

Assessment of the effectiveness of some antibiotics in limiting the growth of some endogynous bacteria causing infections during *in vitro* cutting of black pepper plant (*Piper nigrum* L.)

Kiet C. Nguyen*, Tri M. Bui, & An T. Nguyen
Faculty of Agronomy, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Research Paper Received: August 17, 2024 Revised: September 30, 2024 Accepted: October 04, 2024 Keywords Antibiotics Endophytic bacteria <i>In vitro</i> cuttings <i>Piper nigrum</i> L. Vinh Linh black pepper *Corresponding author Nguyen Cao Kiet Email: kiet.nguyencao@hcmuaf.edu.vn	Determining the optimal type and concentration of antibiotics to be added to the <i>in vitro</i> rooting medium for Vinh Linh black pepper plants is currently an important issue. This will enhance the breeding efficiency and meet the quality and quantity demands for seedlings in the market. The study aimed to determine the effectiveness of three antibiotics Ampicillin, Cefotaxime and Gentamicin on endophytic bacteria isolated from black pepper stem nodes and to determine the appropriate antibiotic concentration to control endophytic bacteria growing during <i>in vitro</i> cuttings of Vinh Linh black pepper plants. The study included two experiments: the experiment 1 was to determine the effectiveness of antibiotics and antibiotic concentrations against endophytic bacteria isolated from black pepper stem segments and the experiment 2 was to determine the appropriate antibiotics and antibiotic concentrations to prevent endophytic bacteria growing from <i>in vitro</i> black pepper stem segments. Each experiment had 2 factors arranged according to a completely randomized design with 3 repetitions. The results showed that for endophytic bacteria in the stem nodes of Vinh Linh black pepper after being isolated, the antibiotic concentration used was 20 mg/L of all 3 tested antibiotics, which allowed inhibition of colony formation. Meanwhile, the use of Gentamicin antibiotic at a concentration of 40 mg/L gave the best disinfection effect. Under this disinfection condition, the highest survival rate was 89%. The shoot height of Vinh Linh black pepper was highest, reaching 20 mm.

Cited as: Nguyen, K. C., Bui, T. M., & Nguyen, A. T. (2025). Assessment of the effectiveness of some antibiotics in limiting the growth of some endogynous bacteria causing infections during *in vitro* cutting of black pepper plant (*Piper nigrum* L.). *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 10-21.

Đánh giá hiệu quả của một số kháng sinh trong hạn chế sự phát triển của một số vi khuẩn nội sinh gây nhiễm trong quá trình giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.)

Nguyễn Cao Kiệt*, Bùi Minh Trí & Nguyễn Tấn An
Khoa Nông Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 17/08/2024
Ngày chỉnh sửa: 30/09/2024
Ngày chấp nhận: 04/10/2024

Từ khóa

Kháng sinh
Giâm cành *in vitro*
Piper nigrum L.
Tiêu Vĩnh Linh
Vi khuẩn nội sinh

***Tác giả liên hệ**

Nguyễn Cao Kiệt
Email:
kiet.nguyencao@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Việc xác định loại và nồng độ kháng sinh tối ưu để bổ sung vào môi trường giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu Vĩnh Linh là vấn đề cần được quan tâm hiện nay, điều này sẽ cho phép nâng cao hiệu quả nhân giống, đáp ứng được nhu cầu chất lượng và số lượng cây giống cho thị trường. Nghiên cứu nhằm xác định hiệu quả của ba loại kháng sinh Ampicillin, Cefotaxime, Gentamicin đối với các vi khuẩn nội sinh phân lập từ đốt thân cây hồ tiêu và xác định nồng độ kháng sinh phù hợp để kiểm soát vi khuẩn nội sinh phát triển trong quá trình giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu Vĩnh Linh. Nghiên cứu gồm 2 thí nghiệm: thí nghiệm 1, xác định hiệu quả của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đối với các vi khuẩn nội sinh phân lập từ đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh; thí nghiệm 2, xác định loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh phù hợp để ngăn chặn vi khuẩn nội sinh phát triển từ mẫu đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*. Mỗi thí nghiệm có 2 yếu tố được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các kết quả đã chỉ ra rằng đối với các vi khuẩn nội sinh trong đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh sau khi được phân lập thì nồng độ kháng sinh được sử dụng là 20 mg/L của cả 3 loại kháng sinh thử nghiệm đều cho phép ức chế sự hình thành của khuẩn lạc. Trong khi đó, việc sử dụng kháng sinh Gentamicin ở nồng độ 40 mg/L cho hiệu quả khử trùng tốt nhất. Trong điều kiện khử trùng này, tỷ lệ sống cao nhất với tỷ lệ là 89%. Chiều cao chồi cây tiêu Vĩnh Linh cao nhất đạt 20 mm.

1. Đặt Vấn Đề

Hồ tiêu là cây gia vị quan trọng ở các nước châu Á, được coi là vua các loại gia vị và có nhiều giá trị dược liệu (Do, 2004). Trong đó, hồ tiêu Vĩnh Linh là loài cây không những có năng suất, chất lượng tốt mà còn có giá trị kinh tế cao tại Việt Nam. Hình thức nhân giống cây hồ tiêu hiện nay chủ yếu là biện pháp giâm cành, đây là kỹ thuật còn nhiều hạn chế, khó kiểm soát nguồn bệnh từ cây mẹ. Trong khi đó, giâm cành *in vitro* là hình thức nhân giống vô tính, giúp tạo ra cây sạch bệnh và có thể nhân nhanh ở quy mô công nghiệp (Nguyen & ctv., 2019).

Để giâm cành *in vitro* đạt hiệu quả, bước khử trùng mẫu có tầm quan trọng vì yêu cầu phải loại trừ được các nhóm vi sinh vật. Trong các nhóm nấm và vi khuẩn, vi khuẩn nội sinh có khả năng xâm nhiễm sâu trong mô cây và tồn tại lâu dài, do đó thường không có nhiều giải pháp; cách xử lý phổ biến và hiệu quả là dùng kháng sinh để ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn. Mặt khác, mẫu cây trồng ngoài tự nhiên thường bị nhiễm một số vi khuẩn nội sinh làm cho việc khử trùng mẫu khó khăn, nhất là những cây có giá trị kinh tế cao như cây hồ tiêu. Vi khuẩn nội sinh cư trú ở bề mặt hoặc phân bố bên trong thực vật, duy trì môi trường hóa học bình thường của thực vật, chỉ có quan hệ hỗ trợ, cộng sinh với thực vật (Strobel, 2004). Tuy nhiên, đối với môi trường *in vitro* thì vi khuẩn nội sinh trong thân tiêu cần được ngăn chặn nhằm cho phép cây hồ tiêu sinh trưởng tốt.

Chính vì vậy, việc xác định loại và nồng độ kháng sinh tối ưu là hết sức cần thiết, điều này sẽ cho phép nâng cao hiệu quả giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu Vĩnh Linh, đáp ứng được nhu cầu chất lượng và số lượng cây giống cho thị trường.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm nghiên cứu vi sinh vật và Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô thuộc Khu thực nghiệm Bộ môn Sinh lý – Sinh hóa, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 02/2024 đến tháng 8/2024.

2.2. Thiết kế thí nghiệm

2.2.1. Thí nghiệm 1: Xác định hiệu quả của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đối với các vi khuẩn nội sinh phân lập từ đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh

Thí nghiệm 1 có 2 yếu tố: yếu tố K là 3 loại kháng sinh gồm Ampicillin, Cefotaxime và Gentamicin và yếu tố N là 4 nồng độ kháng sinh gồm 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, và 20 mg/L. Thí nghiệm bao gồm 12 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi lần lặp lại của một nghiệm thức là 5 đĩa petri.

2.2.2. Thí nghiệm 2: Xác định loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh phù hợp để ngăn chặn vi khuẩn nội sinh phát triển trên mẫu đốt thân cây hồ tiêu *in vitro*

Thí nghiệm 2 có 2 yếu tố: yếu tố K là 3 loại kháng sinh gồm Ampicillin, Cefotaxime và Gentamicin và yếu tố N là 3 nồng độ kháng sinh gồm 20 mg/L, 40 mg/L và 60 mg/L. Thí nghiệm bao gồm 9 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi lần lặp lại của một nghiệm thức là 3 bình. Mỗi bình chứa 1 mẫu.

2.3. Phương pháp thí nghiệm

Thí nghiệm 1 được thực hiện trên đĩa petri, chọn loại vi khuẩn nội sinh được phân lập từ đốt thân hồ tiêu Vĩnh Linh có màu trắng đục đã được

phân lập trước đó theo mô tả của Nguyen & ctv. (2018) để tiến hành thí nghiệm. Nồng độ kháng sinh được xác định thông qua quy trình MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Sau đó, môi trường NA được pha có bổ sung 3 loại kháng

sinh với 4 nồng độ đã đề cập. Mẫu vi khuẩn nội sinh được cấy vào đĩa petri có môi trường đã chứa kháng sinh bằng phương pháp cấy chằng. Các kết quả nồng độ của thí nghiệm 1 là cơ sở để chọn nồng độ kháng sinh cho thí nghiệm 2.



Hình 1. Đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh.

Đối với thí nghiệm 2, đốt thân cây hồ tiêu (Hình 1) được khử trùng bằng dung dịch C_2H_5OH 70% trong 60 giây, sau đó, mẫu được xử lý với dung dịch đồng sunfat ($CuSO_4$) 1% trong 10 phút và bằng dung dịch Javen 0,1% trong 20 phút. Tiếp theo, mẫu được ngâm trong dung dịch chứa 3 loại kháng sinh với 3 nồng độ như đã đề cập trong 30 phút. Cuối cùng, mẫu được rửa lại bằng nước cất hấp khử trùng 5 lần để loại bỏ các hóa chất còn sót lại (sau mỗi bước sử dụng hóa chất đều rửa lại với nước 2 lần). Nước rửa mẫu ở lần thứ 5 được cấy vào môi trường NA để kiểm tra không có sự hiện diện của vi khuẩn ngoại sinh. Mẫu đốt thân hồ tiêu được cấy vào môi trường MS có chứa 3 loại kháng sinh với 3 nồng độ như đã đề cập.

2.4. Chỉ tiêu theo dõi

2.4.1. Thí nghiệm 1

Khuẩn lạc được theo dõi hàng ngày liên tục trong 5 ngày bao gồm các chỉ tiêu:

Số khuẩn lạc hình thành (số): đếm số khuẩn lạc có trên đĩa.

Đường kính khuẩn lạc (mm): đo đường kính trung bình các của các khuẩn lạc sau cấy.

2.4.2. Thí nghiệm 2

Các chỉ tiêu của mẫu đốt thân hồ tiêu Vĩnh Linh được theo dõi 6 ngày/lần, trong vòng 30 ngày bao gồm:

Chiều cao chồi (cm): đo chiều chồi tính từ điểm phân chồi.

Tỷ lệ nhiễm khuẩn (%): tính số mẫu bị nhiễm/tổng số mẫu cấy ở từng nghiệm thức.

Tỷ lệ sống (%): tính phần trăm mẫu sống ở từng nghiệm thức.

2.5. Xử lý số liệu

Dữ liệu được lưu trữ bằng Excel 2010 (Microsoft, Hoa Kỳ). R (phiên bản 4.2.3) được sử dụng để thực hiện bảng ANOVA và trắc nghiệm phân hạng bằng Duncan ở $\alpha = 0,05$ hoặc $\alpha = 0,01$ hoặc $\alpha = 0,001$. Các số liệu về số khuẩn lạc và đường kính khuẩn lạc trong thí nghiệm 1

được chuyển đổi bằng công thức $\log(x+1)$. Các số liệu về tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ sống ở thí nghiệm 2 đã được chuyển đổi bằng công thức trước khi phân tích thống kê, giá trị 0 được thay thế bằng $1/4n$ và 100 được thay thế bằng $100 - 1/4n$ ($n = 9$ mẫu) trước khi công thức được áp dụng (Gomez & Gomez, 1984).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Ảnh hưởng của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đối với vi khuẩn nội sinh phân lập từ đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh

3.1.1. Xác định hiệu quả của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đến số khuẩn lạc của vi khuẩn nội sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Các kết quả ở Bảng 1 chỉ ra rằng ở yếu tố loại kháng sinh cùng với sự tương tác giữa các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, số khuẩn lạc ở nồng độ kháng sinh sử dụng là 20 mg/L ghi nhận không có sự hình thành khuẩn lạc, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các loại kháng sinh và các nồng độ kháng sinh đến số khuẩn lạc (khuẩn lạc) của vi khuẩn nội sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)				Trung bình (K)
		5	10	15	20	
1	Ampicillin	115,3	59,7	0,0	0,0	43,6
	Cefotaxime	101,3	45,0	0,0	0,0	36,1
	Gentamicin	99,6	41,3	0,0	0,0	35,6
	Trung bình (N)	105,4 ^a	48,4 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	
CV(%) = 8,9%; $F_K = 1,6^{ns}$; $F_N = 1523,8^{***}$; $F_{K*N} = 0,7^{ns}$						
3	Ampicillin	115,3	59,7	1,8	0,0	44,0
	Cefotaxime	101,3	45,0	1,6	0,0	36,6
	Gentamicin	99,7	41,3	1,0	0,0	35,9
	Trung bình (N)	105,4 ^a	48,4 ^b	1,46 ^c	0,0 ^c	
CV(%) = 8,5%; $F_K = 3,3^{ns}$; $F_N = 1142,5^{***}$; $F_{K*N} = 0,7^{ns}$						
5	Ampicillin	115,3	59,7	1,8	0,0	44,0
	Cefotaxime	101,3	45,0	1,6	0,0	36,7
	Gentamicin	99,7	41,3	1,0	0,0	35,9
	Trung bình (N)	105,4 ^a	48,4 ^b	1,46 ^c	0,0 ^c	
CV(%) = 8,5%; $F_K = 3,3^{ns}$; $F_N = 1142,5^{***}$; $F_{K*N} = 0,7^{ns}$						

Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện. ns: không khác biệt; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Các kết quả ở Bảng 1 chỉ ra rằng ở yếu tố loại kháng sinh cùng với sự tương tác giữa các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, số khuẩn lạc ở nồng độ kháng sinh sử dụng là 20 mg/L ghi nhận không có sự hình thành khuẩn lạc, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.

3.1.2. Xác định hiệu quả của kháng sinh và nồng độ kháng sinh đến đường kính khuẩn lạc của vi khuẩn nội sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm

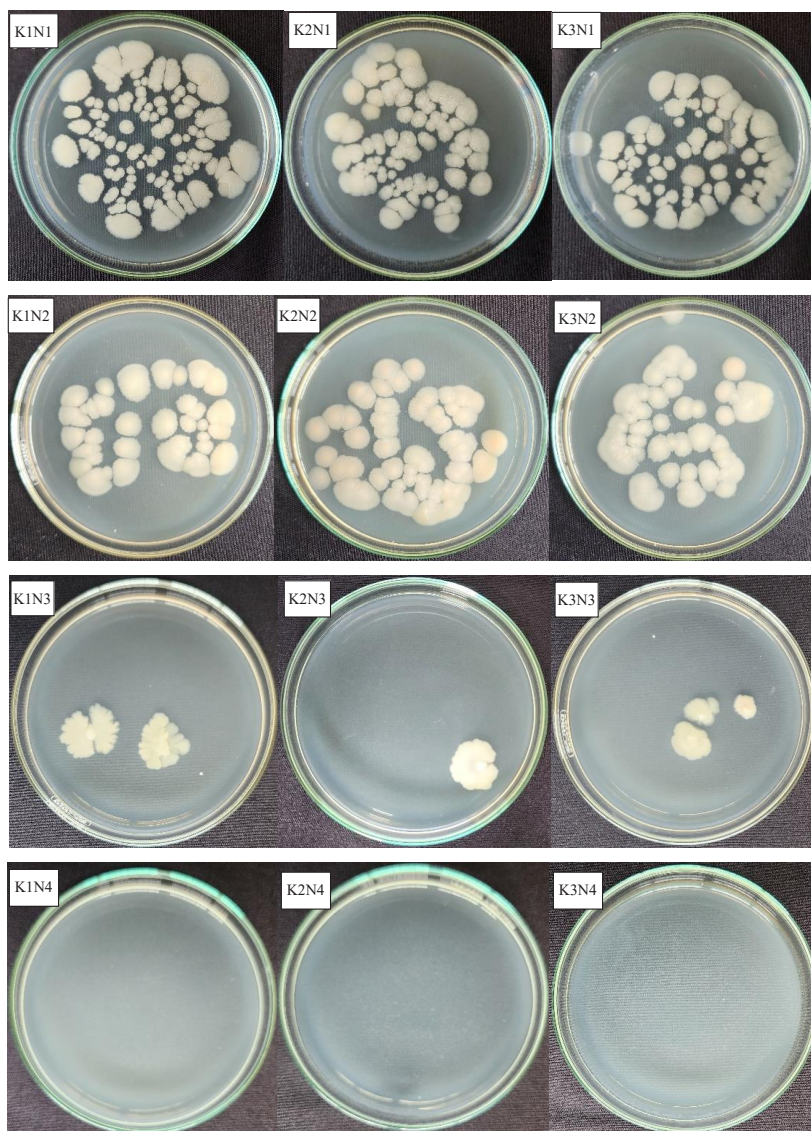
Bảng 2. Ảnh hưởng của các loại kháng sinh và các nồng độ kháng sinh đến đường kính khuẩn lạc (mm) của vi khuẩn nội sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)				Trung bình (K)
		5	10	15	20	
1	Ampicillin	1,3	1,2	0,0	0,0	0,6
	Cefotaxime	1,4	0,9	0,0	0,0	0,6
	Gentamicin	1,2	1,3	0,0	0,0	0,6
Trung bình (N)		1,3 ^a	1,6 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	
CV(%) = 21,4%; $F_K = 0,2^{ns}$; $F_N = 262,1^{***}$; $F_{K*N} = 1,4^{ns}$						
3	Ampicillin	5,2	6,0	1,6	0,0	3,2
	Cefotaxime	5,2	5,8	1,6	0,0	3,2
	Gentamicin	5,1	5,6	1,7	0,0	3,1
Trung bình (N)			5,2 ^b	5,8 ^a	1,6 ^c	0 ^d
CV(%) = 8,1%; $F_K = 0,1^{ns}$; $F_N = 781,4^{***}$; $F_{K*N} = 0,1^{ns}$						
5	Ampicillin	10,3 ^b	11,9 ^a	2,9 ^d	0,0 ^e	6,3 ^a
	Cefotaxime	8,2 ^c	11,9 ^a	3,1 ^d	0,0 ^e	5,8 ^b
	Gentamicin	8,6 ^c	11,8 ^a	3,1 ^d	0,0 ^e	5,5 ^b
Trung bình (N)		9 ^b	11,8 ^a	3 ^c	0 ^d	
CV(%) = 3,2%; $F_K = 2,2^{**}$; $F_N = 4546,7^{***}$; $F_{K*N} = 3,6^*$						

Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê. ns: không khác biệt; *: khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$; **: khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,01$; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Tại thời điểm 5 ngày sau cấy, xét theo yếu tố loại kháng sinh, đường kính khuẩn lạc của vi khuẩn nội sinh trên môi trường được bổ sung kháng sinh Gentamicin ghi nhận kết quả tốt nhất với đường kính khuẩn lạc là 5,5 mm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,01$. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, đường kính khuẩn lạc trên môi trường có bổ sung kháng sinh 20 mg/L ghi nhận kết quả không có sự hình thành, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.

Xét sự tương tác giữa các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh, đường kính khuẩn lạc trên môi trường được bổ sung mỗi kháng sinh với nồng độ kháng sinh ở 20 mg/L ghi nhận không có sự hình thành, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ (Hình 2). Các kết quả trên hoàn toàn là phù hợp vì kháng sinh có hiệu quả trong việc tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của vi khuẩn (Kohanski & ctv., 2010).



Hình 2. Các đĩa petri trong thí nghiệm 1 ở 5 ngày sau cấy. K1 là Ampicillin, K2 là Cefotaxime và K3 là Gentamicin, N1 là 5 mg/L, N2 là 10 mg/L, N3 là 15 mg/L, N4 là 20 mg/L.

3.2. Ảnh hưởng của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh phù hợp để ngăn chặn vi khuẩn nội sinh phát triển trên mẫu đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Kháng sinh đóng vai trò quan trọng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật bao gồm kỹ thuật giảm cạnh tranh *in vitro*, đặc biệt là trong việc kiểm soát sự nhiễm khuẩn bằng cách ngăn chặn sự phát của vi khuẩn và tăng cường sự sống sót của tế bào thực vật (Cassells, 1991; Kohanski & ctv., 2010).

3.2.1. Ảnh hưởng của các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đến chiều cao chồi hình thành từ đốt thân trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Kết quả Bảng 3 và Hình 3 cho thấy các mẫu đốt thân khi được xử lý với 3 loại kháng sinh ở nồng độ 20 mg/L đều bị nhiễm dẫn đến bị chết, do đó không thể hình thành chồi. Đến ngày thứ 30, các đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh chỉ còn sống trên môi trường có bổ sung kháng sinh Ampicillin, Cefotaxime, Gentamicin ở nồng độ 40 mg/L và Cefotaxime, Gentamicin ở nồng độ 60 mg/L.

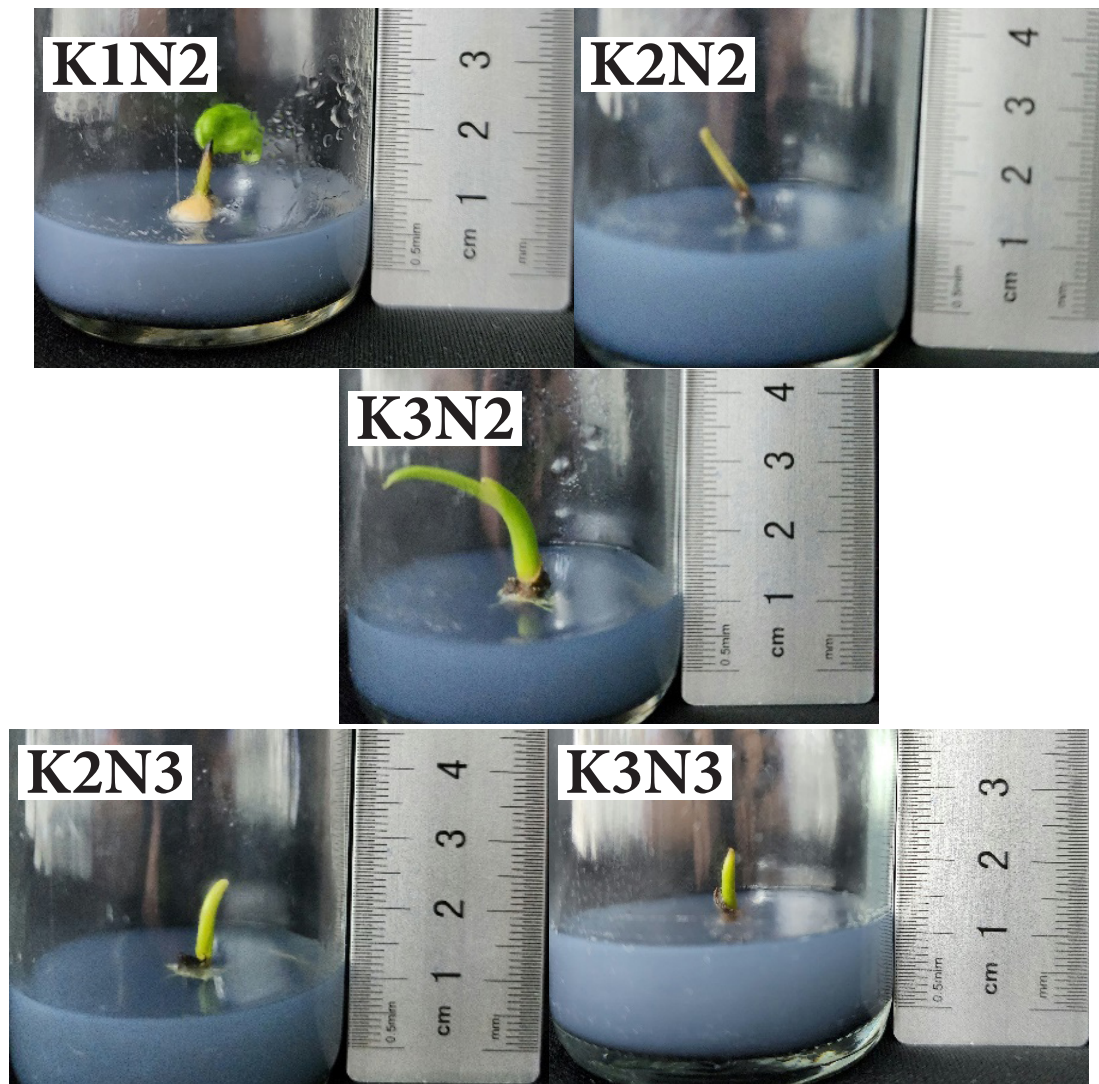
Bảng 3. Các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến chiều cao đốt thân (mm) trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)		
		20	40	60
6	Ampicillin	-	7,4 ^{ab}	5,7 ^{bc}
	Cefotaxime	-	7,6 ^{ab}	3,8 ^c
	Gentamicin	-	9,2 ^a	4,0 ^c
CV(%) = 8,5%; $F_K = 198,5^{***}$; $F_N = 5,3^*$; $F_{K \times N} = 16,1^{***}$				
12	Ampicillin	-	9,4 ^a	7,8 ^b
	Cefotaxime	-	9,2 ^a	5,7 ^c
	Gentamicin	-	10,3 ^a	6,5 ^c
CV(%) = 8,5%; $F_K = 83,4^{***}$; $F_N = 4,8^*$; $F_{K \times N} = 4,5^*$				
18	Ampicillin	-	11,2	8,7
	Cefotaxime	-	12,3	9,7
	Gentamicin	-	14,9	10,8
CV(%) = 18,4%; $F_K = 9,9^{**}$; $F_N = 3,0^{ns}$; $F_{K \times N} = 0,28^{ns}$				
24	Ampicillin	-	12,5 ^b	-
	Cefotaxime	-	13,9 ^{ab}	10,4 ^b
	Gentamicin	-	17,2 ^a	11,6 ^b
CV(%) = 9,6%; $F_K = 210,5^{***}$; $F_N = 95,9^{***}$; $F_{K \times N} = 30,0^{***}$				
30	Ampicillin	-	13,3 ^b	-
	Cefotaxime	-	14,5 ^b	11,5 ^b
	Gentamicin	-	20,0 ^a	12,3 ^b
CV(%) = 8,6%; $F_K = 273,0^{***}$; $F_N = 133,2^{***}$; $F_{K \times N} = 37,8^{***}$				

Dấu “-” là trường hợp các mẫu bị nhiễm vi khuẩn nội sinh dẫn đến bị chết và không hình thành chồi. ns: không khác biệt; *: khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$; **: khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,01$; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Từ 6 ngày đến 30 ngày sau cấy, chiều cao chồi hình thành hầu hết ở các bình được xử lý với 2 nồng độ kháng sinh là 40 mg/L và 60 mg/L, trong đó chiều cao chồi luôn đạt cao nhất

khi xử lý với Gentamicin ở nồng độ kháng sinh 40 mg/L, sự khác biệt rõ rệt với chiều cao đạt 20 mm vào ngày thứ 30, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.



Hình 3. Một số mẫu hồ tiêu Vĩnh Linh không bị chết do nhiễm khuẩn nội sinh ở thời điểm 30 ngày sau cấy. K1 là Ampicillin, K2 là Cefotaxime và K3 là Gentamicin, N2 là 40 mg/L, N3 là 60 mg/L.

3.2.2. Các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Các kết quả ở Bảng 4 chỉ ra rằng từ ngày 6 đến ngày thứ 12 sau cấy, xét yếu tố loại kháng sinh

và sự tương tác giữa loại và nồng độ kháng sinh, sự khác biệt tỷ lệ nhiễm khuẩn không có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó, xét yếu tố nồng độ kháng sinh, tỷ lệ nhiễm đạt 100% ở nồng độ 20 mg/L, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đến tỷ lệ nhiễm (%) trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)			Trung bình (K)
		20	40	60	
6	Ampicillin	100	33,0	55,3	62,7
	Cefotaxime	100	44,3	33,0	59,1
	Gentamicin	100	33,0	55,3	62,7
	Trung bình (N)	100 ^a	36,7 ^b	47,8 ^b	
CV(%) = 26,1%; $F_K = 0,1^{ns}$; $F_N = 29,4^{***}$; $F_{K*N} = 0,7^{ns}$					
12	Ampicillin	100	33,0	77,6	70,0
	Cefotaxime	100	44,3	33,0	59,1
	Gentamicin	100	44,3	55,3	66,5
	Trung bình (N)	100 ^a	40,5 ^b	55,3 ^b	
CV(%) = 25,7%; $F_K = 0,8^{ns}$; $F_N = 23,9^{**}$; $F_{K*N} = 1,6^{ns}$					
18	Ampicillin	100 ^a	33,0 ^b	100 ^a	77,6
	Cefotaxime	100 ^a	44,3 ^b	33,0 ^b	59,1
	Gentamicin	100 ^a	44,3 ^b	55,3 ^b	66,5
	Trung bình (N)	100 ^a	40,5 ^c	62,7 ^b	
CV(%) = 18,6%; $F_K = 4,1^{ns}$; $F_N = 40,6^{***}$; $F_{K*N} = 6,3^{ns}$					
24	Ampicillin	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	Cefotaxime	100 ^a	100 ^a	33,0 ^b	77,0 ^b
	Gentamicin	100 ^a	100 ^a	55,3 ^b	85,0 ^b
	Trung bình (N)	100 ^a	100 ^a	62,7 ^b	
CV(%) = 13,1%; $F_K = 7,0^{**}$; $F_N = 25,0^{***}$; $F_{K*N} = 7,0^{**}$					
30	Ampicillin	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	Cefotaxime	100 ^a	100 ^a	33,0 ^b	77,0 ^b
	Gentamicin	100 ^a	100 ^a	55,3 ^b	85,0 ^b
	Trung bình (N)	100 ^a	100 ^a	62,7 ^b	
CV(%) = 13,0%; $F_K = 7,0^{**}$; $F_N = 25,0^{***}$; $F_{K*N} = 7,0^{**}$					

Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; ns: sự khác biệt không có ý nghĩa; **: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,01$; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Tỷ lệ nhiễm khuẩn tiếp tục tăng ở mẫu đốt thân được cấy vào một số môi trường chứa kháng sinh từ ngày 18 đến ngày thứ 24 sau cấy. Tại thời điểm 30 ngày sau cấy, xét theo yếu tố loại kháng sinh, tỷ lệ nhiễm thấp nhất là kháng sinh Cefotaxime với tỷ lệ nhiễm là 77%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,01$. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, tỷ lệ nhiễm thấp nhất tại nồng độ kháng sinh 60 mg/L với tỷ lệ nhiễm là 62,7%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$. Xét sự tương tác giữa các loại kháng sinh

và nồng độ kháng sinh, tỷ lệ nhiễm thấp nhất là kháng sinh Cefotaxime ở nồng độ kháng sinh sử dụng là 60 mg/L với tỷ lệ nhiễm là 33%, khác biệt không có ý nghĩa so với tỷ lệ nhiễm của mẫu đốt thân hồ tiêu cấy trên môi trường kháng sinh Gentamicin ở nồng độ 60 mg/L với tỷ lệ nhiễm là 55,3% nhưng sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,01$ so với các nghiệm thức còn lại.

Các kết quả đã chỉ ra rằng môi trường bổ sung kháng sinh giúp mẫu đốt thân hồ tiêu Vĩnh Linh hạn chế sự hình thành và phát triển của vi khuẩn

nội sinh trong nhân giống cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*, kết quả này tương tự với nghiên cứu của Thuyen & ctv. (2014) trên cây hồ tiêu và nghiên cứu của Nguyen & Phan (2022) trên cây lan ý.

3.2.3. Các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến tỷ lệ sống trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Từ ngày 6 đến ngày thứ 24, tỷ lệ sống có xu hướng giảm ở các mẫu đốt thân trên các môi trường có bổ sung loại và nồng độ kháng sinh

khác nhau. Tại thời điểm 30 ngày sau cấy, xét theo yếu tố kháng sinh, tỷ lệ sống trung bình dao động từ 26% đến 37%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, nồng độ kháng sinh giúp đạt được tỷ lệ sống cao nhất là nồng độ 40 mg/L với tỷ lệ sống là 81,6%, sự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê ở mức $\alpha = 0,001$. Xét sự tương tác giữa các kháng sinh và nồng độ kháng sinh, tỷ lệ sống cao nhất là kháng sinh Gentamicin ở nồng độ kháng sinh sử dụng là 40 mg/L với tỷ lệ là 89%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 5. Các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến tỷ lệ sống (%) trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)			Trung bình (K)
		20	40	60	
6	Ampicillin	0,0	100	11,0	37,0
	Cefotaxime	0,0	89,0	33,0	40,6
	Gentamicin	0,0	89,0	22,0	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^c	92,6 ^a	22,0 ^b	
CV(%) = 36,2%; $F_K = 0,2^{ns}$; $F_N = 90,9^{***}$; $F_{K*N} = 1,3^{ns}$					
12	Ampicillin	0,0	100	11,0	37,0
	Cefotaxime	0,0	89,0	33,0	40,6
	Gentamicin	0,0	89,0	22,0	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^c	92,6 ^a	22,0 ^b	
CV(%) = 36,2%; $F_K = 90,9^{ns}$; $F_N = 0,2^{***}$; $F_{K*N} = 1,3^{ns}$					
18	Ampicillin	0,0 ^b	100 ^a	0,0 ^b	33,0
	Cefotaxime	0,0 ^b	89,0 ^a	33,0 ^b	40,6
	Gentamicin	0,0 ^b	89,0 ^a	22,0 ^{bc}	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^c	92,6 ^a	18,3 ^b	
CV(%) = 32,5%; $F_K = 1,0^{ns}$; $F_N = 124,8^{***}$; $F_{K*N} = 3,5^*$					
24	Ampicillin	0,0	89,0	0,0	29,6
	Cefotaxime	0,0	89,0	11,0	33,3
	Gentamicin	0,0	89,0	22,0	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^b	89,0 ^a	11,0 ^b	
CV(%) = 47,8%; $F_K = 71,3^{***}$; $F_N = 0,6^{ns}$; $F_{K*N} = 0,6^{ns}$					
30	Ampicillin	0,0	78,0	0,0	26,0
	Cefotaxime	0,0	78,0	11,0	29,6
	Gentamicin	0,0	89,0	22,0	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^b	81,6 ^a	11,0 ^b	
CV(%) = 52,1%; $F_K = 1,4^{ns}$; $F_N = 57,2^{***}$; $F_{K*N} = 0,5^{ns}$					

Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; ns: sự khác biệt không có ý nghĩa; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Kết quả Bảng 5 cho thấy nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sau khi khử trùng mẫu đốt thân hồ tiêu Vĩnh Linh, nồng độ kháng sinh 60 mg/L đạt tỷ lệ sạch cao nhưng tỷ lệ sống thấp (so với Bảng 4). Trái lại, nồng độ kháng sinh 40 mg/L đạt tỷ lệ sống cao. Kết quả này cũng phù hợp với các ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh đến tỷ lệ mẫu sạch của Pham & ctv. (2021) khi nghiên cứu trên cây bạch đàn. Nguyên nhân là do kháng sinh hạn chế sự phát triển của vi khuẩn nhưng việc bổ sung kháng sinh vào môi trường nuôi cấy *in vitro* ở nồng độ cao cũng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của thực vật (Grzebelus & Skop, 2014).

4. Kết Luận

Các kết quả cho thấy nồng độ 20 mg/L được chọn là nồng độ phù hợp để ức chế các vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây hồ tiêu Vĩnh Linh trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Đối với việc khử trùng các vi khuẩn nội sinh tồn tại bên trong mẫu đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh, việc sử dụng kháng sinh Gentamicin ở nồng độ 40 mg/L cho hiệu quả khử trùng tốt nhất. Trong điều kiện khử trùng này, tỷ lệ sống cao nhất, với tỷ lệ là 89%. Chiều cao chồi cao nhất, với chiều cao chồi đạt 20 mm.

Lời Cảm Ơn

Tôi xin cảm ơn đây là công trình nghiên cứu của nhóm tác giả. Dữ liệu và kết quả trình bày trong nghiên cứu này là trung thực và chưa từng được công bố trên bất kỳ tạp chí nào khác.

Lời Cảm Ơn

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về cơ sở vật chất thực để hiện nghiên cứu của Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Cassells, A. C. (1991). Problems in tissue culture: Culture contamination. In Debergh, P. C., & Zimmerman, R. H. (Eds.). *Micropropagation technology and application* (31-34). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Do, L. T. (2004). *Medicinal plants and medicinal herbs of Vietnam*. Ha Noi, Vietnam: Medical Publishing House.
- Gomez, K. A., & Gomez, A. A. (1984). *Statistical procedures for agricultural research* (2nd ed., 680). New York, USA: John Wiley and Sons.
- Grzebelus, E., & Skop, L. (2014). Effect of B-lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 50(5), 568-575. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9626-0>.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8(6), 423-435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>.
- Nguyen, A. V., Le, B. V., & Tran, M. T. (2019). *Principles and practices of plant tissue culture* (12-13). Can Tho, Vietnam: Can Tho University Press.
- Nguyen, P. T., & Phan, H. T. T. (2022). Effects of Cefotaxime (bactericidal antibiotic) on the growth dynamics of Peace Lily (*Spathiphyllum wallisii*). *Journal of Forestry Science and Technology* 3, 39-45.
- Nguyen, T. T., Tran, H. T. T., Nguyen, T. X., & Nguyen, G. V. (2018). Isolation and investigation of some biological characteristics of endophytic bacterial strains from the roots of pepper plants. *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology* 10(95), 85-90.
- Pham, T. H., Pham, T. M. T., & Tran, V. T. T. (2021). Effects of various antibiotic concentrations on growth parameters of eucalyptus seedlings in in vitro propagation conditions. *Scientific Journal of Tan Trao University* 7(22), <https://doi.org/10.51453/2354-1431/2021/578>.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67, 257-268.
- Thuyen, D. A., Du, T. X., Giap, D. D., & Ton, N. T. (2014). Preliminary study on the micropropagation in vitro of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Academia Journal of Biology* 27(3), 39-45. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v27n3.5268>.