 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

Công trình được hoàn thành tại: Viện Công nghệ sinh học, Đại học
Huế

Người hướng dẫn khoa học: PSG. TS. Trương Thị Hồng Hải
TS. Nguyễn Quang Cơ

Phản biện 1

.....
.....
.....

Phản biện 2

.....
.....
.....

Phản biện 3

.....
.....
.....

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế,
hợp tại cơ quan Đại học Huế,
vào hồigiờ ngày.....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện

1. Thư viện quốc gia Việt Nam
2. Trung tâm học liệu Đại học Huế
3. Thư viện Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của luận án

Hồ tiêu (*Piperspp.*) 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, tiêu Sẻ Đất đỏ, tiêu Vĩnh Linh, tiêu Sơn, tiêu Di Linh, tiêu Phú Quốc, tiêu Nam Vàng; 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 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; Thụy 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 trâu 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 ứng cũng được chọn lọc để chọn ra các giống thích hợp với điều kiện thường xuyên ngập úng của Thừa Thiên Huế.

1.1. Mục tiêu của đề tài

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.

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 ứng
- 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.

1.2. 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

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).

1.1.1.2. Phân loại tuyến trùng

Ở Việt Nam, *Meloidogyne* spp., *Tylenchus* sp., *Rotylenchulus reniformis*, *Ditylenchus ausafii*, và *Aphelenchus avenae* là năm tuyến

trùng ký sinh thực vật được tìm thấy ở tất cả các tỉnh được nghiên cứu. *Meloidogyne* spp, là đơn vị phân loại phổ biến được tìm thấy và tất cả *Meloidogyne* được công nhận là *M. incognita*.

1.1.1.3. Tác hại của tuyến trùng

Tuyến trùng 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 của bệnh “chết chậm”, vàng lá và làm giảm năng suất cây hồ tiêu (Quyên và nnk., 2019). Tuyến trùng đã gây thiệt hại 15% sản lượng cây trồng hàng năm, ước tính 100 - 157 tỷ USD trên toàn thế giới (Abd - Elgawad & Askary, 2015). Ở các quốc gia trồng tiêu Đông Nam Châu Á, tuyến trùng *Meloidogyne* spp gây thiệt hại đến 16% (Sasser, 1979).

1.1.1.4. Biện pháp xử lý tuyến trùng

Các loại thuốc diệt tuyến trùng tổng hợp khác nhau đã được sử dụng để kiểm soát tuyến trùng, tuy nhiên phần lớn thuốc trừ sâu đã bị loại bỏ khỏi thị trường do các tác động ngoài mục tiêu, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và môi trường. *Trichoderma*, *mycorrhizal* và nấm nội sinh là những loại nấm sợi chính được sử dụng để tạo ra tính 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, tê liệt và ký sinh. Ngoài ra cũng có nhiều loài nấm có khả năng tiêu diệt tuyến trùng đã được thử nghiệm như: *Dactylella oviparasitica*, *Arthrobotrys oligospore*, *Monacrosporium gepgyropagum*, *Verticillium chlamydosporium*.

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 (Bui và nnk., 2017), 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 nnk., 2020; Dongare và nnk., 2023), nó đã trở nên quen thuộc trong các món ăn hàng ngày của mọi người. 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 nnk., 2017).

1.1.2.2. Vai trò, tác dụng của cây hồ tiêu

Tiêu là một loại cây trồng có thể sống lâu năm và có giá trị kinh tế cao. Tiêu được sử dụng làm gia vị, trong công nghiệp hương liệu, trong y dược và làm chất diệt côn trùng (Hòa, 2001)

1.1.2.3. Đặc điểm hình thái cây hồ tiêu

Rễ tiêu gồm từ 3-6 rễ cái và một chùm rễ phụ ở dưới mặt đất, trên đốt thân có rễ thân lằn (rễ bám). Tiêu là thuộc loại thân thảo mềm dẻo được phân thành nhiều đốt, mỗi đốt có một lá đơn, hình trái tim, mọc

cách. Ở nách lá có các mầm ngủ có thể phát sinh thành các cành tược, cành lươn, cành ác (cành cho trái) tùy theo giai đoạn phát triển. 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 bình quân 20-60 hoa xếp thành hình xoắn ốc, hoa tiêu lưỡng tính hoặc đơn tính. Trái tiêu thuộc loại trái hạch, không có cuống, mang 1 hạt hình cầu. Từ khi ra hoa đầy đủ cho đến khi trái chín kéo dài từ 7-10 tháng.

1.1.2.4. Phân bố của hồ tiêu

Hồ tiêu có nguồn gốc từ Ấn Độ, sau đó du nhập đến các nước nhiệt đới như Brazil, Indonesia, Malaysia, Thái Lan, Srilanka và Việt Nam. Ngày nay, mặc dù hồ tiêu được tìm thấy ở hầu hết các nước nhiệt đới, nhưng vùng sản xuất chính chỉ tập trung ở một số nước Nam Á, Đông Nam Á và Brazil. Hồ tiêu được trồng phổ biến ở nhiều nơi: Ấn Độ, Brazil, Indonesia, Malaysia, Sri Lanka, Việt Nam và Trung Quốc (Xuyên và nnk., 2019).

1.1.2.5. Các giống hồ tiêu đang sử dụng

Năm 2021, Thúc Đ. T. K., đã thu nhận 33 mẫu hồ tiêu từ các vùng Đông Nam Bộ, Phú Quốc và Tây Nguyên, gồm các giống tiêu Vĩnh Linh, giống tiêu Srilanka, giống tiêu Braxin, giống tiêu Ấn Độ và giống tiêu Sê. Dựa vào hình thái có thể chia chúng thành 2 dòng: dòng hồ tiêu lá nhỏ gồm: tiêu Sê Đắc Lắc, tiêu Phú Quốc, tiêu Vĩnh Linh thu thập ở Đông Nam Bộ và Tây Nguyên. Dòng tiêu lá lớn gồm có: 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.

1.1.2.6. Các phương pháp lai tạo giống hồ tiêu

Để cải thiện đặc tính của các giống hồ tiêu và tăng khả năng chống chịu sâu bệnh hại thì phương pháp lai tạo giống là hết sức cần thiết, nhằm tạo giống mới, tăng tính đa dạng, phong phú về nguồn gen cây hồ tiêu. Có 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.

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

Ghép hồ tiêu (*Piper nigrum*) trên gốc ghép *P. colubrinum* là một kỹ thuật được sử dụng rộng rãi để quản lý tiêu bệnh do *Phytophthora*. Để đánh giá ảnh hưởng của giống và thời vụ đến khả năng phục hồi cành ghép, một nghiên cứu sơ bộ đã được thực hiện. Trong đó các chồi bên của tám giống *P. nigrum* được ghép trên gốc ghép *P. colubrinum*. Kết quả cho thấy rằng bất kể giống nào, tháng 2 và tháng 3 là thời kỳ tốt nhất để tạo cành ghép (Vanaja và nnk., 2007).

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).

1.1.4.2. Các loại chỉ thị phân tử

Các chỉ thị hiện nay gồm có: chỉ thị đa hình độ dài các đoạn cắt hạn chế (RFLP), chuỗi lặp ngắn liền kề (STR), số lượng thay đổi các chuỗi lặp lại liền kề, số lượng biến đổi song song lặp lại (VNTR), đa hình cấu tạo sợi đơn (SSCP), vị trí chuỗi đánh dấu (STS), đa hình DNA nhân bản ngẫu nhiên (RAPD), đa hình nucleotide đơn (SNP), đa hình các đơn enzyme cắt giới hạn (RFLD), vị trí trình tự tiêu vệ tinh được đánh dấu (STMS), dấu DNA nhân bản (DAF), chỉ thị trình tự biểu hiện (EST) (Adams và nnk., 1991), đa hình độ dài các chuỗi đơn giản (SSLP), chuỗi đa hình nhân bản được cắt hạn chế (CAPS), chỉ thị nhân bản sợi thay thế (SDA), chuỗi lặp lại đơn giản (SSR), vùng nhân bản chuỗi DNA được mô tả (SCAR), đa hình các locus tiêu vệ tinh nhân bản chọn lọc (SAM PL), tiêu vệ tinh neo nhân bản (AMP - PCR), đa hình tiêu vệ tinh nhân bản ngẫu nhiên (RAMP), chuỗi lặp lại đơn giản giữa (ISSR), các môi liên quan đến allen đặc biệt (ASAP), đa hình độ dài đoạn nhân chọn lọc (AFLP), tiêu vệ tinh nhân bản ngẫu nhiên (RAMP), đa hình nhân bản chuỗi đặc biệt (S - SAP), chỉ thị PCR đảo (IPCR), sự mở rộng lặp lại song song ngắn (STR).

1.1.4.3. Vai trò của chỉ thị phân tử

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; chọn lọc nguồn gen và chọn giống nhờ chỉ thị phân tử. Tuy nhiên, hiện không có chỉ thị nào đáp ứng được tất cả các yêu cầu trên. Tùy thuộc vào vấn đề nghiên cứu mà chọn các kỹ thuật 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

Theo thống kê của Hiệp hội hồ tiêu Quốc tế, tổng diện tích hồ tiêu trên thế giới từ 2008 đến 2017 gần như không có sự thay đổi. Tổng diện tích hồ tiêu năm 2008 là 459.886 ha, đến 2017 tổng diện tích hồ tiêu toàn thế giới là 458.731 ha. Ấn Độ, Việt Nam và Indonesia là 3 nước có diện tích hồ tiêu lớn nhất, tổng diện tích của 3 Quốc gia này chiếm tới 78,86% tổng diện tích toàn thế giới (Pepper Statistical Yearbook 2017, International Pepper Community). Việt Nam là nước sản xuất và xuất khẩu hạt tiêu lớn nhất (100.000 tấn), tiếp theo là Ấn Độ (48.000 tấn), Indonesia (37.000 tấn), Brazil (35.000 tấn) và Malaysia (25.672 tấn).

➤ Ở Việt Nam

Việt Nam là nước sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu nổi bật nhất trên thế giới. Năm 2020, diện tích trồng tiêu đen của Việt Nam là 132.000 ha,

sản lượng đạt 270.000 tấn, trong đó khu vực Tây Nguyên chiếm khoảng 70% cả về diện tích và sản lượng. Do đó, khu vực này được coi là thủ phủ trồng trọt và sản xuất hồ tiêu của Việt Nam (Tran và nnk., 2022)

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 Cochinchina của Trung Quốc. Năm 1918, vùng Wynad, Ấn Độ cũng đã báo cáo tuyến trùng gây hại trên hồ tiêu. *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, riêng loài *M. arenaria* được báo cáo gây hại ở Sri Lanka (Koshy & Geetha, 1992).

➤ Ở Việt Nam

Theo kết quả kiểm tra tình hình sản xuất hồ tiêu đầu năm 2019 của Cục Bảo vệ thực vật, 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).

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

Các nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống tiêu kháng tuyến trùng trên thế giới và ở Việt Nam vẫn còn hạn chế vì hệ gene nhân của hồ tiêu chưa được giải trình tự toàn bộ.

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

Lần đầu tiên trong lịch sử trồng hồ tiêu, một giống hồ tiêu lai giữa các loài có khả năng sinh sản một phần có khả năng kháng *Phytophthora*, được phát triển thông qua lai giữa *Piper nigrum* với loài hoang dã *Piper colubrinum*. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào về lai tạo giống hồ tiêu kháng tuyến trùng. Khi sinh học phân tử và nhân giống cây trồng tiến bộ, hai phương pháp trở nên quan trọng là chọn lọc có hỗ trợ đánh dấu (MAS) và chỉnh sửa gen đang trở nên nổi bật. Đây có thể là một bước tiến để ứng dụng vào việc nghiên cứu các giống hồ tiêu kháng tuyến trùng.

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

Cho đến nay trên thế giới đã có những nghiên cứu về việc ghép hồ tiêu. Tuy nhiên, vẫn chưa có nước nào phát triển tiêu ghép thành công, đưa cây tiêu ghép vào nghề trồng tiêu như là một cách nhân giống phổ biến, mà phần lớn các nước vẫn còn đang tiếp tục cách nhân giống truyền thống bằng hom dây thân và hom dây lươn. 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 cây tiêu ghép trồng ngoài đồng 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 với gen 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 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

Các mẫu hồ tiêu được thu từ các vùng trồng tiêu ở 8 tỉnh, có 39 dòng/giống hồ tiêu và 100 mẫu RAPD được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền.

Nguồn giống tuyến trùng *Meloidogyne*: Tuyến 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 tuyến trùng theo phương pháp lọc đã được mô tả bởi Hooper (1986).

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 giống tiêu rừng Nam Mỹ *Piper divaricatum* (HUIB_PD36).

Vật liệu gốc ghép và ngọn ghép: có 6 loại gốc ghép và 4 loại ngọn ghép 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 hấp tuyệt 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 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: 16 đặc điểm. Đối với phân tích cụm (R Development Core Team, 2008), tất cả các đặc điểm của mỗi lần gia nhập 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

DNA của các dòng/giống hồ tiêu được tách chiết từ lá non theo phương pháp CTAB và được tinh sạch qua cột silica.

Vùng gen ITS1-4 của các dòng/giống hồ tiêu được khuếch đại trong thể tích 25 μ L, sử dụng OneTaq® DNA Polymerase (Biolabs Inc., New England). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Các mẫu hiển thị một dải đơn rõ ràng được gửi giải trình tự đến Công ty Maccrogen, Hàn Quốc. Kết quả sẽ được phân tích để định danh loài.

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 môi RAPD nhằm chọn ra môi có tỷ lệ đa hình cao nhất. Các môi đa hình sau đó được sử dụng để khuếch đại 39 dòng/giống hồ tiêu để đánh giá tính đa dạng di truyền. Phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình của Truong và cộng sự (2013) với thể tích là 15 μ L.

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, kích thước bầu 13 x 23 cm. Khi cây được 3-5 lá thì tiến hành lấy 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 các rễ hồ tiêu 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. cognita* gây bệnh thực vật để thu trứng và tuyến trùng *M. Incognita* tuổi 2 (J2) (Châu &

Thanh, 2000). Sau đó, tiến hành nhân giống tuyến trùng *M. Cognita* J2 trên giá thể cà chua.

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

+ **Tách chiết DNA tổng số:** khoảng 300 cá thể tuyến trùng *M. incognita* được ly tâm, chuyển sang ống 1,5 mL.

+ **Phương pháp lây nhiễm:** Lây nhiễm 1 lần khi cây giống 3 tháng tuổi. Mật độ tuyến trùng *M. incognita* sử dụng là 100 con tuổi 2 (J2) trên 100 g giá thể. Đổ 50 mL dung dịch có chứa khoảng 1.500 con tuyến trùng *M. incognita* cho mỗi bầu cây giống (1,5 kg giá thể). Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cây bị nhiễm bị vàng lá (%), tỷ lệ rễ bị nốt sừng (%)

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 nước trong bốn ngày. Tỷ lệ sống sót được xác định sau 15 ngày và đánh giá đặc điểm vi phẫu của các mẫu chịu úng theo mô tả của Tran và đồng nghiệp (2022).

2.3.3. **Phát triển chỉ thị phân tử DNA liên kết với gen kháng tuyến trùng của cây hồ tiêu bằng phương pháp BSA**

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

Kỹ thuật RAPD: Từ kết quả phân Đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn hồ tiêu, để tìm thêm băng đặc trưng cho các mẫu kháng tuyến trùng tiến hành sàng lọc thêm 100 mẫu RAPD.

Kỹ thuật BSA: Sử dụng phương pháp BSA (Bulked Segregant Analysis) (Michelmore và nnk., 1991; Truong và nnk., 2013) nhằm phát hiện nhanh chóng các đoạn DNA đặc hiệu cho các cá thể kháng tuyến trùng.

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

Thiết kế mẫu SCAR: Mẫu SCAR được thiết kế dựa vào trình tự giải mã của các đoạn RAPD liên kết với gen kháng và nhiễm tuyến trùng, sử dụng chương trình Primer3 4.0 (Rozen & Skaletsky, 1999).

Đánh giá độ nhạy của chỉ thị SCAR: Độ nhạy là nồng độ DNA thấp nhất có thể phát hiện ra bệnh thông qua kết quả PCR dương tính. Để chuẩn bị cho phản ứng PCR, mỗi mẫu DNA được pha loãng về các nồng độ 1, 5, 10, 20 ng/μl.

Đánh giá độ đặc hiệu của chỉ thị SCAR: Độ đặc hiệu là tỉ lệ các cá thể cho kết quả dương tính trên tổng số các cá thể thực hiện PCR với cặp mẫu trong Kit. Mẫu SCAR đã được tối ưu điều kiện PCR sẽ sử dụng để khuếch đại toàn bộ 39 dòng/giống hồ tiêu nhằm kiểm tra tính đa hình và tính kháng của chỉ thị phân tử SCAR với gen kháng tuyến trùng. Mỗi một phản ứng PCR được thực hiện dựa trên các thông số đã được tối ưu.

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 giống hồ tiêu mới

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

Tiến hành quan sát giai đoạn kéo dài gié (ngày) (từ khi xuất hiện gié đến lúc hoa đầu tiên nở), thời gian phân hóa hoa (ngày) (từ khi xuất hiện hoa đầu tiên đến khi gié 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/mỗi lần lặp, theo dõi 10 gié/3 cây, mỗi gié theo dõi 5 bông. Kỹ thuật lai được áp dụng theo kỹ thuật lai hoa tiêu của Viện Nghiên cứu Cây gia vị và Cây dược liệu Indonesia.

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 *M. incognita* của các gốc ghép hồ tiêu

Phương pháp thu tuyến trùng *Meloidogyne incognita*: Rễ hồ tiêu có nhiều nốt sưng 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) (Châu & Thanh, 2000).

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 tuyến trùng *M. incognita* là 100 con tuổi 2 (J2) trên 100 g giá thể. Đổ 50mL dung dịch chứa khoảng 1.500 con tuyến trùng *M. incognita* vào mỗi bầu cây giống (với 1,5 kg giá thể). Sau đó theo dõi tỉ lệ nhiễm tuyến trùng *M. incognita*.

Mức kháng: chia thành 5 mức 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: ghép nêm nổi ngọn.

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), Srilanka - SR (B3), Ấn Độ - AD (B4)). Đánh giá khả năng ghép thành công dựa vào tỉ lệ ghép sống (%) và sự sinh trưởng chiều cao của ngọn ghép sau 30, 60, 90 và 120 ngày.

Đánh giá khả năng tiếp hợp: thông qua mức độ tương đồng giải

phẫu giữa gốc ghép, ngọn ghép và mức độ tiếp hợp tại vị trí vết ghép khi cây ghép được 4 tháng.

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

Lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita* 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*.

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

Đánh giá khả năng sinh trưởng của các giống cây ghép hồ tiêu kháng tuyến trùng dựa trên Động thái tăng trưởng chiều cao cây, số lá, màu sắc lá, số đốt, màu sắc đốt và số 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 ($P < 0,05$) trong phần mềm SPSS của IBM. Phân tích cụm và thành phần chính được thực hiện bằng phần mềm R (R Development Core., 2008).

Phân tích kết quả định danh tập đoàn hồ tiêu:

Kết quả giải trình tự vùng gen ITSu1-4 được tập hợp và chỉnh sửa bằng phần mềm BioEdit v7.2.5. Các trình tự đã chỉnh sửa sau đó được ClustalW căn chỉnh trong MEGA X sau đó cây phát sinh loài được xây dựng. Các trình tự barcode được truy vấn để xác định loài dựa trên cơ sở dữ liệu GeneBank (NCBI) bằng cách sử dụng thuật toán Nucleotide BLAST.

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

Dựa trên kết quả điện di, 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". Dữ liệu ma trận nhị phân sẽ được sử dụng tính chỉ số đa dạng di truyền bằng phần mềm POPGENE1.32 và xây dựng cây phát sinh loài bằng NTSYS2.1.

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 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.

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.

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

16 đặc điểm hình thái ở tất cả các loại cây hồ tiêu đã được nghiên cứu. Kiểu sinh trưởng phổ biến nhất là cây leo (37 dòng/giống) trong khi dòng/giống HUIB_PR48 thân bò và HUIB_PH36 là dạng thân đứng. Tất cả các dòng/giống hồ tiêu có kiểu phân cành đa dạng trừ HUIB_PD36. Phần lớn các dòng/giống đều có nhiều chồi sinh ra từ thân. 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 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. Có ba hướng mọc của cành bên là dốc xuống, nằm ngang và mọc thẳng. Hình dạng phiến lá đa dạng từ hình ovan, ovan-elip, ovan-mũi mác, elip-mũi mác, hình tim. Hình dạng gốc lá với 4 kiểu hình là tròn, hình tim, nhọn và nhọn có góc. Mép lá có 2 kiểu là mép có sóng và mép lá bằng. 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. 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). 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.

3.1.2. Định danh các dòng/giống hồ tiêu đã thu thập bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Kết quả giải trình tự 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 cá thể 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 96-100% với loài *P. retrofractum* (MH493562) (HUIB_PR41 và HUIB_PR48), *P. hancei*

(EF450274) (HUIB_PH30 và HUIB_PH46), *P. divaricatum* (DQ868714) (HUIB_PD36) và *P. nigrum* (MH493477-MH493487, KF924121, KF924111) (ở các dòng/giống còn lại).

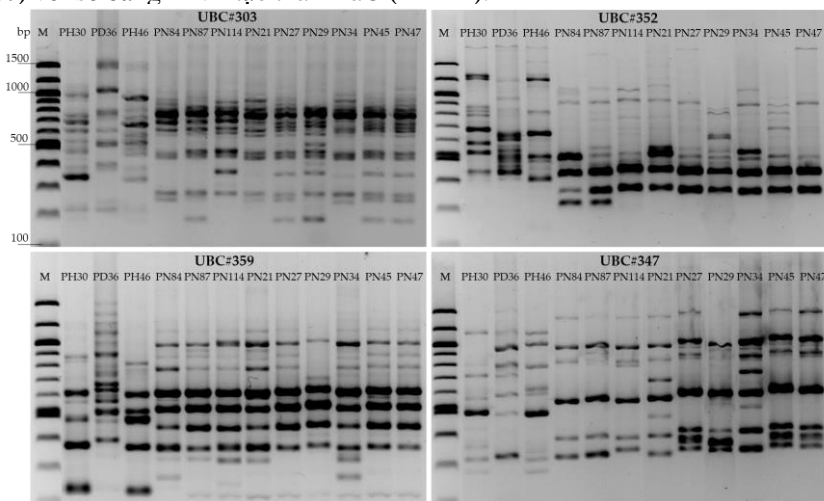
3.1.3. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn dòng/giống hồ tiêu bằng chỉ thị phân tử

Kết quả tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số tách chiết từ lá cho một băng duy nhất, sạch, không đứt dây, rõ nét. Chất lượng DNA đảm bảo để làm nguyên liệu cho những thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả sàng lọc môi RAPD: chỉ có 12 môi RAPD cho số băng đa hình cao nhất đã được chọn để nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền bằng kỹ thuật RAPD cho 39 cá thể hồ tiêu.

Kết quả phân tích RAPD của quần thể hồ tiêu

Số băng khuếch đại được ở các cá thể hồ tiêu khác nhau đối với 12 môi nghiên cứu đều cho tỷ lệ cao (thấp nhất là 14 băng chiếm 2,597% ở HUIB_PN10, HUIB_PN70 và HUIB_PN93) và cao nhất là 22 băng chiếm 4,082% ở HUIB_PN29. Đã có 40 băng DNA được khuếch đại từ 12 môi ngẫu nhiên, tất cả đều là băng đa hình, kích thước băng dao động từ 200-1400bp. UBC#303, UBC#352, UBC#359, UBC#347 và UBC#392 là môi có số mẫu được khuếch đại nhiều nhất (100 %) tiếp đến là UBC#377 (96,774 %) với số băng DNA tạo thành là 5 (Hình 1).



Hình 1. 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

Phân tích sự đa dạng của các cá thể trong quần thể hồ tiêu cho thấy có sự đa dạng lớn trong các mẫu nghiên cứu. UBC#329 thể hiện sự đa dạng cao nhất với giá trị H_o đạt trung bình 0.533224, tiếp đến là môi UBC#317. Sự đa dạng thấp nhất là ở môi UBC#322 (Bảng 1).

Bảng 1. 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)

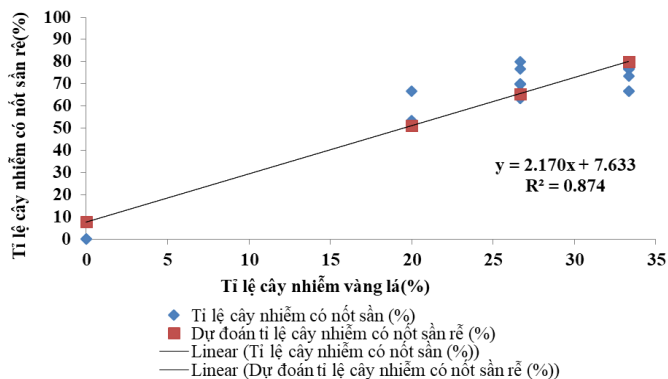
* H_0 = Chỉ số đa dạng di truyền Shannon (Lewontin, 1972)

Với 12 môi nghiên cứu, hệ số tương đồng di truyền giữa các cá thể biến động từ 0.418-1.000. Dựa vào hệ số tương đồng di truyền quần thể hồ tiêu được chia làm 2 nhóm chính.

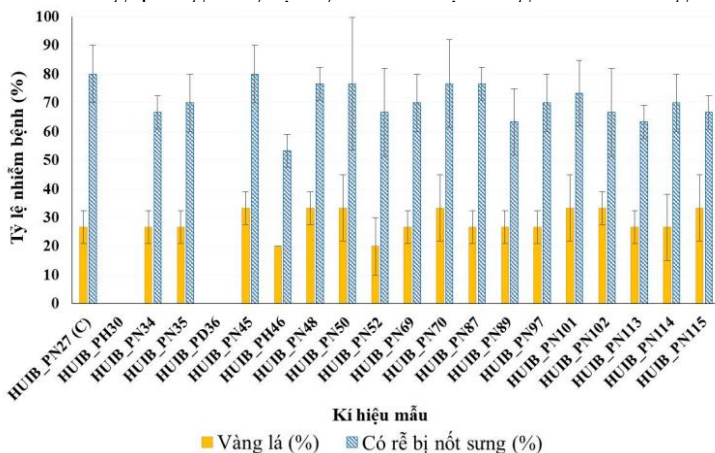
3.2. Chọn lọc các dòng/giống hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng nốt sùng (*Meloidogyne incognita*) và chịu úng

3.2.1. Đánh giá khả năng kháng tuyến trùng nốt sùng (*Meloidogyne incognita*) của tập đoàn hồ tiêu

Đã tìm thấy mối tương quan chặt chẽ về tỷ lệ nốt sần trên rễ và tỉ lệ vàng lá (Hình 2). 4 tháng sau khi lây nhiễm tuyến trùng, lá vàng xuất hiện ở hầu hết các dòng/giống (20,00-33,33%), 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 (80%), ngoại trừ ở HUIB_PH30 và HUIB_PD36. Hai dòng/giống HUIB_PH30 và HUIB_PD36 không có dấu hiệu nhiễm *M. incognita*. Trong khi, HUIB_PH46 tương đối nhạy cảm với *M. incognita* (Hình 3).



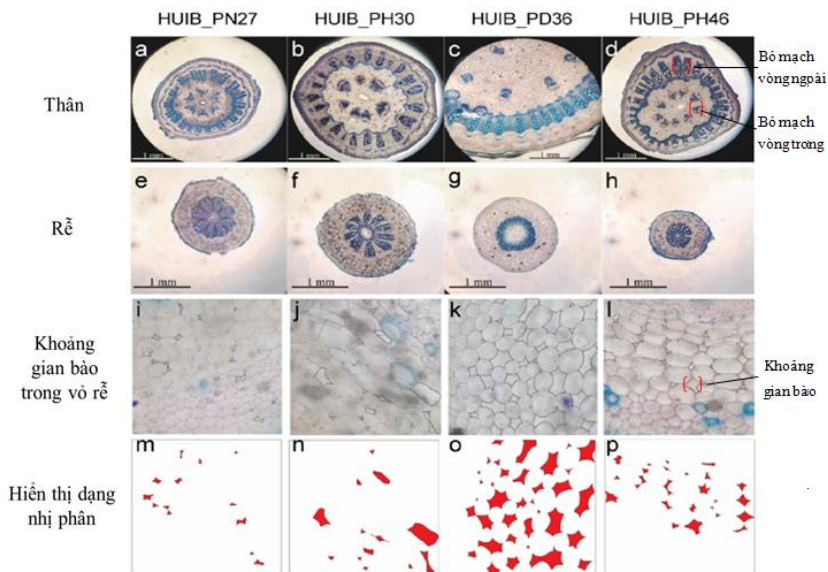
Hình 2. Tương quan giữa tỷ lệ cây có biểu hiện vàng lá và nốt sùng trên rễ



Hình 3. So sánh tỷ lệ cây có biểu hiện vàng lá và tỷ lệ cây có biểu hiện vàng lá rễ có nốt sần sau 4 tháng cây *Meloidogyne incognita*.

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

Chỉ 3 dòng/giống HUIB_PH30, HUIB_PD36 và HUIB_PH46 có tỷ lệ sống sót sau khi xử lý ngập úng đạt 100%. Đặc điểm vi phẫu thân, rễ cho thấy cả 3 dòng/giống có khả năng chịu úng tốt là dòng/giống HUIB_PH30, dòng/giống HUIB_PD36 và dòng/giống HUIB_PH46 có khoảng gian bào lớn hơn so với dòng/giống HUIB_PN27, giúp tạo điều kiện cho oxy vào thân và rễ (Hình 4).



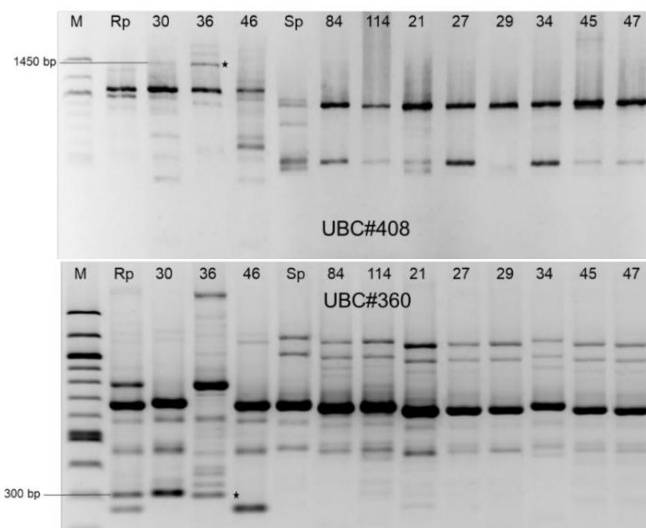
Hình 4. Đặc điểm hình thái vi mô của (a-d) thân và (e-h) rễ thu được từ bổ sung và kiểm soát ngập úng (i-l) Vỏ rễ (lớp phủ (được vẽ trong CorelDRAW) được chỉ định khoảng gian bào trong vỏ rễ) (m-p) Hình ảnh nhị phân thu được từ vỏ gốc tương ứng (i-l)

3.3. Phát triển chỉ thị phân tử DNA liên kết với gen 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 gen kháng tuyến trùng bằng phương pháp BSA

Từ kết quả khuếch đại đối với 200 môi RAPD 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.

3 môi UBC#401, UBC#408, UBC#360 đã được sử dụng để khuếch đại pool kháng, pool nhiễm và các dòng/giống hồ tiêu để tạo hai pool. 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 tiêu HUIB_PH30, HUIB_PD36 (Hình 5). Trong đó, băng đặc trưng hay đoạn DNA liên kết với gen kháng tuyến trùng là băng 1450 bp ở môi UBC#408 và băng 300 bp ở môi UBC#360.



Hình 5. Kết quả khuếch đại của hai môi UBC#360 và UBC#408 đối với pool kháng (Rp), pool nhiễm (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 gen kháng tuyến trùng.

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

Nhân dòng và giải trình tự các đoạn RAPD

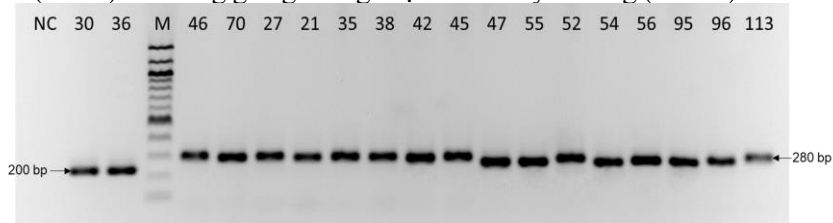
Trong số 2 bảng đặc trưng chỉ nhân dòng, giải trình tự thành công cho một bảng đặc trưng cho mẫu kháng tuyến trùng (300bp của môi UBC#360). Dựa vào trình tự này, đã có 2 cặp môi SCAR được thiết kế (Bảng 2). Từ 2 cặp môi này có thể ghép cặp để tạo ra 4 cặp môi nhằm tiến hành phân tích SCAR. Kết quả phản ứng khuếch đại với 4 cặp môi SCAR cho thấy: chỉ có cặp môi 30- 360F1R2 cho thấy *HUIB_PH30* và *HUIB_PD36* có 1 băng DNA kích thước ngang nhau, trong khi mẫu *HUIB_PN46* và *HUIB_P70* có băng kích thước lớn hơn. Cặp môi này được chọn để phân biệt các cá thể kháng/nhiễm tuyến trùng.

Bảng 2. Các môi được thiết kế cho phân tích SCAR

Tên môi	Trình tự (5'-3')	Nhiệt độ ủ (°C)
30-360F1	CTCTCCAGGCCTTCCCCATC	64.6
30-360R1	CTCTCCAGGCAAAACCAGTT	58.4
30-360F2	GCCCTCCTCATCTTGCCAAT	60.5
30-360R2	TCGGTCTACAGCTTCTTTCCA	59.4

Chỉ thị SCAR có độ nhạy với DNA ở nồng độ thấp (5-10 ng/ul). Kết quả phân tích độ đặc hiệu của cả bộ Kit cho thấy các cặp môi có độ đặc hiệu

cao (100%) cho dòng/giống kháng hoặc nhiễm tuyến trùng (Hình 6).



Hình 6. Kết quả khuếch đại của cặp mồi 39-360F1R2 với một số dòng/giống hồ tiêu sử dụng các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR. M: 100 bp Ladder; *HUIB_PH30* (30), *HUIB_PD36* (36), *HUIB_PH46* (46), *HUIB_PN70* (70), *HUIB_PN27* (27), *HUIB_PN21* (21), *HUIB_PN35* (35), *HUIB_PN38* (38), *HUIB_PN42* (42), *HUIB_PN45* (45), *HUIB_PN47* (47), *HUIB_PN55* (55), *HUIB_PN52* (52), *HUIB_PN54* (54), *HUIB_PN56* (56), *HUIB_PN95* (95), *HUIB_PN96* (96) và *HUIB_PN113* (113).

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 giống hồ tiêu mới

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

Sự phát triển gié tiêu có thể chia làm 5 giai đoạn: (1) Giai đoạn xuất hiện gié; (2) Giai đoạn kéo dài gié; (3) Giai đoạn thụ phấn - thụ tinh; (4) Giai đoạn sau thụ phấn – quả đầu định và (5) Giai đoạn chín. Giai đoạn kéo dài gié: là giai đoạn quyết định số lượng hoa trên gié kéo dài từ 14,0 – 22,1 ngày. 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 còn lại. Các dòng/giống tiêu *HUIB_PN27*, *HUIB_PN96* và *HUIB_PN69* có thời gian kéo dài gié không khác biệt nhau có ý nghĩa ở mức $P < 0,01$.

Gié tiêu có xu hướng nở theo hướng từ trên xuống dưới, từ cuống tới chóp gié. 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, dài nhất là giống *HUIB_PN27* (17,3 ngày). Khoảng cách lệch giao của các dòng/giống nghiên cứu từ 1,7 - 7,6 ngày. Giống *HUIB_PN101* có khoảng cách xuất hiện nhụy và nhị ngắn nhất (1,7 ngày).

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

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

Tỷ lệ rụng gié sau khi thụ phấn của các tổ hợp lai khác loài dao động từ 30,00 – 56,67%. Trong đó, tổ hợp lai ♂*HUIB_PD36* x ♀*HUIB_PN97* có tỷ lệ rụng gié cao nhất (56,67%), tổ hợp lai ♂*HUIB_PN97* x ♀*HUIB_PN27* có tỷ lệ rụng gié thấp nhất (30,00%). Khi tiến hành lai xa

khác loài giữa tiêu trồng với tiêu rừng Nam Mỹ (HUIB_PD36) thì tỷ lệ đậu quả của các tổ hợp lai rất thấp, chỉ đạt 4,67 - 7,33%.

Năm 2021 đã thu được hạt lai và gieo ươm lên cây 2 lá mầm của tổ hợp lai ♂HUIB_PD36 x ♀HUIB_PN97. Tuy nhiên, cây lai này không phát triển thêm mà chỉ dừng lại ở giai đoạn lá mầm rồi suy yếu và chết (Hình 7). 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 7). Các hạt lai còn lại đều không nảy mầm.



Hình 7. Cây lai của tổ hợp ♂HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN97 (bên trái), Cây lai của tổ hợp ♂HUIB_PD36 x ♀ HUIB_PN27(bên phải)

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

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

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

Giai đoạn trước thí nghiệm đến sau khi lây nhiễm tuyến trùng 60 ngày, sinh trưởng chiều cao cây của các vật liệu 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, HUIB_PH30 có sinh trưởng chiều cao cây vượt trội và khác biệt rất có ý nghĩa so với 4 vật liệu còn lại. Các vật liệu còn lại sinh trưởng chiều cao cây mức tương đương nhau.

Khả năng kháng tuyến trùng *M. incognita* của các vật liệu gốc ghép

Không thấy xuất hiện tuyến trùng trong giá thể, 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 trong giá thể với mật độ rất thấp 6,00 con/100 g đất, không xuất hiện tuyến trùng trong rễ và rễ không có nốt sưng. Chúng tỏ vật liệu này có khả năng kháng cao với

tuyến trùng. Ba vật liệu còn lại có khả năng chống chịu với tuyến trùng rất kém, không phù hợp làm gốc ghép hồ tiêu (Bảng 3).

Bảng 3. Mật độ tuyến trùng và tỷ lệ rễ bị nốt sùng của các vật liệu gốc ghép

Ký hiệu vật liệu	Tên địa phương của vật liệu	Mật độ tuyến trùng		Tỷ lệ rễ bị u sùng (%)
		Trong đất (con/100 g đất)	Trong rễ (con/5 g rễ)	
HUIB_PN105	Tiêu địa phương Đăk 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		**	**	**

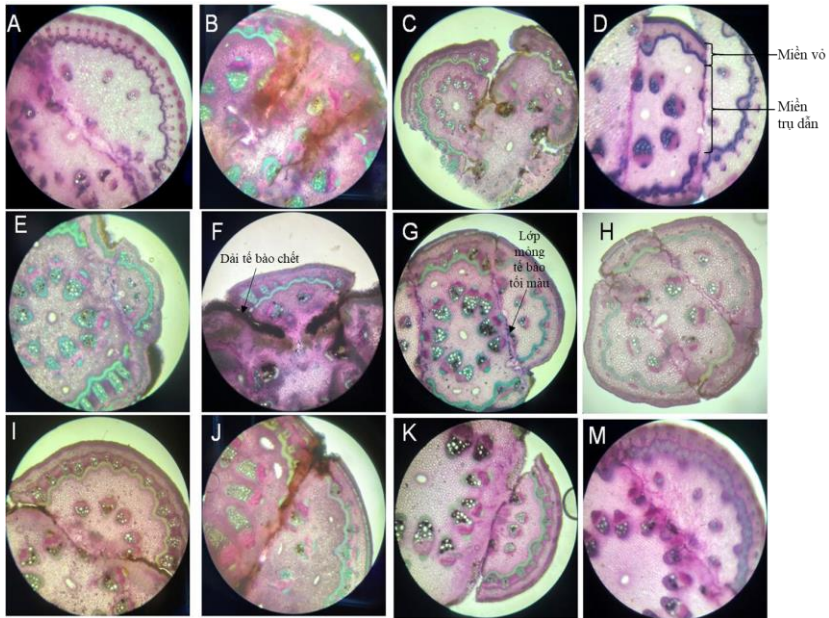
3.5.2. Đánh giá khả năng ghép thành công và khả năng tiếp hợp của các tổ hợp ghép

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

Ngon ghép tiêu Lộc Ninh tỏ ra không tương thích với cả 3 gốc ghép nên có tỷ lệ sống sau ghép thấp hơn hẳn. Ngon ghép tiêu 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 ngon ghép tiêu Vĩnh Linh, Tiêu 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

Kết quả giải phẫu chỉ ra sự không tương đồng về kích thước của gốc ghép và ngon ghép có ảnh hưởng lớn tỷ lệ sống và sinh trưởng của tổ hợp ghép. Ngon ghép tiêu Vĩnh Linh có sự tiếp hợp tốt nhất, tiếp theo là ngon ghép tiêu Ấn Độ. Ngon ghép tiêu Sri Lanka có kích thước khá lớn nên khả năng tiếp hợp bị hạn chế. Trong khi đó ngon ghép tiêu Lộc Ninh có sự tiếp hợp không hoàn toàn, hình thành nhiều tế bào chết, điều này có thể là do ngon ghép là dây thân nên sẽ có đường kính lớn và bị già (Hình 8).



Hình 8. Khả năng tiếp hợp của gốc ghép HUIB_PH30, HUIB_PD36, HUIB_PH46 với các ngọn ghép tiêu Vĩnh Linh, tiêu Lộc Ninh, tiêu Siri Lanka, Ấn Độ.

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

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.. Tốc độ tăng trưởng số lá của các tổ hợp ghép HUIB_PH30 - tiêu Vĩnh Linh là tốt nhất đạt 1,44 lá/tháng, tiếp đến là tổ hợp ghép HUIB_PH30 – tiêu Ấn Độ (1,22 lá/30 ngày), HUIB_PH30 - tiêu Vĩnh Linh (1,17 lá/30 ngày). Các tổ hợp ghép còn lại có tốc độ tăng trưởng số lá khá chậm

Khả năng kháng tuyến trùng của các tổ hợp ghép

Kết quả theo dõi mật độ tuyến trùng trong đất, rễ và tỷ lệ rễ bị u

sung cho thấy không xuất hiện tuyến trùng *M. incognita* gây hại trong đất và trong rễ vì vậy cũng không có rễ bị u sưng trên tất cả các tổ hợp ghép. Điều này chứng tỏ các tổ hợp ghép có khả năng kháng tuyến trùng rất tốt.

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 dòng/giống là khác nhau, cao nhất là M1 36 - VL (21.10 cm), thấp nhất là M4 36 - AD (0.00 cm). Ở giai đoạn sau 60 - 90 ngày trồng, tốc độ tăng trưởng chiều cao ở 2 dòng/giống 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 dòng/giống M5 30 - VL, M3 36 - SR và M1 36 - VL

Động thái tăng trưởng số lá

Sau 30 ngày trồng ở nhà màng các dòng/giống 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. Ngoài ra màu sắc lá cũng có sự khác biệt giữa các dòng/giống, đa số dòng/giống có lá mới ra màu tím, chỉ trừ M7 30 - SR và M3 36 - SR có màu xanh.

Động thái tăng trưởng số đốt

Số đốt trong 30 ngày sau đưa ra nhà màng của các dòng/giống là khác nhau có ý nghĩa thống kê, nhiều nhất là giống M1 36 - VL (4,60 đốt), thấp nhất là M7 30 - SR, M6 30 - LN và M4 36 - AD (1,00 đốt). Giống 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, giống M4 36 - AD có số lượng đốt thấp nhất là 6,60 đốt. Ngoài ra, hai dòng/giống M5 30 - VL và M3 36 - SR cũng cho thấy sự tăng trưởng lớn về số đốt sau 120 ngày.

Động thái tăng trưởng số cành

Hầu hết các dòng/giống chỉ tăng trưởng 1 cành sau 30 ngày trồng ngoài nhà màng, trừ M5 30 - VL (tăng 2,4 cành). Giống 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 M5 30 - VL đạt 4,8 cành. Trong khi, dòng/giống M6 30 - LN có số lượng cành thấp nhất.

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 và nhóm II 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 (1450bp 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 giá 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 pepper (*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.