

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGUYỄN THỊ MỸ HẠNH

**ỨNG DỤNG CÁC KỸ THUẬT
CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG
NHÂN GIỐNG CÂY KIWI TẠI LÂM ĐỒNG**

Chuyên ngành: Sinh lý học thực vật

Mã số: 9 42 01 12

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2022

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 1: **PGS.TS. Bùi Văn Lệ**

Người hướng dẫn khoa học 2: **GS.TS. Dương Tấn Nhựt**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ 00', ngày ... tháng ... năm 2022

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Kiwi là một loài thực vật đơn tính sống lâu năm, thuộc chi Dương đào (*Actinidia*), được tìm thấy chủ yếu ở miền nam Trung Quốc và phân bố rộng rãi ở châu Á. Vào đầu thế kỷ XX, chi *Actinidia* du nhập vào Châu Âu, Châu Úc và phát triển mạnh thành ngành công nghiệp. *A. chinensis* var. *chinensis*, *A. chinensis* var. *deliciosa*, và *A. eriantha* là những giống có kích thước quả đạt tiêu chuẩn thương mại. Tại Việt Nam, Kiwi chưa được trồng phổ biến mà chủ yếu trái được nhập khẩu từ nước ngoài như New Zealand, Trung Quốc, Ý, Chile... Hiện nay đã có một số phát hiện ghi nhận về sự phân bố của cây Kiwi rừng ở tỉnh Kon Tum và tỉnh Lâm Đồng. Mặc dù vậy, các nghiên cứu về đa dạng di truyền của cây Kiwi tại Việt Nam vẫn còn hạn chế. Do đó, cần có những nghiên cứu đánh giá mối quan hệ di truyền để phục vụ công tác nhận diện các loài trong chi *Actinidia* hiện có tại Việt Nam.

Chi *Actinidia* bao gồm 54 loài và 75 phân loài. Tất cả các loài trong chi này đều là thực vật lâu năm, dây leo, rụng lá và hầu hết các loài này có thể giao phấn với nhau rất dễ dàng. Do đó, trong quá trình tiến hóa đã xuất hiện các cây lai cùng chi khác loài. Điều này là một trong những trở ngại chính cho việc nghiên cứu nguồn gốc phát sinh của các loài nguyên thủy trong một chi. Hơn nữa, cây cái mang hoa có dạng lưỡng tính nhưng chỉ tạo ra các hạt phấn trống, trong khi cây đực có hoa đơn tính với nhiều nhị hoa bao quanh một nhụy một cách thô sơ, sự phát triển bị kìm hãm trước khi kéo dài kiểu dáng hoặc bắt đầu phóng noãn. Vì vậy, các phương pháp vi nhân giống, nhân giống bằng phương pháp ghép nhằm tối ưu hóa các kỹ thuật nhân giống đã được nghiên cứu nhằm đáp ứng nhu cầu về cây trồng chất lượng cao nhưng đến khi cây ra hoa mới xác định được cây đực, cái và cho thụ phấn. Mặt khác, có rất ít nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật công nghệ sinh học để nhận diện giới tính và vi nhân giống cây Kiwi vàng (*Actinidia chinensis*). Tại Việt Nam, bước đầu đã có nghiên cứu nuôi cấy tế bào đơn cây Kiwi xanh (*Actinidia deliciosa*) của nhóm tác giả Dương Tấn Nhựt. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu thêm để xây dựng quy trình nhân giống cây kiwi hiệu quả thông qua tái sinh phôi soma hay tái sinh chồi.

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (thin cell layer - TCL) là một công cụ hiệu quả trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, đặc biệt tạo ra các dạng hình thái, mô cơ quan khác nhau. Kỹ thuật TCL đã được ứng

dụng thành công trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau bao gồm cây rừng, cây ăn trái, cây hoa, cây cảnh, cây dược liệu. Các mẫu cây TCL có đặc điểm chung là mỏng. Khi cắt mẫu, mô thực vật bị tổn thương, nhiều enzyme hoặc các polysaccharide sinh ra rất cần cho quá trình cảm ứng sự sinh trưởng và phát triển của thực vật.. Hiện nay trên thế giới chưa có nghiên cứu về kỹ thuật TCL trên đối tượng cây Kiwi, đây cũng chính là một mục tiêu chính của đề tài này.

Với những lý do đó, đề tài “**Ứng dụng các kỹ thuật công nghệ sinh học trong nhân giống cây Kiwi tại Lâm Đồng**” được tiến hành với các mục đích chính gồm đánh giá mối quan hệ di truyền và nhận diện một số loài kiwi thu thập tại Việt Nam và trên thế giới, xác định giới tính cây Kiwi bằng chỉ thị sinh học phân tử và ứng dụng công nghệ nuôi cấy lớp mỏng tế bào để đánh giá hiệu quả phát sinh mô sẹo, hình thành phôi soma, hình thành chồi và hình thành rễ bất định từ mẫu cuống lá và gân lá chính của cây Kiwi. Các kết quả của đề tài này có ý nghĩa trong việc tạo ra một số lượng lớn cây Kiwi đã xác định giới tính bằng phương pháp TCL để rút ngắn thời gian và chủ động trong công tác nhân giống đối tượng cây trồng này tại Lâm Đồng.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

- Đánh giá, định danh, phân tích mối quan hệ di truyền của các giống Kiwi bằng kỹ thuật sinh học phân tử theo phương pháp mã vạch DNA (DNA barcode).

- Ứng dụng kỹ thuật công nghệ sinh học nhằm xác định giới tính của cây Kiwi.

- Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi nhằm đánh giá hiệu quả sự hình thành và phát sinh phôi soma của *Actinidia chinensis* từ gân lá chính và cuống lá thông qua công nghệ nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL) và tái sinh cây hoàn chỉnh phục vụ công tác sản xuất giống cây Kiwi tại Lâm Đồng.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

- Nhận diện các loài Kiwi tại Việt Nam và xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử.

- Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Kiwi là một loại trái cây thuộc chi *Actinidia*, bao gồm 54 loài

thường phân bố ở các vùng đất ẩm và tối xốp với độ cao 800 - 1.400 m đôi khi lên đến 1.950 m so với mực nước biển. Kiwi là một loại trái cây giàu chất dinh dưỡng. Kiwi có hàm lượng vitamin C đặc biệt cao và chứa một loạt các chất dinh dưỡng khác liên quan đến chất xơ, kali, vitamin E và folate, cũng như các thành phần hoạt tính sinh học khác nhau.

Ở những môi trường khí hậu và địa lý khác nhau, các loài của chi *Actinidia* thể hiện sự biến đổi sinh học rất lớn. Tất cả các loài trong chi *Actinidia* xuất hiện đều có cây đực và cây cái. Nhân giống Kiwi bằng phương pháp truyền thống như cắt cành, ghép cành thường không có hiệu quả cao do phải trồng lâu dài và hạn chế về sự hình thành rễ. Phương pháp vi nhân giống Kiwi hiện nay đã đạt được một số kết quả như tái sinh chồi, phát sinh cơ quan, phát sinh phôi soma và tái sinh cây ở Việt Nam.

Hiện nay, ở Việt Nam, chưa có vùng nào trồng thành công Kiwi cho trái thu hoạch mà chủ yếu đang trồng thử nghiệm ở một số vùng núi phía Bắc và Kỳ Sơn thuộc tỉnh Nghệ An. Cho đến nay, theo các tài liệu khoa học đã công bố có một số đề tài nghiên cứu một số đặc tính như sự hình thành mô sẹo và ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng, pH môi trường, nồng độ đường và thể tích môi trường đến việc nuôi cấy tế bào đơn cây *A. Deliciosa*, nghiên cứu giâm hom và gieo hạt trên cây *A. latifolia* và *A. Deliciosa*. Ở Lâm Đồng có khí hậu nhiệt đới gió mùa, độ cao trung bình của Lâm Đồng từ 800 - 1.000 m so với mặt nước biển. Ở nhiệt độ này tương đối phù hợp cho cây Kiwi phát triển khi vùng Lâm đồng có cùng độ cao, lượng mưa hằng năm so với vùng phân bố của Kiwi.

Tuy nhiên, cây Kiwi được xem là một loại cây rất khó phát triển. Các nghiên cứu vi nhân giống sử dụng các vật liệu chủ yếu như hạt nảy mầm hoặc toàn bộ lá, nội nhũ, ngọn chồi, các đoạn thân, nhị hoa, cây con, v.v... Tuy nhiên, những nghiên cứu đó chủ yếu tập trung vào *A. deliciosa*, *A. Polygama*, v.v...có rất ít nghiên cứu về vi nhân giống của *Actinidia chinensis* Planch, đặc biệt là ứng dụng kỹ thuật TCL trên cây *Actinidia chinensis* Planch hiện nay chưa được nghiên cứu.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu lá của 20 giống Kiwi (*Actinidia sp.*) được lấy ở vị trí cách ngọn 10 cm từ cây ngoài tự nhiên và các nguồn thương mại (1 năm tuổi) bao gồm: 01 mẫu tự nhiên thu được ở xã Đắc Long, huyện Kon Plông, tỉnh Kontum; 01 mẫu tự nhiên thu được ở Thôn Măng lình, phường 7, Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng; 18 mẫu Kiwi nhập nội mua tại Trung tâm phát triển giống cây trồng mới Đại học nông nghiệp 1 Hà Nội – Trang trại cây giống Xuân Khuông, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Nhận diện các loài Kiwi tại Việt Nam và xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử.

Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.3.1.1. Đánh giá đa dạng di truyền và xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử

a. Đánh giá đa dạng di truyền

Ly trích DNA tổng số dựa trên quy trình CTAB cơ bản được thay đổi một số điều kiện.

Phương pháp PCR được thực hiện nhằm khuếch đại vùng *rbcL*, *matK*, ITS với các cặp primer tương ứng *rbcL*1-F (5'- ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC -3') và *rbcL* 724-R(5'- TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC -3'), *matK*-KIM3-F (5'- CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G -3') và *matK*-KIM1-R (5'- ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC -3'), ITS1-5F (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3') và ITS4-R (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3').

Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn. Các trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC và kiểm tra các sai lệch. Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST.

Xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự DNA các vùng *rbcL*, *matK*, ITS.

b. Xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chi thị phân tử

Mẫu lá của 8 cây Kiwi sau khi xác định giới tính được sử dụng để ly trích DNA tổng số dựa trên quy trình CTAB cơ bản được thay đổi một số điều kiện.

Kiểm tra độ tinh sạch DNA bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260 nm và 280 nm.

Phương pháp PCR được thực hiện với cặp primer SmY1_F (5'-TCG CAA TTC GTT AGG GAT GAT GCG-3') và SmY1_R (5'-CAT AAT CAA CCA TCC ATA AAA ACC AT-3') khếch đại vùng gen nằm trên nhiễm sắc thể Y có kích thước 770bp.

Điện di sản phẩm PCR và đọc kết quả.

2.3.1.2. Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống

a. Tạo nguồn mẫu *in vitro*

* Khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi

Mẫu lá được thu nhận từ những cây khỏe mạnh ngoài tự nhiên và được khử trùng bằng 1 g/L HgCl₂, 10 g/L NaOCl và AgNPs ở các nồng độ khác nhau (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm và 500 ppm) và cấy vào môi trường cảm ứng mô sẹo. Sau 4 – 8 tuần nuôi cấy ghi nhận số liệu.

* Tăng sinh cụm chồi

Các cụm chồi có nguồn gốc từ mẫu lá được cắt thành các cụm chồi nhỏ chứa 3 chồi/ mẫu được cấy lên môi trường tăng sinh cụm chồi bổ sung các dịch chiết hữu cơ với các nồng độ (v/v) là (5%, 10%, 15% và 20%).

b. Nghiên cứu ảnh hưởng của kiểu cắt và kích thước mẫu đến quá trình phát sinh phôi soma thông qua TCL của gân lá chính và cuống lá

Mẫu cây có gân lá chính *in vitro* hình chữ nhật (1 mm × 10 mm) và cuống lá hình chữ nhật (1 mm × 10 mm) được cắt lát mỏng theo chiều ngang và chiều dọc (mv-tTCL và mv-lTCL đối với mẫu cây có gân lá chính; p-tTCL và p-lTCL đối với mẫu cây ở cuống lá) với các kích thước khác nhau. Các mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,02 mg/L NAA; 0,5 mg/L TDZ; 30 g/L đường và 8 g/L agar - môi trường MSE. Toàn bộ gân chính của lá (1 mm × 10 mm) hoặc toàn bộ cuống lá (1 mm × 10 mm) được nuôi cấy trên môi trường

MSE được sử dụng làm đối chứng. Đối với phương pháp cắt tTCL, cuống lá (p) và gân lá chính (mv) có kích thước 1 mm × 10 mm (rộng × dài) được cắt ngang thành 2 mẫu ($\frac{1}{2}$ mv-tTCL và $\frac{1}{2}$ p-tTCL), cắt thành 3 mẫu cây ($\frac{1}{3}$ mv-tTCL và $\frac{1}{3}$ p-tTCL và 4 mẫu cây ($\frac{1}{4}$ mv-tTCL và $\frac{1}{4}$ p-tTCL). Mẫu cắt ITCL, mẫu p và mv có kích thước 1 mm × 10 mm (rộng × dài) được cắt dọc thành 2 mẫu ($\frac{1}{2}$ mv-ITCL và $\frac{1}{2}$ p-ITCL). Mỗi mẫu $\frac{1}{2}$ mv-ITCL và $\frac{1}{2}$ p-ITCL được cắt ngang thành 2 mẫu ($\frac{1}{4}$ mv-ITCL và $\frac{1}{4}$ p-ITCL) hoặc cắt ngang thành 3 mẫu ($\frac{1}{6}$ mv-ITCL và $\frac{1}{6}$ p-ITCL) hoặc cắt ngang thành 4 mẫu ($\frac{1}{8}$ mv-ITCL và $\frac{1}{8}$ p-ITCL).

c. Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV đơn lẻ lên khả năng tái sinh chồi của phôi soma Kiwi

Các phôi soma có hình dạng lá mầm (chiều cao 2 cm) có nguồn gốc từ mẫu p-TCL và mv-TCL được nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và các nồng độ khác nhau của BA (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) hoặc TDZ (0,01; 0,03; 0,05; 0,07 mg/L) để xác định được nồng độ phù hợp trong giai đoạn tái sinh chồi Kiwi. Đối chứng là phôi được nuôi cấy trên môi trường MS không có BA hoặc TDZ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi nghiệm thức. Mỗi bình thủy tinh 350 mL chứa 40 mL môi trường nuôi cấy và mỗi bình chứa 3 mẫu.

d. Khảo sát ảnh hưởng của NAA lên khả năng ra rễ và thích nghi của cây con trong ống nghiệm

Các chồi 6 tuần tuổi (cao 4 cm) được nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 30g/L đường, 8g/L agar và các nồng độ NAA khác nhau (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/L) để xác định được nồng độ phù hợp tạo rễ *in vitro*. Đối chứng là chồi được nuôi cấy trên môi trường không có NAA.

e. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên khả năng thích nghi của cây con trong nhà kính

Các cây con sau 8 tuần nuôi cấy (cao 6 cm) lấy từ chồi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung nồng độ NAA tối ưu đã được rửa sạch thạch và trồng trong chậu nhựa (kích thước 15 cm x 12 cm x 8 cm) với tỷ lệ khác nhau giá thể mùn, xơ dừa và phân bón vi sinh, mỗi chậu nhựa một cây con, số lượng là 300 cây con. Cây con được tưới ngày 2 lần trong tuần đầu, sau đó tưới ngày 1 lần vào sáng sớm.

2.3.2. Phân tích thống kê

Sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty Macrogen (10F, 254 Beotkkot-ro geumcheon-gu, Soul 08511, Rep. of Korea).

Các trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC và kiểm tra các sai lệch. Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.0 với hệ số bootstrap 1000.

Các dữ liệu về thí nghiệm trong ống nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel[®] 2010 và phần mềm SPSS 20.0 với phép thử Duncan ở $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá đa dạng di truyền và xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử

3.1.1. PCR và giải trình tự DNA

Kết quả kiểm tra độ tinh sạch DNA cho thấy các mẫu có độ tinh sạch cao với OD260/OD280 nằm trong khoảng 1,8 - 2,0. Nồng độ DNA tổng số ở các mẫu nằm trong khoảng 111,2 - 280 ng/μl đảm bảo tiêu chuẩn và chất lượng.

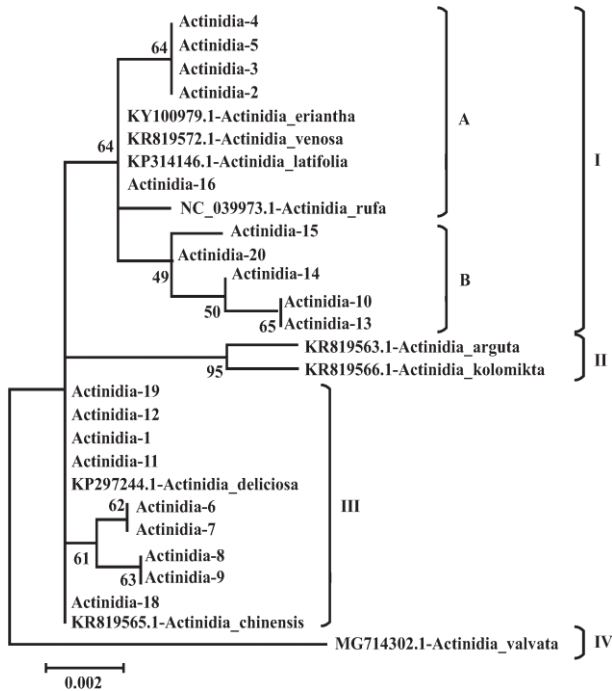
Kết quả PCR của 20 mẫu Kiwi nghiên cứu dựa trên các vùng *rbcL*, *matK*, ITS với các primer tương ứng *rbcL*1-F và *rbcL* 724-R; *matK*-KIM3-F và *matK*-KIM1-R; ITS1-5F và ITS4-R cho thấy các băng xuất hiện rõ. Sản phẩm PCR của các mẫu Kiwi khuếch đại thành công dựa trên các vùng *rbcL*, *matK*, ITS. Các trình tự DNA có kích thước lần lượt *rbcL* (701 -720 bp), *matK* (773 - 858 bp), ITS2 (706 - 715 bp).

Kết quả khuếch đại vùng *rbcL*, *matK*, ITS với các cặp mồi đặc trưng trên 20 mẫu Kiwi cho thấy tỷ lệ khuếch đại giữa các vùng có sự khác nhau lần lượt là 95%, 80% và 75%. Tỷ lệ giải trình tự của các vùng gen này đạt 100% trên các mẫu khuếch đại thành công. Điều này chứng tỏ có sự biến đổi về mặt di truyền của một số loài trong chi *Actinidia*.

3.1.2. Đánh giá, định danh, phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu giống Kiwi

3.1.2.1. Kết quả phân tích sự khác biệt giữa các trình tự *rbcL* của 19 mẫu Kiwi thu thập

Trình tự vùng *rbcL*, *matK*, ITS khuếch đại của các mẫu nghiên cứu có mức độ tương đồng cao so với các trình tự đã được công bố trên NCBI: vùng *rbcL* (99% - 100%, 97,7 - 100%), *matK* (99,7% - 100%, 99 - 100%), ITS (87% - 100%, 95,6 - 100%). Vùng bảo tồn của *rbcL* là 694/701, vùng biến đổi là 7/701, chỉ số Pi là 6/701; vùng bảo tồn của *matK* là 766/773, vùng biến đổi là 7/773, chỉ số Pi là 3/773 và vùng bảo tồn của ITS 675/706, vùng biến đổi là 68/706, chỉ số Pi là 22/706.



Hình 3.1. Cây phát sinh chủng loài của 19 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng *rbcL* và trình tự tham chiếu trên NCBI

Kết quả thiết lập cây phát sinh chủng loài chia các mẫu Kiwi phân tích thành bốn nhóm chính. Trong đó, 10 mẫu Kiwi thu thập thuộc nhóm I, cùng nhóm với các mẫu tham chiếu thuộc các loài như *A. eriantha*, *A. venosa*, *A. latifolia*, *A. rufa* và 9 mẫu Kiwi còn lại thuộc nhóm III, cùng nhóm với các mẫu tham chiếu thuộc các loài như *A.*

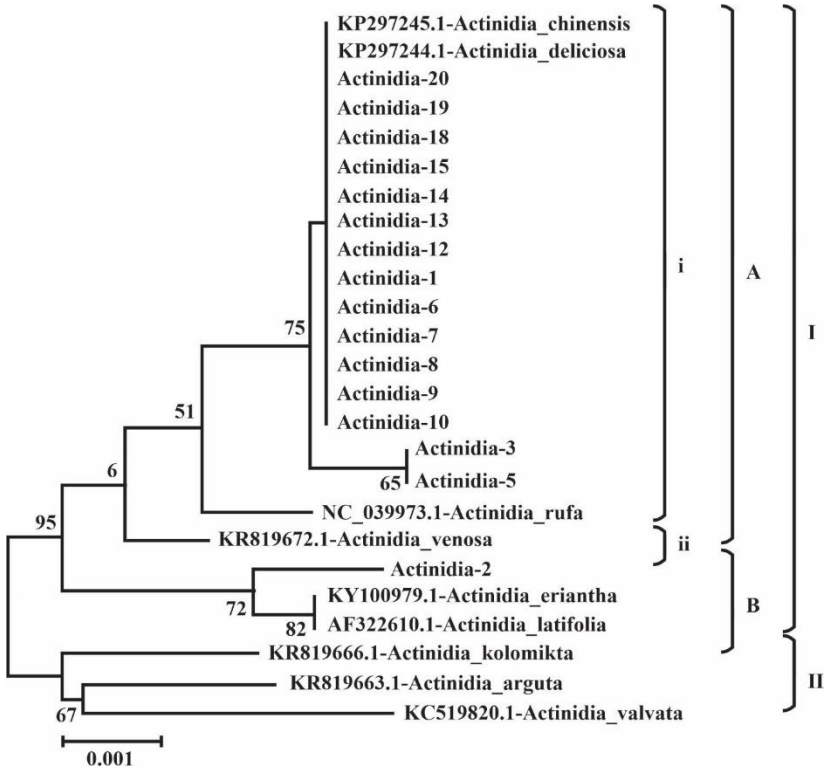
deliciosa, *A. chinensis*. Đối với nhóm II chỉ gồm các mẫu tham chiếu thuộc các loài *A. arguta*, *A. kolomika* và nhóm IV chỉ gồm một mẫu tham chiếu thuộc loài *A. valvata*. Kết quả phân tích dựa trên trình tự vùng *rbcL* của 19 mẫu Kiwi cho thấy rằng nguồn gốc di truyền của các mẫu Kiwi thu thập chỉ tập trung ở một số loài nhất định và có sự phân nhóm thành 2 nguồn rõ rệt.

3.1.2.2. Kết quả phân tích sự khác biệt giữa các trình tự *matK* của 16 mẫu Kiwi thu thập

Kết quả phân tích dựa trên trình tự vùng *matK* của 16 mẫu Kiwi cho thấy rằng nguồn gốc di truyền của 15/16 mẫu Kiwi thu thập có mối quan hệ gần với 2 loài *A. deliciosa* và *A. chinensis*, trong khi đó mẫu Kiwi-2 còn lại có thể có mối quan hệ gần với loài *A. erianth* hoặc *A. latifolia*.

Trình tự DNA vùng *matK* giữa 16 mẫu Kiwi có 7 vị trí sai khác giữa các trình tự với nhau. Trong đó, ở vị trí sai khác 457 có sự thay đổi giữa nucleotide G hoặc A và một số trình tự mất một số nucleotide ở vị trí này.

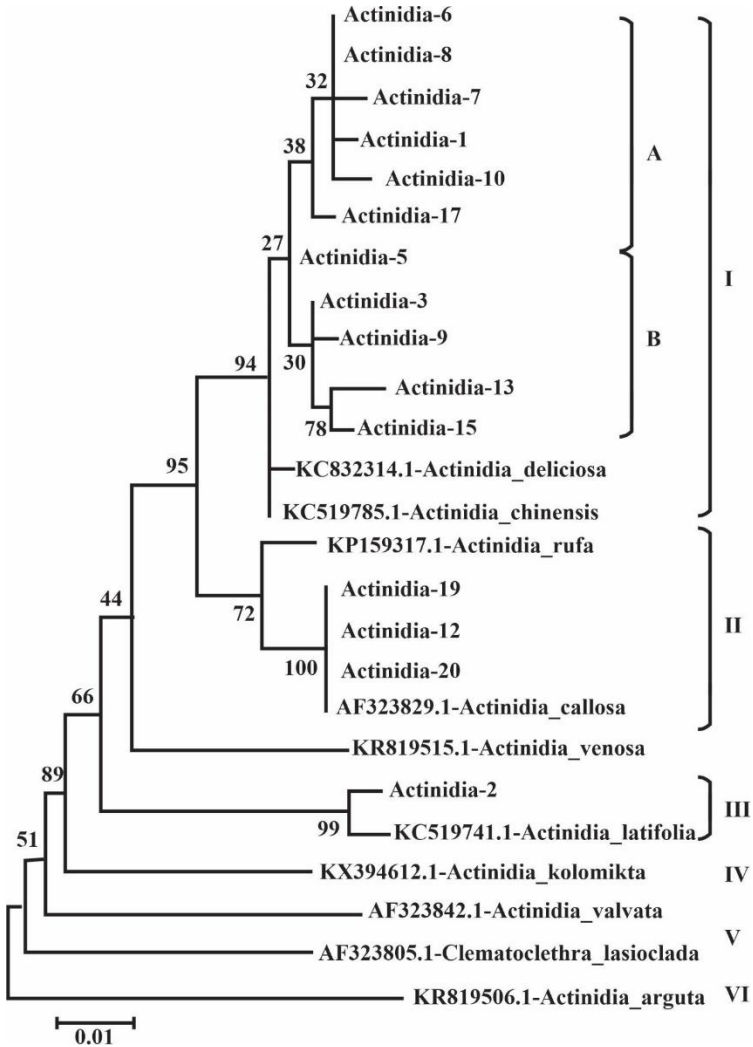
Kết quả phân tích tỉ lệ phân nhóm di truyền của các mẫu Kiwi thu thập dựa trên vùng *matK* cho thấy chỉ có mẫu Kiwi thu thập từ nguồn tự nhiên Việt Nam thuộc một nhóm, tách riêng với các mẫu còn lại. Trong đó, mẫu cây Kiwi thu thập từ nguồn tự nhiên Việt Nam có mối quan hệ di truyền gần với 12 mẫu Kiwi thương mại.



Hình 3.2. Cây phát sinh chủng loài của 16 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng *matK*

3.1.2.3. Kết quả phân tích sự khác biệt giữa các trình tự ITS của 16 mẫu Kiwi thu thập

Kết quả phân nhóm 11 mẫu Kiwi còn lại cùng nhóm với 2 trình tự tham chiếu. Kết quả phân tích dựa trên trình tự vùng ITS2 của 15 mẫu Kiwi cho thấy rằng nguồn gốc di truyền của chúng có thể từ 3 nhóm di truyền khác nhau như sau: nhóm thứ nhất gồm 11 mẫu Kiwi có quan hệ di truyền gần gũi thuộc 2 loài *A. deliciosa* và *A. chinensis*, nhóm 2 gồm 3 mẫu *Actinidia* 12, *Actinidia* 19 và *Actinidia* 20 thuộc 2 trình tự tham chiếu loài *A. callosa* và *A. rufa*, nhóm còn lại chỉ có mẫu Kiwi-2 và tương đối tách biệt với 2 nhóm kia.

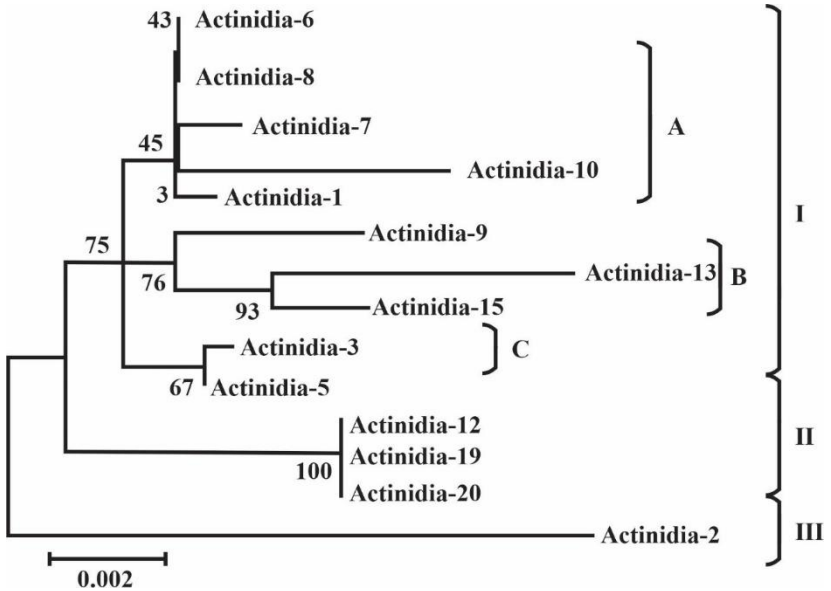


Hình 3.3. Cây phát sinh chủng loài của 15 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng ITS

Kết quả cho thấy, trình tự DNA vùng *rbcL* và *matK* trong lục lạp có 7 vị trí sai khác trong khi đó vùng ITS trong nhân có 68 vị trí sai khác. Điều này cho thấy, vùng gen trong lục lạp có sự bảo tồn và ít biến đổi hơn so với vùng gen trong nhân. Do các vùng trong nhân bị

biến đổi trong quá trình lai tạo nên giữa các vùng DNA trong nhân có sự sai khác nhiều.

3.1.2.4. Vùng *matK* + ITS



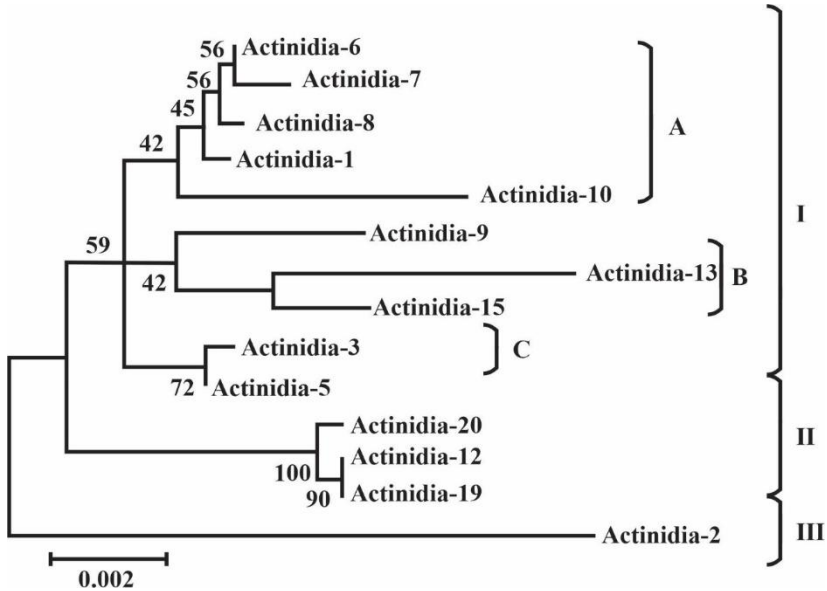
Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng *matK* + ITS

Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA kết hợp các vùng *matK* + ITS chia làm 3 nhóm chính (Hình 3.4). Nhóm I chia làm 2 nhóm nhỏ gồm nhóm IA gồm các mẫu *Actinidia* 1, 6, 7, 8, 10 và nhóm IB gồm các mẫu Kiwi 9, 13, 15, nhóm IC gồm các mẫu *Actinidia* 3, 5. Nhóm II gồm 3 mẫu *Actinidia* 12, 19, 20. Nhóm III gồm các mẫu *Actinidia* 2.

3.1.2.5. Vùng *rbcL* + *matK* + ITS

Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA kết hợp các vùng *rbcL* + *matK* + ITS chia làm 3 nhóm chính. (Hình 3.5). Nhóm I chia làm 3 nhóm nhỏ gồm nhóm IA gồm các mẫu *Actinidia* 6, 7, 8, 1, 10, nhóm IB gồm các mẫu *Actinidia* 9, 13, 15, nhóm IC gồm các mẫu *Actinidia* 3, 5. Nhóm II gồm 3 mẫu *Actinidia*

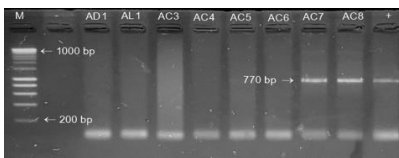
12, 19, 20. Nhóm III gồm mẫu *Actinidia 2*.



Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng *rbcL* + *matK* + ITS

3.1.3. Xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử

DNA thu được có độ tinh sạch cao (OD260/OD280 nằm trong khoảng 1,8-2,0). Kết quả điện di và kiểm tra sản phẩm PCR cho thấy tất cả mẫu cái (AD1, AL2, AC3, AC4, AC5 và AC6) đều không cho băng. Trong khi đó, kết quả khuếch đại đã thành công trên đoạn gen có kích thước 770 bp trên nhiễm sắc thể Y giúp nhận diện 2 mẫu đực giống AC7 và AC8 (Hình 3.6).



Hình 3.6. Kết quả điện di và kiểm tra sản phẩm PCR

Marker (-): Đối chứng âm mẫu nước cất; (+): Đối chứng dương cây đực chứa nhiễm sắc thể Y

3.2. Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống

3.2.1. Tạo nguồn mẫu in vitro

3.2.1.1. Khử trùng bề mặt mẫu cấy và tái sinh chồi

Kết quả ghi nhận được cho thấy, các chất khử trùng mẫu cấy khác nhau ảnh hưởng khác nhau lên khả năng khử trùng bề mặt mẫu cấy và cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy, nồng độ AgNPs tăng từ 100 ppm đến 500 ppm thì tỷ lệ mẫu nhiễm càng giảm (53,33% giảm xuống 15,56%) và tỷ lệ mẫu hoại tử càng tăng (6,67% tăng lên 60,00%) sau 4 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, những mẫu lá được khử trùng bề mặt với AgNPs, HgCl₂ và NaOCl đều cho cảm ứng mô sẹo và tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt cao nhất là 51,11% đối với mẫu lá được khử trùng bề mặt với 200 ppm AgNPs.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của các chất khử trùng lên khả năng khử trùng bề mặt mẫu cấy và cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy

Chất khử trùng	Nồng độ	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu hoại tử (%)	Tỷ lệ mẫu sống và cảm ứng mô sẹo (%)	Hình thái mẫu
AgNPs	100 ppm	53,33a	6,67d	40,00b	Mẫu cấy hầu hết bị nhiễm
	200 ppm	35,56b	13,33cd	51,11a	Mẫu cấy xanh, ít tổn thương
	300 ppm	33,33b	31,11b	35,56b	Mẫu cấy chuyển sang màu nâu và bị tổn thương nhiều
	500 ppm	15,56c	60,00a	24,44c	Mẫu cấy bị hoại tử hoặc chết
HgCl ₂	1 g/L	22,22c	40,00b	37,78b	Mẫu cấy chuyển sang màu trắng và bị tổn thương
NaOCl	10 g/L	48,89a	17,78c	33,33b	Mẫu cấy bị nhiễm nhiều

Bảng 3.4. Sự tái sinh chồi từ mẫu cấy lá cây Kiwi vàng được khử trùng bằng AgNPs, HgCl₂ và NaOCl sau 8 tuần nuôi cấy

Nguồn gốc mẫu cấy	Số chồi/mẫu	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
HgCl ₂	3,33b	2,33b	0,60b
NaOCl	4,66ab	3,02ab	0,85ab
AgNPs	6,33a	3,82a	1,46a

Trong nghiên cứu này, 200 ppm AgNPs không những có vai

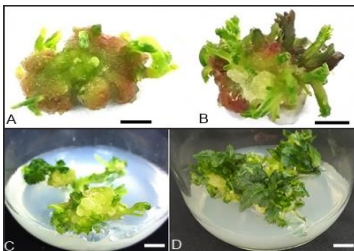
trở trong khử trùng mẫu cây mà AgNPs còn có tác dụng ít làm tổn thương mẫu cây như chất khử trùng HgCl_2 và NaOCl . Kết quả của nghiên cứu này một lần nữa chứng minh hiệu quả của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu cây lá của cây Kiwi và có thể thay thế chất khử trùng truyền thống.

3.2.1.2. Tăng sinh cụm chồi

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của dịch chiết hữu cơ lên khả năng tăng sinh cụm chồi cây Kiwi sau 8 tuần nuôi cấy

Dịch chiết hữu cơ	Nồng độ (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Khối lượng tươi (g)	Hình thái chồi
ĐC	0	3,05bc	2,67bcd	1,65c	Các chồi nhỏ
Nước dừa	5	2,90bcd	2,33cd	1,83bc	Chồi khỏe, lá thật, nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	10	3,27b	3,33abc	2,40b	
	15	3,30b	3,33abc	2,46b	
	20	3,89a	4,33a	3,33a	
Chuối xanh	5	2,80cd	2,67bcd	1,59e	Chồi nhỏ và không đều, lá nhỏ
	10	3,02bc	4,00ab	2,36b	
	15	2,61de	3,33abc	2,27bc	
	20	2,28ef	2,00cd	1,76cde	
Khoai tây	5	2,27ef	2,00cd	1,57e	Chồi nhỏ, lá thật và nhỏ bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	10	2,66cde	3,33abc	2,14bcd	
	15	1,94g	2,33cd	1,69de	
	20	1,44h	1,67d	1,50e	

Môi trường nuôi cấy bổ sung 20% (v/v) nước dừa cho hiệu quả tăng sinh cụm chồi tối ưu hơn các nồng độ nước dừa khác và dịch chiết khoai tây và chuối xanh (Bảng 3.8 và hình 3.7c, d).



Hình 3.7. Tạo nguồn mẫu *in vitro* cây Kiwi vàng (*Actinidia chinensis*)

A, B: Tái sinh chồi từ mẫu lá khử trùng bằng HgCl_2 và AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy (Thước đo: 1 cm)

C, D: Tăng sinh cụm chồi trên môi trường không bổ sung dịch chiết hữu cơ và bổ sung 20% nước dừa sau 8 tuần nuôi cấy (Thước đo: 2 cm).

3.2.2. Hiệu quả sự hình thành và phát sinh phôi soma của *Actinidia chinensis* từ gân lá chính và cuống lá thông qua công nghệ nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL)

3.2.2.1. Phát sinh phôi vô tính thông qua nuôi cấy gân lá chính mv-tTCL và mv-ITCL

Cảm ứng phát sinh phôi cho thấy, số phôi vô tính phát sinh trên mỗi mẫu cây là khác nhau và có ý nghĩa giữa các mẫu cây tTCL và ITCL. Cảm ứng phôi vô tính (14,00 - 14,66 ngày) thể hiện trong các mẫu $\frac{1}{4}$ mv-ITCL và $\frac{1}{2}$ mv-tTCL được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng phôi bổ sung 0,02 mg/L NAA, 0,5 mg/L TDZ, 30 g/L đường và 8 g/L agar sớm hơn so với những loại khác. Số lượng phôi soma trên mỗi mẫu cao nhất (10,66 phôi) và GCF_{TCL} (21,04) được ghi nhận trên mẫu $\frac{1}{2}$ mv-tTCL. Trong khi đó, ở mẫu cây $\frac{1}{8}$ mv-ITCL trên môi trường cảm ứng phôi cho thấy cảm ứng phát sinh phôi vô tính muộn nhất (20,66 ngày). Đối với mẫu $\frac{1}{2}$ mv-tTCL được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng phôi, cảm ứng phôi vô tính là 98,67% (Hình 3.8f). Kết quả cũng cho thấy mẫu cây có kích thước nhỏ hơn, số lượng phôi soma trên mỗi mẫu được hình thành thấp hơn trên cả mẫu mv-tTCL và mv-ITCL. Đối với toàn bộ gân lá chính (đôi chứng), khối lượng tươi của các cụm phôi vô tính (1568,00 mg) là lớn nhất. Tóm lại, phát sinh phôi vô tính từ nuôi cấy mẫu $\frac{1}{2}$ mv-tTCL là tối ưu khi các gân chính của lá được sử dụng làm mẫu cấy trong quá trình cảm ứng phôi soma.

3.2.2.2. Phát sinh phôi vô tính thông qua nuôi cấy cuống lá p-tTCL và p-ITCL

Đối với mẫu cây cuống lá, phát sinh phôi vô tính cũng được ghi nhận trong tất cả các mẫu TCL. Cảm ứng phát sinh phôi vô tính (15,33 - 16,33 ngày) được ghi lại trong mẫu $\frac{1}{2}$ p-tTCL, p, $\frac{1}{4}$ p-ITCL, $\frac{1}{6}$ p-ITCL và $\frac{1}{8}$ p-ITCL sớm hơn trong mẫu $\frac{1}{2}$ p-ITCL, mẫu $\frac{1}{3}$ p-tTCL và $\frac{1}{4}$ p-tTCL được nuôi cấy trên môi trường phát sinh phôi (Bảng 3.10). Mẫu $\frac{1}{2}$ p-tTCL cho thấy số lượng phôi vô tính trên mỗi mẫu cao nhất (8,66 phôi) và GCF_{TCL} thu được là 15,2. Đối với mẫu p-ITCL có kích thước nhỏ hơn, cảm ứng phôi vô tính sớm hơn, trong khi đối với mẫu p-tTCL có kích thước lớn hơn, cảm ứng SE cũng sớm hơn (Bảng 3.10). Phát sinh phôi vô tính (92,33%) là cao nhất ở mẫu $\frac{1}{6}$ p-ITCL (Bảng 3.10). Kết quả cũng cho thấy khối lượng tươi của mẫu cây tỷ lệ thuận với kích thước mẫu cấy. Hơn nữa, trọng lượng tươi của SE là cao nhất (1658,66 mg) ở mẫu đôi chứng.

Bảng 3.6. Sự phát sinh phôi soma của Kiwi thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào của mẫu gân chính lá (mv) sau 8 tuần nuôi cấy

Mẫu TCL	Cảm ứng phát sinh phôi soma (ngày)	Tỷ lệ phát sinh phôi (%)	Số lượng phôi soma trên mỗi mẫu cây **	GCF _{TCL}	Khối lượng tươi của cụm phôi soma (mg)	Hình thái của phôi soma
mv (ĐC)	19,66b*	92,00b	10,00a	9,20cd	1568,00a	
1/2 mv-ITCL	27,00a	72,33c	6,00b	8,68d	937,33b	Phôi soma (hình cầu, trái tim và ngư lôi) và màu sắc (trắng hoặc xanh lục nhạt)
1/4 mv-ITCL	14,00c	72,66c	6,66b	19,36ab	531,33d	
1/6 mv-ITCL	19,66b	54,00e	5,33b	17,27ab	419,66f	
1/8 mv-ITCL	20,66b	61,00d	2,66c	12,98bcd	412,33f	
1/2 mv-tTCL	14,66c	98,67a	10,66a	21,04a	945,00b	Phôi soma (hình cầu, hình trái tim, hình ngư lôi và lá mầm) và màu sắc (trắng hoặc xanh đậm)
1/3 mv-tTCL	19,66b	59,33d	6,00b	10,68cd	595,33c	
1/4 mv-tTCL	20,00b	72,66c	5,33b	15,49abc	459,33e	

Nghiên cứu cho thấy mẫu cây $1/8$ p-ITCL được nuôi cấy trên môi trường phát sinh phôi cho kết quả phôi vô tính với tổng số phôi cao nhất (32,0 phôi). Tuy nhiên, các phôi vô tính được hình thành bởi mẫu cây $1/8$ p-ITCL có hình cầu, trái tim và hình ngư lôi trong khi mẫu cây $1/2$ p-tTCL ghi lại đầy đủ các hình dạng phát triển của các phôi vô tính (hình cầu, trái tim, ngư lôi và lá mầm), những phôi vô tính này có khả năng tái sinh chồi cao hơn so với các mẫu TCL khác. Bảng 3.10 cũng cho thấy rằng kích thước của mẫu cây cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của các phôi vô tính. Đối với mẫu cuống lá nguyên (1×10 mm) và $1/2$ p-ITCL (Hình 3.8o), các phôi vô tính đạt đến giai đoạn hình quả ngư lôi; trong khi p-ITCL với TCL kích thước nhỏ hơn không cho thấy hình dạng ngư lôi và lá mầm sau 8 tuần nuôi cấy.



Hình 3.8. Phát sinh phôi soma từ gân chính của lá và cuống lá của *Actinidia chinensis* Planch. thông nuôi cấy lớp mỏng tế bào sau 8 tuần nuôi cấy

a-h: Cụm phôi soma có nguồn gốc từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào gân lá chính (mv); (mv; $1/2$ mv-ITCL; $1/4$ mv-ITCL; $1/6$ mv-ITCL; $1/8$ mv-ITCL; $1/2$ mv-tTCL; $1/3$ mv-tTCL; $1/4$ mv-tTCL; từ trái sang phải) (Thước đo: 1 cm)

i-q: Cụm phôi soma có nguồn gốc từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào cuống lá (p); (p; ½ p-ITCL; ¼ p-ITCL; 1/6 p-ITCL; 1/8 p-ITCL; ½ p-tTCL; 1/3 p-tTCL; ¼ p-tTCL; từ trái sang phải) (*Thước đo: 1 cm*)

r, s, t: Phôi soma có hình cầu, hình ngư lôi và lá mầm được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (*Bars: 1 mm*); **u, v x:** Giải phẫu phôi soma hình cầu, hình tim và lá mầm được quan sát dưới kính hiển vi quang học (*Thước đo: 40 µm*).

Bảng 3.7. Sự phát sinh phôi soma của Kiwi thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào của mẫu cuống lá (p) sau 8 tuần nuôi cấy

Mẫu TCL	Cảm ứng phát sinh phôi soma (ngày)	Tỷ lệ phát sinh phôi (%)	Số lượng phôi soma trên mỗi mẫu cây **	GCF _{TCL}	Khối lượng ướt của cụm phôi soma (mg)	Hình thái của phôi soma
p (ĐC)	15,66c*	88,66ab	6,66b	5,90c	1658,66a	
½ p-ITCL	19,33ab	87,33ab	4,33c	7,56c	977,66b	Phôi soma (hình cầu, trái tim và ngư lôi)
¼ p-ITCL	16,00c	74,33c	5,00bc	14,87b	545,00e	và màu sắc (trắng hoặc xanh lục nhạt)
1/6 p-ITCL	16,33bc	92,33a	5,66bc	31,36a	464,66f	
1/8 p-ITCL	16,00c	66,66d	6,00bc	32,00a	459,66f	
½ p-tTCL	15,33c	87,66ab	8,66a	15,18b	954,33c	Phôi soma (hình cầu, hình trái tim, hình ngư lôi và lá mầm)
1/3 p-tTCL	20,00a	75,66c	6,33b	14,37b	596,33d	và màu sắc (trắng hoặc xanh đậm)
¼ p-tTCL	20,33a	78,00c	5,66bc	17,66b	493,66f	

3.2.2.3. Hệ số điều chỉnh tăng trưởng của phát sinh phôi vô tính

Hệ số điều chỉnh tăng trưởng của phát sinh phôi vô tính giữa hai loại mv-tTCL và p-tTCL so với đối chứng cho thấy rằng số lượng phôi soma trên mỗi mẫu cao nhất được ghi nhận với mẫu ½ mv-tTCL (10,66 phôi) và ½ p-tTCL (8,66 phôi) và GCF_{TCL} thu được với ½ mv-tTCL và ½ p-tTCL lần lượt là 21,0 và 15,2; Nghiên cứu hiện tại đã chỉ ra rằng quy trình lấy TCL - SEMs của gân lá và cuống lá quả Kiwi là quy trình tối ưu. Một lượng lớn cảm ứng phát sinh phôi được quan sát từ mv-TCL và p-TCL, các phôi phát sinh có chất lượng, khoẻ và cho khả năng tái sinh chồi cao so với các phương pháp khác.

3.2.3. Ảnh hưởng của BA và TDZ lên quá trình tái sinh chồi

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của BA và TDZ đến sự tái sinh chồi của Kiwi sau 6 tuần nuôi cấy

Cytokinin (mg/L)	Số lượng chồi		Chiều cao chồi (cm)	Số lượng lá tươi của chồi (g)	Trọng lượng tươi của chồi (g)	Hình thái của chồi	
	Tổng	≥ 4 cm					
ĐC	0	2,33d*	1,00d	3,30cd	2,67e	1,68g*	Chồi mỏng, nhỏ, lá xanh lục nhạt
	0,1	3,33cd	2,67bc	4,16abc	3,33de	1,96f	
	0,5	3,67bc	3,33b	4,18abc	4,67abc	2,21e	Chồi lớn, khoẻ, lá màu xanh lục nhạt và được bao phủ bởi lớp lông sáng bóng màu trắng
BA	1,0	5,67ab	5,00a	4,86a	5,67a	3,75b	Chồi lớn và khoẻ, lá màu xanh lục nhạt và được bao phủ bởi lớp lông sáng bóng màu trắng
	1,5	6,67a	3,33b	4,36ab	5,33ab	3,10d	Chồi lớn và khoẻ, lá màu vàng và được bao phủ bởi lớp lông màu trắng
	0,01	2,33d	1,33cd	3,35bcd	3,33de	3,13d	Chồi mỏng và nhỏ có lá màu xanh lục nhạt
TDZ	0,03	2,67cd	1,33cd	2,41d	3,67cde	3,16d	
	0,05	3,67bc	2,00c	3,90bc	4,33bcd	3,94a	Chồi lớn và khoẻ, lá màu vàng và được bao phủ bởi lớp lông màu trắng
	0,07	3,67bc	2,00c	2,87d	4,67abc	3,53c	

Trong nghiên cứu này, việc bổ sung BA hoặc TDZ vào môi trường nuôi cấy đã ảnh hưởng đáng kể đến sự tái sinh chồi ở *A. chinensis*; trong đó, môi trường tái sinh chồi bổ sung 1,0 mg/L BA cho số chồi trên mẫu cây cao hơn (tổng số chồi và chồi có chiều cao lớn hơn 4 cm); hơn nữa, nồng độ BA này cũng cho hiệu quả kéo dài chồi cao hơn so với nghiệm thức TDZ.

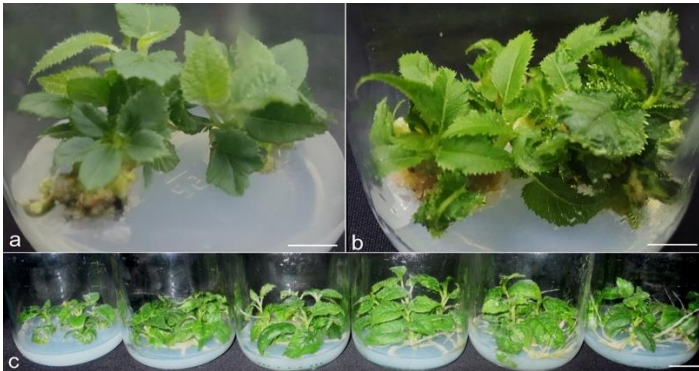
3.2.4. Ảnh hưởng của NAA lên sự ra rễ *in vitro*

Tất cả các chồi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung hoặc không có NAA đều cho thấy sự ra rễ *in vitro* sau 8 tuần. Số rễ trên mỗi cây con và chiều dài rễ tăng tương ứng với sự gia tăng của nồng độ NAA từ 0,1 đến 0,4 và đạt giá trị tối ưu ở 0,4 mg/L (tương ứng là 10,67 cm và 5,85 cm) (Hình 3.9c và Hình 3.10a). Trong khi đó, số lượng rễ trên mỗi cây con và chiều dài rễ giảm ở nồng độ NAA cao hơn 0,4 mg/L. Ngoài ra, chồi được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,4 mg/L NAA cho chất lượng cây con tốt hơn so với các chồi khác thông qua các thông số sinh trưởng như chiều cao cây (7,08 cm), số lá (7,67 lá), chiều dài lá (3,64 cm) và chỉ số SPAD (52,87). Bên cạnh đó, trọng lượng tươi và chiều rộng lá không cho thấy sự khác biệt có ý

nghĩa thống kê giữa các nồng độ NAA từ 0,3 đến 0,5 mg/L. Do đó, việc bổ sung 0,4 mg/L NAA vào môi trường nuôi cấy để tạo ra hiệu quả và chất lượng cây con là tối ưu trong nghiên cứu này.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của NAA lên sự ra rễ *in vitro* của chồi *Actinidia chinensis* sau 8 tuần nuôi cấy

NAA (mg/L)	Chiều cao cây con (cm)	Số lượng rễ trên mỗi cây con	Chiều dài rễ (cm)	Số lượng lá trên mỗi cây con	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chỉ số SPAD	Trọng lượng tươi của cây con (g)
0	5,03c*	2,33f	0,90e	5,67bc	2,16d	1,73d	39,42e	0,47c
0,1	5,17c	4,67e	1,77d	6,67ab	2,48c	2,36c	42,70d	0,88b
0,2	5,61b	6,33d	2,06d	6,67ab	2,78b	2,39c	48,47bc	0,92b
0,3	5,30bc	8,33c	3,77c	6,33bc	2,76b	2,50ab	45,50c	1,29a
0,4	7,08a	10,67a	5,85a	7,67a	3,64a	2,67a	52,87a	1,22a
0,5	5,59b	9,33b	4,31b	5,33c	2,47c	2,52ab	47,00bc	1,31a



Hình 3.9. Tái sinh và tạo rễ *in vitro* của Kiwi

- a:** Tái sinh chồi trên môi trường MS chứa 30 g/L đường, 8 g/L agar;
b: Tái sinh chồi trên môi trường MS chứa 30 g/L đường, 8 g/L agar và 1 mg/L BA;
c: Tạo rễ *in vitro* trên môi trường MS có chứa 30 g/L đường, 8 g/L agar và các nồng độ khác nhau của NAA (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/L hoặc không có NAA (từ trái qua phải)).

3.2.5. Sự thích nghi và sự phát triển cây trong nhà kính

Kết quả của các chồi ra rễ *in vitro* tốt nhất sau khi bổ sung NAA được đưa ra vườn ươm trong nhà kính sau 6 tuần cho thấy ở Bảng 3.13 cây con được trồng trên sự kết hợp của các giá thể HM, CF và BF (với tỷ lệ 2 : 3 : 1 về trọng lượng) cho tỷ lệ sống (93,67%), chiều cao cây con (10,36 cm), chiều dài lá (3,83 cm) và chiều rộng lá (2,92 cm) là cao nhất trong số các tỷ lệ chất nền khác. Trong khi đó, số lượng lá của cây con trồng trên giá thể không khác biệt đáng kể. Sự thích nghi của cây con và sự phát triển của cây con trên các giá thể HM, CF



Hình 3.10. Cây con *in vitro* và *ex vitro* của Kiwi có nguồn gốc từ phôi soma

a: Cây con *in vitro* tái sinh từ chồi có nguồn gốc từ phôi soma được nuôi cây trên môi trường MS có chứa 0,4 mg/L NAA sau 8 tuần nuôi cây (Thước đo: 5 cm)

b: Cây con trồng trong chậu nhựa kết hợp giá thể mùn, xơ dừa và phân bón sinh học (2: 3: 1) sau 2 tuần trong nhà kính (Thước đo : 2 cm)

c: Cây con trồng trong chậu nhựa kết hợp giá thể mùn, xơ dừa và phân bón sinh học (2: 3: 1) sau 6 tuần trong nhà kính (Thước đo : 3 cm)

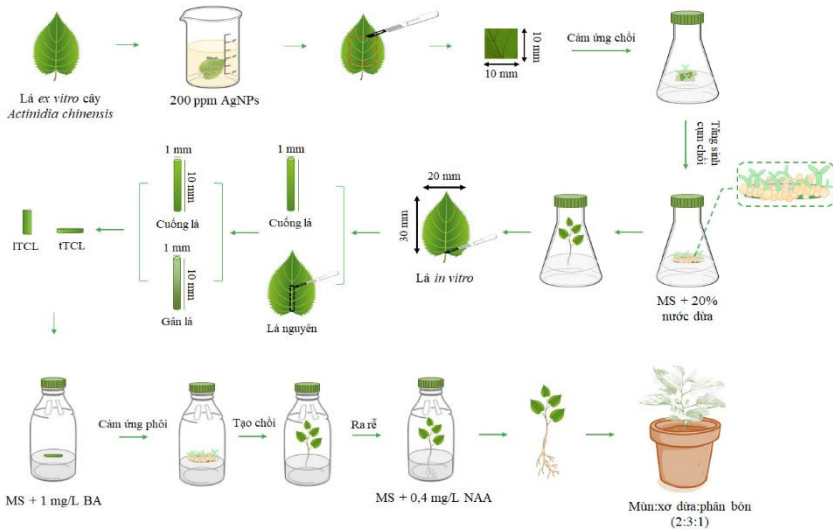
và BF (với tỷ lệ 2 : 3 : 1 về trọng lượng) là tối ưu sau 2 và 6 tuần trong nhà kính (Hình 3.10b-c)

Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng sự kết hợp của các chất nền giúp cây thích nghi và phát triển tốt trong nhà kính.

Bảng 3.11. Sự thích nghi và tăng trưởng của cây con Kiwi sau 6 tuần trong nhà kính

Tỷ lệ giá thể (HM:CF:BF)	Tỷ lệ sồng (%)	Chiều cao cây con (cm)	Số lượng lá mới	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)
1:0:0	76,00bc*	7,71c	0,67b	2,30bc	1,88c
1:3:1	74,67c	8,00c	1,33ab	1,95c	1,88c
2:4:1	88,67a	9,61b	1,67ab	2,80b	2,47b
2:3:1	93,67a	10,36a	2,33a	3,83a	2,92a
2:2:1	85,33ab	9,20b	1,67ab	2,57bc	2,15bc

3.2.6. Sơ đồ quy trình vi nhân giống Kiwi thông qua phát sinh phôi vô tính của mẫu TCL (*mv-tTCL* và *mv-lTCL*) đối với mẫu cây gân lá chính; (*p-tTCL* và *p-lTCL*) đối với mẫu cây cuống lá:



CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Nội dung 1: Nhận diện các loài Kiwi tại Việt Nam và xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử

- Nghiên cứu cho thấy dựa trên 3 vùng *rbcL*, *matK*, ITS bước đầu có thể nhận diện được loài của 2 giống Kiwi tại Việt Nam từ các loài *A. deliciosa* và *A. latifolia*; các cây còn lại được nhận diện từ loài *A. chinensis* và từ loài *A. callosa*. Kết quả này cũng cho thấy khả năng xác định mối quan hệ di truyền của các vùng DNA barcode *rbcL*, *matK* và ITS là khác nhau, hơn nữa việc kết hợp giữa các vùng trình tự với nhau cho hiệu quả cao hơn khi sử dụng riêng lẻ trong việc đánh giá mối quan hệ di truyền cũng như xác định loài.

- Bước đầu đã thành công xác định được giới tính của 6 giống Kiwi vàng nhập nội.

Nội dung 2: Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống

- Những mẫu lá được khử trùng bề mặt với AgNPs cho tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt cao nhất là 51,11% đối với mẫu lá được khử trùng bề mặt với 200 ppm AgNPs; Ngoài ra, môi trường nuôi cấy bổ sung 20% nước dừa cho hiệu quả tăng sinh cụm chồi là tối ưu nhất.

- Nghiên cứu này đã xây dựng được một quy trình hiệu quả đối với vi nhân giống Kiwi thông qua phát sinh phôi vô tính của mẫu TCL (mv-tTCL và mv-ITCL) đối với mẫu cây gân lá chính; (p-tTCL và p-ITCL) đối với mẫu cây cuống lá.

- Sự phát triển của chồi có nguồn gốc phát sinh phôi (với hình dạng một lá mầm) là tối ưu trên môi trường MS có chứa 1,0 mg/L BA.

- Cây con có nguồn gốc từ chồi được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,4 mg/L NAA cho kết quả tối ưu nhất

- Cây con trồng trong chậu nhựa có kết hợp giá thể mùn, xơ dừa và phân bón sinh học (với tỷ lệ 2: 3: 1 về trọng lượng) cho thấy khả năng thích nghi cao hơn và tăng trưởng hơn so với các phương pháp xử lý khác trong nhà kính.

4.2. Kiến nghị

Kết quả của luận án đã đánh giá đa dạng di truyền, xác định giới tính và xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* thông qua công nghệ nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Chúng tôi kiến nghị cần thực hiện thêm một số nghiên cứu sau:

- Dựa vào những hiểu biết về bộ gen cũng như việc đã giải trình tự bộ gen của Kiwi, nghiên cứu lai tạo những dòng hoặc giống

mới để tạo cây lai phù hợp với điều kiện khí hậu tại Việt Nam

- Tiếp tục nghiên cứu và ứng dụng Kỹ thuật TCL để vi nhân giống cây Kiwi với số lượng lớn. Tiếp tục theo dõi khả năng sinh trưởng đến giai đoạn ra hoa và tạo quả của cây Kiwi trồng tại điều kiện khí hậu Lâm Đồng.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Đã xác định được giới tính của một số mẫu Kiwi. Hai mẫu Kiwi đực và 6 mẫu Kiwi cái đã được xác định bằng PCR với cặp mồi *SmY1_F/SmY1_R*.

- Quy trình nhân giống *in vitro* cây Kiwi bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào thông qua phát sinh phôi vô tính từ mẫu cây gân lá chính và mẫu cây cuống lá đã được xây dựng thành công.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyen Thi My Hanh, Hoang Thanh Tung, Hoang Dac Khai, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Nguyen Thi Nhu Mai, Truong Thi Lan Anh, Bui Van Le, Duong Tan Nhut, (2022), Efficient somatic embryogenesis and regeneration from leaf main vein and petiole of *Actinidia chinensis* planch. via thin cell layer culture technology, *Scientia Horticulturae*, 298, 110986.

2. Nguyễn Thị Mỹ Hạnh, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Thị Như Mai, Vũ Quốc Luận, Huỳnh Văn Biết, Huỳnh Hữu Đức, Hoàng Thị Như Phương, Bùi Văn Lê, Dương Tấn Nhựt (2022), Xác định giới tính bằng chỉ thị phân tử và vi nhân giống cây kiwi vàng (*Actinidia chinensis*), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Bản B)*, 64(7) 54-59.

3. Nguyễn Thị Mỹ Hạnh, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Nguyễn Thị Như Mai, Vũ Quốc Luận, Đỗ Mạnh Cường, Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Trường Giang, Hoàng Thị Như Phương, Bùi Văn Lê, Dương Tấn Nhựt (2022), Sử dụng DNA barcode trong phân tích đa dạng di truyền và nhận diện một số loài kiwi (*Actinidia spp.*), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Bản B)* (Chấp nhận đăng).