

**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**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**HÀ NỘI - 2022**

**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**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Chuyên ngành: Sinh lý học thực vật  
Mã số: 9 42 01 12**

**Người hướng dẫn khoa học:**

- 1. PGS.TS. Bùi Văn Lệ**
- 2. GS.TS. Dương Tấn Nhựt**

**HÀ NỘI - 2022**

## LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ quý báu của Quý Thầy Cô, các Anh Chị, các Em, các bạn và Gia đình tôi.

Tôi trân trọng bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất đến GS.TS. Dương Tấn Nhựt, người thầy kính mến đã trực tiếp tận tình hướng dẫn, dìu dắt, dạy bảo, động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn tốt nghiệp. Thầy đã tạo động lực, truyền nhiệt huyết và định hướng cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu tại phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS Bùi Văn Lệ, thầy luôn tận tình giúp đỡ cũng như động viên tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Tôi cũng trân trọng cảm ơn TS. Hoàng Thanh Tùng, người đã dành thời gian, nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình viết, chỉnh sửa các bài báo và luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện nghiên cứu khoa học Tây Nguyên đã tận tình giúp đỡ tôi trong thời gian nghiên cứu và hoàn thiện luận văn.

Các cô, các anh chị trong Phòng Công nghệ sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh, Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường - Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Phòng Đào tạo Học viện Khoa học và Công nghệ đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hướng dẫn bố trí các thí nghiệm về sinh học phân tử.

Tôi chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của Quý Thầy cô, các Anh chị đang làm việc tại phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, các Nghiên cứu sinh, Học viên cao học, các bạn sinh viên đang thực hiện luận án, luận văn tốt nghiệp tại phòng.

Xin trân trọng gửi lời cảm ơn tới bạn bè, đồng nghiệp của tôi ở Trường Cao đẳng Nghề Đà Lạt đã luôn động viên, tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực

hiện luận văn và những lúc tôi gặp khó khăn.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình đã luôn ở bên cạnh động viên và giúp đỡ tôi học tập và làm việc để hoàn thành luận văn này.

Lâm Đồng, ngày 09 tháng 01 năm 2023

**Nguyễn Thị Mỹ Hạnh**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Dương Tấn Nhựt và PGS.TS. Bùi Văn Lệ. Nghiên cứu này được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hạt nano kim loại lên sự phát sinh hình thái, sinh trưởng - phát triển, sinh lý - sinh hóa và tích lũy hợp chất thứ cấp của một số cây trồng có giá trị kinh tế nuôi cấy *in vitro*”, mã số đề tài NCXS01.03/22-24 thuộc chương trình phát triển nhóm Nghiên cứu xuất sắc của Viện Hàn Lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam do GS.TS. Dương Tấn Nhựt chủ trì. Đề tài nghiên cứu này được thực hiện tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên. Các số liệu, kết quả trình bày trong luận án là trung thực, khách quan, nghiêm túc và chưa từng được sử dụng để công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về sự cam đoan này.

Lâm Đồng, ngày 09 tháng 01 năm 2023

**Nguyễn Thị Mỹ Hạnh**

**MỤC LỤC**

<b>LỜI CẢM ƠN</b> .....	<b>i</b>
<b>LỜI CAM ĐOAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT</b> .....	<b>viii</b>
<b>DANH MỤC BẢNG</b> .....	<b>x</b>
<b>DANH MỤC HÌNH</b> .....	<b>xi</b>
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
Lý do chọn đề tài.....	1
Mục tiêu, yêu cầu của đề tài.....	2
* Mục tiêu.....	2
* Yêu cầu.....	3
Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài.....	3
* Đối tượng nghiên cứu của đề tài.....	3
* Phạm vi nghiên cứu của đề tài.....	3
Ý nghĩa khoa học.....	4
Ý nghĩa thực tiễn.....	4
Những đóng góp mới của luận án.....	4
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Giới thiệu về cây Kiwi</b> .....	<b>6</b>
1.1.1. Phân bố cây Kiwi.....	6
1.1.2. Giá trị dinh dưỡng của trái Kiwi.....	8
1.1.3. Giá trị kinh tế.....	10
<b>1.2. Các kỹ thuật nhân giống Kiwi</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Nhân giống bằng phương pháp truyền thống.....	10
1.2.1.1. Gieo hạt.....	10
1.2.1.2. Ghép.....	11
1.2.1.3. Giâm cành bánh tẻ.....	11
1.2.2. Vi nhân giống cây Kiwi.....	12
1.2.2.1. Giới thiệu chung.....	12
1.2.2.2. Ứng dụng vi nhân giống một số đối tượng Kiwi.....	13
1.2.3. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.....	16
1.2.3.1. Giới thiệu chung.....	16

1.2.3.2. Ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong vi nhân giống một số đối tượng cây trồng.....	17
1.2.4. Phát sinh phôi soma .....	20
1.2.4.1. Giới thiệu chung .....	20
1.2.4.2. Ứng dụng phát sinh phôi soma trong vi nhân giống một số đối tượng cây trồng.....	21
<b>1.3. Đánh giá đa dạng di truyền và xác định giới tính thực vật.....</b>	<b>24</b>
1.3.1. Giới thiệu chung .....	24
1.3.2. Ứng dụng sinh học phân tử và phương pháp xác định giới tính ở một số đối tượng cây trồng.....	26
<b>CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Vật liệu nghiên cứu .....</b>	<b>30</b>
2.1.1. Vật liệu thực vật .....	30
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất .....	31
2.1.2.1. Thiết bị và dụng cụ.....	31
2.1.2.2. Hóa chất.....	31
<b>2.2. Nội dung nghiên cứu .....</b>	<b>32</b>
2.2.1. Nhận diện các loài Kiwi tại Việt Nam và xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử.....	32
2.2.2. Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống .....	32
<b>2.3. Phương pháp nghiên cứu.....</b>	<b>32</b>
2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm.....	33
2.3.1.1. Nhận diện các loài Kiwi tại Việt Nam và xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử .....	33
2.3.1.2. Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống .....	36
2.3.2. Phương pháp quan sát giải phẫu hình thái phát sinh phôi soma .....	40
2.3.3. Phương pháp ghi nhận số liệu .....	41
2.3.4. Môi trường nuôi cấy/trồng .....	42
2.3.5. Điều kiện nuôi cấy .....	42
2.3.6. Phân tích thống kê.....	42
2.3.7. Địa điểm và thời gian nghiên cứu .....	43
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>44</b>

<b>3.1. Đánh giá đa dạng di truyền và xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử .....</b>	<b>45</b>
3.1.1. PCR và giải trình tự DNA.....	45
3.1.2. Đánh giá, định danh, phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu cây Kiwi .....	47
3.1.2.1. Kết quả phân tích sự khác biệt giữa các trình tự rbcL của 19 mẫu Kiwi thu thập .....	47
3.1.2.2. Kết quả phân tích sự khác biệt giữa các trình tự matK của 16 mẫu Kiwi thu thập .....	49
3.1.2.3. Kết quả phân tích sự khác biệt giữa các trình tự ITS của 15 mẫu Kiwi thu thập .....	50
3.1.2.4. Vùng matK + ITS .....	53
3.1.2.5. Vùng rbcL + matK + ITS .....	54
<b>3.2. Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống.....</b>	<b>57</b>
3.2.1. Tạo nguồn mẫu in vitro .....	57
3.2.1.1. Khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi.....	57
3.2.1.2. Tăng sinh cụm chồi .....	59
3.2.2. Hiệu quả sự hình thành và phát sinh phôi soma của Kiwi từ gân lá chính và cuống lá thông qua công nghệ nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL).....	61
3.2.2.1. Phát sinh phôi vô tính thông qua nuôi cấy gân lá chính mv-tTCL và mv-ITCL .....	61
3.2.2.2. Phát sinh phôi vô tính thông qua nuôi cấy cuống lá p-tTCL và p-ITCL .....	61
3.2.2.3. Hệ số điều chỉnh tăng trưởng của phát sinh phôi vô tính.....	68
3.2.3. Ảnh hưởng của BA và TDZ lên quá trình tái sinh chồi.....	70
3.2.4. Ảnh hưởng của NAA lên sự ra rễ in vitro.....	72
3.2.5. Sự thích nghi và sự phát triển cây trong nhà kính.....	75
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-ITCL) đối với mẫu cây gân lá chính; (p-tTCL và p-ITCL) đối với mẫu cây cuống lá) .....	77
<b>CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>80</b>
<b>4.1. Kết luận .....</b>	<b>81</b>



<b>4.2. Kiến nghị .....</b>	<b>82</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ .....</b>	<b>83</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>84</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>100</b>

**DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT**

AgNPs	Synthesis of Silver nanoparticles
BA	Benzyl adenine
BF	Biofertilizers
BOLD	The barcode of life data system
CBOL	Consortium for the Barcode of Life
CDHSTTV	Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
CF	Coconut fiber
COI	Cytochrome oxidase I
cpDNA	Chloroplast DNA
cpn60	Chaperonin 60
CPNs	Conjugated polymer nanoparticles
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
CTX	Cefotaximases
DNA	Deoxyribonucleic acid
FrBy	Friendly Boy
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GCF	Growth correction factor
HM	Humus
iBOL	The International Barcode of Life
ITS	Internal transcribed spacer
kDa	Kilo daltons
ITCL	Longitudinal thin cell layer
MLST	Multilocus sequence typing
MOTU	Molecular operational taxonomic unit
MS	Murashige và Skoog, 1962
MSE	Somatic embryogenesis medium
MTB	Mycobacterium tuberculosis
mv-ITCL	mainveincut longitudinal TCL
mv-tTCL	mainveincut transverse TCL
matK	Maturase K
NAA	$\alpha$ -naphthalenacetic acid
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
nrDNA	Nuclear DNA
PCR	Polymerase chain reaction

PGPR	Plant growth-promoting rhizobacteria
PLBs	Protocorm like bodies
p-lTCL	petiole cutlongitudinal TCL
p-tTCL	petiole cut transverse TCL
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
rbcL	Large subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo)
SE	Somatic embryo
SEM	Somatic embryogenesis
SyG1	Shy Girl
TCL	Thin cell layer
TDZ	Thidiazuron
tTCL	Transverse thin cell layer

## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng 1.1.</b> So sánh thành phần dinh dưỡng của trái Kiwi xanh và Kiwi vàng .....	9
<b>Bảng 1.2.</b> Ứng dụng vi nhân giống một số đối tượng Kiwi.....	14
<b>Bảng 1.3.</b> Một số thành tựu nghiên cứu sử dụng kỹ thuật TCL trong vi nhân giống .....	18
<b>Bảng 1.4.</b> Ứng dụng nghiên cứu phát sinh soma .....	22
<b>Bảng 1.5.</b> Một số thành tựu nghiên cứu sinh học phân tử .....	27
<b>Bảng 2.1.</b> Các cặp primer khuếch đại vùng <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , ITS.....	33
<b>Bảng 2.2.</b> Cặp primer khuếch đại vùng SmY .....	35
<b>Bảng 2.3.</b> Tỷ lệ phối trộn giá thể đất mùn, xơ dừa và phân bón vi sinh .....	40
<b>Bảng 3.1.</b> Tỷ lệ khuếch đại các vùng DNA barcode <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , ITS của 20 mẫu Kiwi nghiên cứu .....	45
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả ly trích DNA tổng số.....	55
<b>Bảng 3.3.</b> Ảnh hưởng của các chất khử trùng lên khả năng khử trùng bề mặt mẫu cây và cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy.....	57
<b>Bảng 3.4.</b> Sự tái sinh chồi từ mẫu cây lá Kiwi được khử trùng bằng AgNPs, HgCl <sub>2</sub> và NaOCl sau 8 tuần nuôi cấy.....	58
<b>Bảng 3.5.</b> Ảnh hưởng của dịch chiết hữu cơ lên khả năng tăng sinh cụm chồi Kiwi sau 8 tuần nuôi cấy .....	59
<b>Bảng 3.6.</b> 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.....	63
<b>Bảng 3.7.</b> 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.....	67
<b>Bảng 3.8.</b> So sánh hệ số điều chỉnh tăng trưởng của các phôi vô tính.....	68
<b>Bảng 3.9.</b> Ảnh hưởng của BA và TDZ đến sự tái sinh chồi của Kiwi sau 6 tuần nuôi cấy .....	71
<b>Bảng 3.10.</b> Ảnh hưởng của NAA lên sự ra rễ <i>in vitro</i> của chồi Kiwi sau 8 tuần nuôi cấy .....	73
<b>Bảng 3.11.</b> Sự thích nghi và tăng trưởng của cây con Kiwi sau 6 tuần trong nhà kính .....	77

## DANH MỤC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Phạm vi phân bố tự nhiên của Kiwi.....	8
<b>Hình 1.2.</b> Vườn ươm cây Kiwi .....	11
<b>Hình 1.3.</b> Nuôi cấy mô và sản xuất cây con Kiwi .....	13
<b>Hình 2.1.</b> Hình thái lá của 20 mẫu Kiwi .....	30
<b>Hình 2.2.</b> Sơ đồ minh họa ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào để tạo ra các mẫu cây khác nhau từ gân chính của lá (mv) và cuống lá (p) của Kiwi. ....	38
<b>Hình 3.1.</b> Cây phát sinh chủng loài của 19 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng <i>rbcL</i> và trình tự tham chiếu trên NCBI.....	48
<b>Hình 3.2.</b> Cây phát sinh chủng loài của 16 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng <i>matK</i> .....	50
<b>Hình 3.3.</b> Cây phát sinh chủng loài của 15 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng ITS.....	51
<b>Hình 3.4.</b> Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng <i>matK</i> + ITS.....	53
<b>Hình 3.5.</b> Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng <i>rbcL</i> + <i>matK</i> + ITS.....	54
<b>Hình 3.6.</b> Kết quả điện di và kiểm tra sản phẩm PCR.....	56
<b>Hình 3.7.</b> Tạo nguồn mẫu <i>in vitro</i> cây Kiwi .....	60
<b>Hình 3.8.</b> Phát sinh phôi soma từ gân chính của lá và cuống lá của Kiwi thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào sau 8 tuần nuôi cấy .....	65
<b>Hình 3.9.</b> Tái sinh và tạo rễ <i>in vitro</i> của Kiwi. ....	74
<b>Hình 3.10.</b> Cây con <i>in vitro</i> và <i>ex vitro</i> của Kiwi có nguồn gốc từ phôi soma.....	76
<b>Hình 3.11.</b> Quy trình 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) .....	79

## MỞ ĐẦU

### Lý do chọn đề tài

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. Do có vùng phân bố rộng nên ở những môi trường khí hậu và địa lý khác nhau, chi *Actinidia* thể hiện sự biến đổi sinh học rất lớn. Sự biến đổi này thể hiện ở các đặc điểm sinh học chung của các loài, nhất là đối với hai loài trồng trọt thương mại là *Actinidia chinensis* var. *chinensis* và *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* bao gồm rễ, chồi, thân, lá, hoa và quả [1].

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 trái đạt tiêu chuẩn thương mại [2]. Trong đó, *A. chinensis* bao gồm Kiwi đỏ, Hort 16, Kiwi vàng [3] được chọn lọc cho thấy sự đa dạng và các tính trạng vượt trội so với trái Kiwi của các giống khác như kích thước trái, hàm lượng vitamin C, hàm lượng chất rắn hòa tan và tuổi thọ trong kho lạnh hoặc ở nhiệt độ phòng, ra hoa kết quả sớm, chịu rét, chịu hạn. 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 [4,5] và hầu hết các loài này có thể giao phấn với nhau rất dễ dàng [6,7]. 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 [8]. 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 [9]. 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 Nhật [10]. 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 cấy TCL có đặc điểm chung là mỏng [11]. 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. Lý do cơ bản của việc ứng dụng một vài tế bào trong hệ thống TCL là vì chúng có mối liên hệ mật thiết với các tế bào bị tổn thương khi cắt và chất dinh dưỡng cùng với các yếu tố khác bên trong môi trường để “kiểm soát” sự phát sinh hình thái. 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.

### **Mục tiêu, yêu cầu của đề tài**

#### **\* Mục tiêu**

- Đánh giá, định danh, phân tích mối quan hệ di truyền của 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 Kiwi 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.

**\* Yêu cầu**

Xác định được nguồn vật liệu là các mẫu cây Kiwi tự nhiên của Việt Nam, các mẫu cây nhập nội trên thị trường để đánh giá, phân tích mối quan hệ di truyền và xác định giới tính cây Kiwi. Xác định các điều kiện khử trùng, thành phần môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy, vật liệu nuôi cấy thích hợp cho sự phát sinh phôi soma, sự tái sinh chồi và tăng sinh cụm chồi.

Trồng được cây con *in vitro* ở các điều kiện giá thể khác nhau và đạt tỉ lệ sống sót cao trong điều kiện vườn ươm.

**Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài**

**\* Đối tượng nghiên cứu của đề tài**

Đối tượng nghiên cứu là Kiwi tự nhiên được thu thập ở Việt Nam và Kiwi thương mại nhập nội.

**\* Phạm vi nghiên cứu của đề tài**

Phạm vi nội dung: đánh giá di truyền nguồn gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử (DNA barcode) của một số giống tự nhiên và giống nhập nội, chọn dòng cây Kiwi là những cây đã được xác định giới tính và nhân giống *in vitro* thông qua công nghệ nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

Phạm vi không gian và thời gian: Các thí nghiệm nhân giống *in vitro* cây Kiwi được tiến hành thí nghiệm tại Phòng Sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng của Viện Nghiên cứu khoa học Tây nguyên và tại Trường Cao đẳng Nghề Đà Lạt; các thí nghiệm về sinh học phân tử được tiến hành thí nghiệm tại Bộ môn Công nghệ sinh học thực vật Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Thành phố Hồ Chí Minh, Viện nghiên cứu Công nghệ sinh học và môi trường - Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh và Trung tâm Công nghệ sinh học - Thành phố Hồ Chí Minh.



### **Ý nghĩa khoa học**

Hiểu về đặc điểm di truyền của Kiwi, làm cơ sở để phân loại và tuyển chọn nguồn gen phục vụ cho nhân giống *in vitro* cây Kiwi. Xác định giới tính cây Kiwi góp phần lựa chọn nguồn vật liệu ban đầu phù hợp để rút ngắn thời gian nhân giống cây Kiwi.

### **Ý nghĩa thực tiễn**

Kết quả nghiên cứu của đề tài góp phần chủ động trong công tác tạo nguồn giống cây Kiwi *in vitro* phục vụ công tác giống ở Lâm Đồng và những vùng có điều kiện tự nhiên tương tự. Việc hiểu biết nhiều hơn về mối quan hệ di truyền, về giới tính cây Kiwi và điều kiện môi trường phù hợp cho nhân giống sẽ giúp vùng Lâm Đồng có một loại cây trồng mới phù hợp cho giá trị kinh tế cao.

### **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.

**CHƯƠNG 1**

**TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

## 1.1. Giới thiệu về cây Kiwi

### 1.1.1. Phân bố cây Kiwi

Kiwi là một loại trái cây thuộc chi *Actinidia*. Đó là một chi được tìm thấy chủ yếu ở miền nam Trung Quốc, bao gồm 54 loài được trồng trong các vườn thương mại của Trung Quốc [1,12]. 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. Ngày nay có hai loài được dùng trong thương mại là: *A. chinensis* var. *chinensis* (Kiwi vàng) và *A. chinensis* var. *deliciosa* (Kiwi xanh) [1]. Hai loài này đều có giá trị kinh tế cao, kích thước trái lớn so với các loài khác.

*Actinidia chinensis* có nhiều giống như “Guifeng”, “Guilu”, “Guimi” và “Xuzhou 78-3” [1,13] nhưng chúng không được trồng rộng rãi, các giống này được thu thập trong tự nhiên. Mark McNeilage, 1987 đã lai cây cái *A. chinensis* var. *chinensis* CK01 với phấn hoa của cây *A. chinensis* var. *chinensis* CK15-01 và được đặt tên là *A. chinensis* var. *chinensis* - “Hort16A” [1].

“Hort16A” là cây lưỡng bội, trọng lượng trái trung bình 95 - 100g. Thịt trái có màu vàng lục đến vàng nhạt tùy theo thời gian thu hoạch. Thời gian bảo quản 12 - 16 tuần ở  $0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Nhiệt độ bảo quản tối ưu là  $1,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  [14]. Trái được ra mắt trên thị trường quốc tế với tên Zespri™ Gold Kiwi. Tuy nhiên giống này rất dễ bị nhiễm vi khuẩn. Kể từ đó, Carpato và cộng sự, 2000 đã sử dụng giống cây trồng “Hort16A” làm bố mẹ ban đầu tạo con lai “Zesy002”. Sau khi được cấp bằng sáng chế bởi US Plant Patent 22,355 P3, “Zesy002” có tên là Zespri® SunGold Kiwi [1].

*Actinidia* thường phân bố ở các vùng đất ẩm và tối xộp với độ cao 800 - 1.400 m đôi khi lên đến 1.950 m so với mực nước biển. *A. chinensis* var. *chinensis* có nhiều nhất ở những vùng có lượng mưa hàng năm là 1000 - 2000 mm và độ ẩm tương đối là 75 - 85% [1].

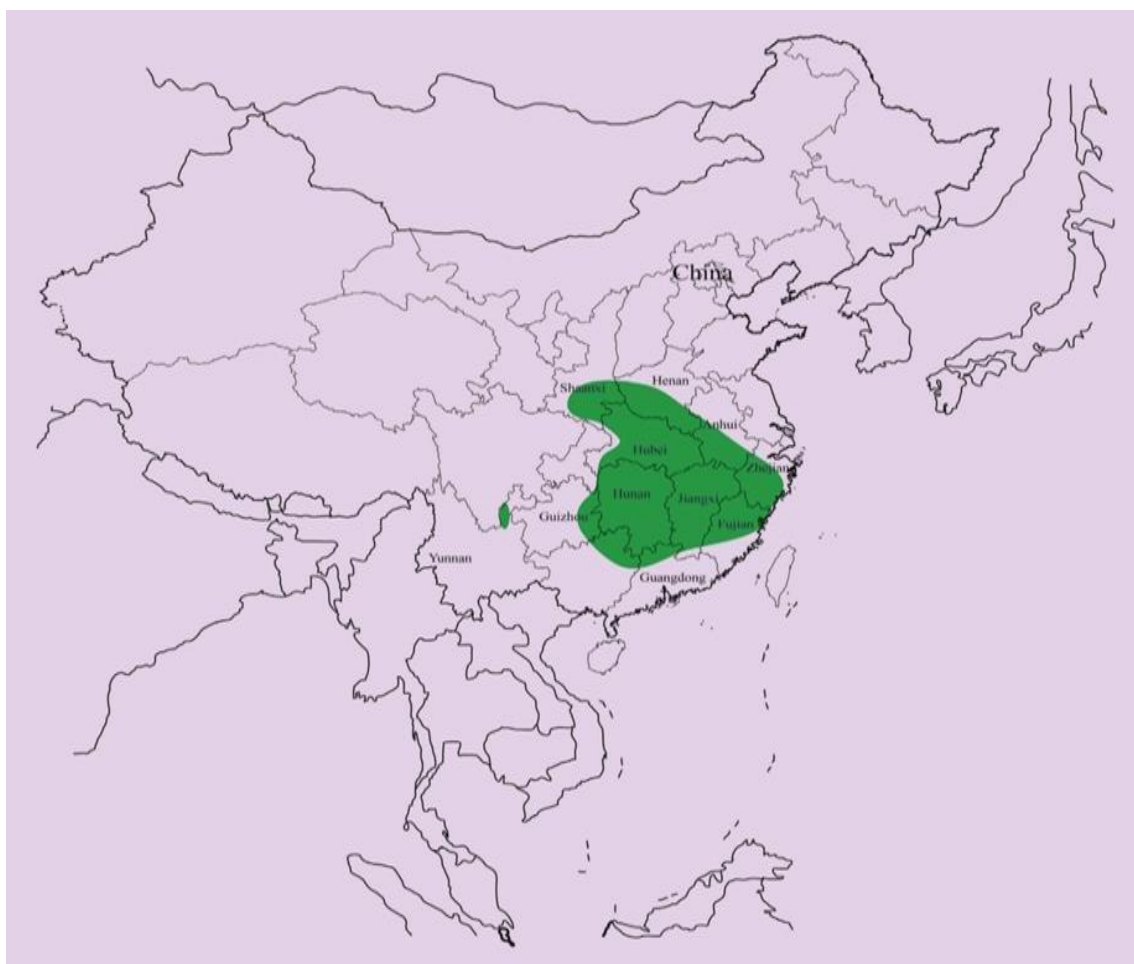
Tất cả các loài trong chi *Actinidia* xuất hiện đều có cây đực và cây cái hiếm khi có các biến thể không phù hợp về giới tính xảy ra. Sự khác biệt về giải phẫu và hình thái của lá và cuống lá kiwi có thể đóng một vai trò quan trọng trong việc xác định giới tính. Không có sự khác biệt quan trọng giữa cây đực và cây cái trong cấu trúc của hệ thống mạch ở lá và cuống lá. Vì vậy, độ dày của lá và hình thái bề mặt

của biểu bì trên lá có thể được coi là những thông số cấu trúc quan trọng để xác định giới tính. Hoa cái chủ yếu mọc đơn độc hay thành cụm có hai đến ba hoa. Hoa đực mọc thành cụm gồm hai đến ba hoa một cụm, hoa nhỏ hơn hoa cái, bao phấn có màu vàng, bầu nhụy tiêu giảm. Về mặt hình thái, cả hoa đực và hoa cái đều hoàn chỉnh (hữu thụ) và lưỡng tính. Tuy nhiên, việc rụng phấn hoa đối với hoa cây cái và thoái hóa bầu nhụy với hoa cây đực làm cho cây leo thể hiện chức năng đơn tính [1].

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 [15]. Phương pháp vi nhân giống Kiwi hiện nay đã đạt được một số kết quả như tái sinh chồi [16], phát sinh cơ quan [17], phát sinh phôi soma [18] và tái sinh cây [17] 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* [19], nghiên cứu giảm hom và gieo hạt trên cây *A. latifolia* và *A. deliciosa* [20]. Ở Lâm Đồng có khí hậu nhiệt đới gió mùa biến thiên theo độ cao. Nhiệt độ thay đổi rõ rệt giữa các khu vực, càng lên cao nhiệt độ càng giảm. Nhiệt độ trung bình năm từ 18 - 25°C. Lượng mưa trung bình 1.750 - 3.150 mm/năm, độ ẩm tương đối trung bình cả năm đạt 85 - 87%, thuận lợi cho phát triển các loại cây trồng có nguồn gốc ôn đới. 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 ở miền Nam Trung Quốc.

Tuy nhiên, cây Kiwi được xem là một loại cây rất khó phát triển nên ở Lâm Đồng chưa có sản xuất giống cây này. Một số nhà cung cấp giống ở Việt Nam như Trung tâm cây giống - Viện nông nghiệp Việt Nam chủ yếu nhập khẩu cây ghép từ các nước Trung Quốc, Đài Loan.



**Hình 1.1.** Phạm vi phân bố tự nhiên của Kiwi.

### ***1.1.2. Giá trị dinh dưỡng của trái Kiwi***

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, bao gồm một loạt các chất chống oxy hóa, dinh dưỡng thực vật và enzyme để cung cấp các lợi ích về chức năng và trao đổi chất.

Cơ sở dữ liệu dinh dưỡng quốc gia USDA cho thấy tổng hàm lượng acid ascorbic trong giống Kiwi xanh (có tên gọi thương mại là Hayward) là 92,7 mg/100 g thịt trái Kiwi, thấp hơn so với Kiwi vàng là 161,3 mg/100g và cao gần gấp ba lần lượng acid ascorbic có trong cam và dâu tây tính theo trọng lượng thịt trái có thể ăn được (Bảng 1.1) [21].

**Bảng 1.1.** So sánh thành phần dinh dưỡng của trái Kiwi xanh và Kiwi vàng

<b>Dinh dưỡng</b>	<b>Đơn vị/100g</b>	<b>Kiwi xanh (<i>Actinidia deliciosa- Hayward</i>)</b>	<b>Kiwi vàng (<i>Actinidia chinensis- SunGold</i>)</b>
<i>Khoáng chất</i>			
Canxi, Ca	mg	34	17,0
Sắt, Fe	mg	0,31	0,21
Mg	mg	17	12,0
P	mg	34	25
K	mg	312	315
Na	mg	3	3
<i>Vitamins</i>			
Vitamin C	mg	92,7	161,3
Vitamin B1	mg	0,027	< 0,01
Vitamin B2	mg	0,025	0,074
Vitamin B3	mg	0,341	0,231
Vitamin B5	mg	0,183	0,12
Vitamin B6	mg	0,063	0,079
Vitamin B9	µg, DFE	25	31,0
Vitamin B12	µg	0	0,08
Vitamin A	IU	87	23
Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol)	mg	1,46	1,51
Vitamin K	µg	40,3	6,1
USDA NDB No		09148	09520

(Nguồn: Trích cơ sở dữ liệu quốc gia để tham khảo tiêu chuẩn cho mỗi trái Kiwi xanh và Kiwi vàng trong 100g, USDA, 2018).

Trái Kiwi cũng chứa hàm lượng vitamin E tương đối cao, so với các loại trái cây được tiêu thụ khác,  $\alpha$ -tocopherol có trong thịt trái, có hàm lượng lần lượt là 1,40 và 1,5 mg trên 100 g trái vàng và trái xanh tương ứng. Ngoài ra,  $\delta$ -tocomonoenol trong trái Kiwi cũng có khả năng chống oxy hóa [21].

Trái Kiwi còn là nguồn cung cấp axit folic tốt cho chế độ ăn uống. Theo Richardson và cộng sự (2018) hàm lượng folate trong trái Kiwi cao hơn một số loại trái cây như chuối, nho, táo; hàm lượng folate trong trái Kiwi xanh là 25  $\mu\text{g}/100\text{g}$  thịt trái còn ở trái Kiwi vàng là 31  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . Vì folate rất bền ở dạng tươi và dễ bị phá hủy khi nấu chín trong các loại rau xanh nên folate có trong trái Kiwi tươi có thể đóng góp một phần hữu ích vào tổng chế độ ăn uống và được xem là thực phẩm bổ sung [21].

### ***1.1.3. Giá trị kinh tế***

Trái Kiwi mặc dù có nguồn gốc từ Trung Quốc nhưng khi du nhập vào New Zealand những năm 1920, nó mới được đánh giá cao trên thị trường New Zealand vì hình dáng và hương vị mới lạ, đặc trưng. Ngoài giá trị dinh dưỡng thì trái Kiwi còn có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm và chống oxy hóa, có thể được sử dụng như một loại trái cây dược liệu tiềm năng.

Với giá trị kinh tế cao như vậy, nên các đồn điền thương mại đầu tiên được thành lập vào năm 1937 [22] và đến nay New Zealand là nước thứ hai sản xuất trái Kiwi cao nhất thế giới sau Trung Quốc với hơn 14.000 ha. Theo nghiên cứu của Mapu và cộng sự năm 2019, giá trị kinh tế của trái Kiwi xanh chỉ đạt khoảng 300 nghìn - 450 nghìn USD/ha trong khi đó vườn Kiwi vàng đạt khoảng 800 nghìn - 1.000 nghìn USD/ha [23], cao gấp 2,5 lần giá trị so với Kiwi xanh. Năm 2020, các quốc gia xuất khẩu Kiwi tươi hàng đầu là New Zealand (54%), Ý (16,4%), Bỉ (6,9%), Hy Lạp (6,1%) và Chile (5,7%) [24].

## **1.2. Các kỹ thuật nhân giống Kiwi**

### ***1.2.1. Nhân giống bằng phương pháp truyền thống***

#### ***1.2.1.1. Gieo hạt***

Các nhà khoa học nghiên cứu đã xác định đặc điểm của hạt Kiwi ở trạng thái ngủ và nảy mầm trong phản ứng với các yếu tố môi trường như nhiệt độ và ánh sáng [25]. Các phương pháp phổ biến để phá vỡ tình trạng ngủ đông là xử lý bằng nhiệt và xử lý hormone. Tỷ lệ nảy mầm có thể được cải thiện đáng kể bằng cách giữ hạt ở 4,4°C trong 6 - 8 tuần và sau đó điều chỉnh nhiệt độ 10°C vào ban đêm và 20°C vào ban ngày. Ngoài ra, hạt giống có thể được lưu trữ trong một túi nhựa ở 4°C trong 5 tuần và sau đó để nhiệt độ 21°C trong 16 giờ và 10°C trong 8 giờ. Phương pháp này

làm cho tỷ lệ nảy mầm trên 90% [26]. Hiệu quả tương tự có thể đạt được bằng cách ngâm hạt trong GA3 ở nồng độ 6.000 ppm ở 35°C trước khi gieo [27].

#### 1.2.1.2. Ghép

Ghép là cách thông thường để sản xuất cây Kiwi nhằm giữ đặc tính di truyền của cây trồng. Có nhiều phương pháp ghép cây Kiwi bao gồm ghép khe, ghép lưới, ghép vỏ hoặc màng, ghép cành chồi bên và những phương pháp ghép chồi khác. Thời gian tốt nhất để ghép là mùa xuân trước thời kỳ chảy nhựa cây. Ở Trung Quốc, các kỹ thuật được sử dụng phổ biến nhất là ghép cành chồi bên hoặc ghép thân. Bất kể phương pháp nào được sử dụng, các điểm chính để ghép thành công là vết cắt phải sắc nét; định vị chính xác vị trí của cành ghép trong việc tiếp xúc với tầng sinh gỗ; liên kết chặt chẽ giữa các vết cắt và dán kín, giữ cho mỗi ghép cũng như giữ cho gốc ghép được tưới nước tốt [1,27,28].

Cây con dùng làm gốc ghép được trồng từ *A. chinensis* var. *chinensis* và var. *deliciosa* được coi là tốt hơn bởi vì chúng khỏe hơn và dễ thích nghi hơn [1]. Các gốc ghép khác nhau ảnh hưởng đến sự khởi đầu và phát triển sinh lý của nụ hoa. Gốc ghép được lựa chọn có khả năng chịu stress và kháng bệnh cho chất lượng tốt và năng suất trái Kiwi cao [29].



**Hình 1.2.** Vườn ươm cây Kiwi

#### 1.2.1.3. Giâm cành bánh tẻ

Phương pháp này sử dụng cành giâm từ các cành bánh tẻ để nhân giống [1]. Cành giâm có đường kính 0,4 - 1,0 cm và dài 10 - 15 cm với hai hoặc ba chồi. Việc cắt cành phải thực hiện trong nhà hoặc ở nơi có mái che, râm mát. Chúng được



kiểm soát bằng hormone tăng trưởng (thường bằng cách nhúng vào dung dịch IBA, 6000-8000 ppm) trước khi trồng trên luống/giá thể. Cành giâm được giữ ẩm bằng cách thường xuyên điều chỉnh độ ẩm và che ánh sáng nhưng cần thông gió tốt.

Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng giâm cành từ cây Kiwi được đặc trưng bởi khả năng ra rễ thay đổi. Các yêu cầu về biện pháp xử lý bằng hệ thống tưới, phun sương, kiểm soát nhiệt độ, chất tăng trưởng trong giâm cành cho thấy Kiwi một trong những loài khó ra rễ nhất. Ngoài ra, kiểu cắt và thời gian cắt cành ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự ra rễ của cành giâm Kiwi [30].

Ngoài ra, người ta còn có thể lấy các chồi non Kiwi một năm tuổi để giâm cành. Nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu bổ sung IBA vào dung dịch ngâm cành Kiwi cho thấy tỉ lệ ra rễ của cành giâm đạt 81,34% [31].

### **1.2.2. Vi nhân giống cây Kiwi**

#### *1.2.2.1. Giới thiệu chung*

Các cây Kiwi vi nhân giống đôi khi được báo cáo là khó trồng trong vườn hơn so với cây được cắt cành hoặc ghép nhưng so sánh lâu dài giữa các cây Kiwi được nhân giống bằng các phương pháp khác nhau chỉ ra rằng các cây thu được bằng cách nhân giống trong ống nghiệm cho năng suất như những cây được nhân giống từ giâm hom hoặc nhân giống từ ghép [32]. Để nâng cao hiệu quả nhân giống *in vitro* cần chú ý sử dụng các chồi tái sinh từ mô sẹo vì *Actinidia* sp. tái sinh dễ dàng từ các tế bào chưa biệt hóa và có khả năng biến dị soma cao [33]. Ngoài ra, trong quá trình nhân giống *in vitro*, việc tăng sinh cụm chồi đã được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu vì các hợp chất hữu cơ có tác dụng thúc đẩy quá trình sinh trưởng và phát triển của cây, đặc biệt là những cây thân gỗ khó nhân giống như Kiwi [34]. Các hợp chất hữu cơ được dùng phổ biến trong nuôi cấy *in vitro* như nước dừa, dịch chiết chuối, cà rốt, khoai tây, peptone và triptone, đây là những nhân tố đóng vai trò không kém phần quan trọng trong quá trình nhân giống *in vitro* [35,36].



**Hình 1.3.** Nuôi cấy mô và sản xuất cây con Kiwi

#### 1.2.2.2. Ứng dụng vi nhân giống một số đối tượng Kiwi

Phương pháp nhân giống đầu tiên cho *A. deliciosa* đã được đề xuất bởi Harada (1975). Các mô thực vật được sử dụng như là vật liệu ban đầu là các chồi mầm, các mô phân sinh, hạt, lá, cuống lá, thân và rễ [37], cây con *in vitro* [38]; bao phấn, phấn hoa [39], nội nhũ [40] (Hình 1.3). Ở *A. deliciosa*, mô phân sinh chồi đã được chứng minh là nguyên liệu khởi đầu thích hợp cho vi nhân giống, vì đột biến gen bị hạn chế và không có vi rút. Kỹ thuật nuôi cấy lỏng lác chồi mầm của *A. deliciosa* cho thấy hiệu quả sự gia tăng trọng lượng tươi và số lượng chồi được tạo ra nhiều hơn so với khi nuôi cấy trong môi trường thạch đông đặc [41]. Năm 1999, một giống cây *A. chinensis* tên là 'Hort16A', được phát triển ở New Zealand bởi Hort Research (nay là Trung tâm Nghiên cứu thực vật và thực phẩm), đã phát triển trên thị trường quốc tế, với trái được bán dưới tên trái Kiwi ZESPRI® GOLD, trái cây có màu vàng, vị ngọt và cây Kiwi này có tính cận nhiệt đới hơn Kiwi xanh. Sau đó, một loạt các giống cây trồng mới đã được thương mại hóa ở Trung Quốc và Nhật Bản, Ý... [42]. Các nghiên cứu vi nhân giống Kiwi vàng gần đây chủ yếu liên quan đến quá trình tăng sinh cụm chồi từ các chất điều hoà tăng trưởng BAP hoặc zeatin [38], chưa có nhiều nghiên cứu vi nhân giống trên đối tượng này, nhất là chưa có nghiên cứu nào sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong vi nhân giống cây Kiwi vàng.

**Bảng 1.2.** Ứng dụng vi nhân giống một số đối tượng Kiwi

Chi, loài, giống	Môi trường nuôi cấy, PGRs, các điều kiện khác	Nhận xét, kết quả, sự thích nghi và biến đổi	Tài liệu tham khảo
<i>A. deliciosa</i>	- MS + 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, 0,02 mg/L NAA và 0,5 mg/L TDZ - MS + kinetin. - MS + BA	- Chồi tái sinh cao nhất (13,33 chồi/mẫu) - Mẫu cấy chỉ tạo mô sẹo - Mẫu cấy tái sinh chồi ở nồng độ BA cao	[43]
<i>A. arguta</i>	MS, Standardi (St) và (B5) + BAP (0, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 2,5 mg/L) và GA3 (0; 0,1; 0,5 và 1,0 mg/L)	- Số lượng chồi cao nhất ở BAP > 0,6 mg/L - Tạo chồi dài: BAP 0-0,3 mg/L và GA3 (0,5-1 mg/L)	[44]
<i>A. deliciosa</i>	- MS bổ sung BA (9 µM) và sucrose (3%) - MS với sucrose (3%) và BA (3µM) - MS bổ sung BA (9µM)	- 50,5% lá nguyên hình thành 5 chồi. 41,7 và 41,6% các đoạn lá và các đoạn lá hình thành 7 chồi - 58,3% chồi phát thành cụm chồi - Tỷ lệ ra rễ từ chồi 50 và 56,25%	[15]
<i>A. deliciosa</i>	- Sucrose (3%, w/v), Polyvinylpyrrolidone (300 mg/L), benzyl adenine (BA) (6 µM) - Sucrose (3%), benzyl adenine (BA) (3 µM) - Bổ sung axit indole butyric (9 µM)	- 75% các mô phát sinh hình thái - Các mô phát sinh tạo chồi 56,3 % - Các chồi hình thành rễ, có 5-7 rễ/chồi	[45]
<i>A. chinensis</i> var. <i>chinensis</i> 'Zes006'	- Bổ sung 0,2% N <sup>6</sup> (3-hydroxybenzyl) adenine (meta –Topolin-m T) - Bổ sung 0,4% N <sup>6</sup> -benzylaminopurine	Số chồi, trọng lượng chồi, số lá và diện tích lá ở môi trường bổ sung mT cao hơn đáng kể so với BAP hoặc	[38]

Chi, loài, giống	Môi trường nuôi cấy, PGRs, các điều kiện khác	Nhận xét, kết quả, sự thích nghi và biến đổi	Tài liệu tham khảo
	(BAP) - Bổ sung 1,04% zeatin	zeatin. Khi được chuyển sang môi trường tạo rễ, cây con đã được nhân giống trong môi trường bổ sung mT dễ dàng tạo rễ, dễ thích nghi với nhà kính.	
<i>A. chinensis</i> 'Yangshi Jinhong 50'	- MS + 4,0 mg/L 6-BA + 0,1 mg/L NAA - MS + 3,0 mg/L 6-BA + 0,3 mg/L NAA - MS + 4,0 mg/L 6-BA + 0,4 mg/L NAA	Sự kết hợp các chất tăng trưởng thực vật tốt nhất trong việc tạo rễ nuôi cấy là 1/2 MS + 0,9 mg/L IBA, tạo cây con đạt tỷ lệ sống 96%	[46]
<i>A. chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> , <i>A. chinensis</i> var. <i>chinensis</i> và <i>A. arguta</i>	- Hạt được rửa sạch, làm khô và bảo quản ở 4°C; ngâm trong dung dịch 2 mg/L thuốc diệt nấm (Maxim XL 035) trong 1 phút	- Tỷ lệ nảy mầm và độ đồng đều phụ thuộc vào kiểu gen của trái Kiwi và thời kỳ phân tầng ẩm lạnh. - Tỷ lệ nảy mầm của hạt <i>A. chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> cao hơn <i>A. chinensis</i> var. <i>chinensis</i> Ảnh hưởng của phân tầng ẩm lạnh (3, 4 và 5 tuần ở 4°C) và thành phần chất nền đang phát triển (than bùn, đá trân châu và mụn dừa) đến sự nảy mầm của hạt và sự phát triển của cây con	[47]
<i>A. chinensis</i> var. <i>deliciosa</i>	Fe-EDDHA/CaCO <sub>3</sub> Môi trường Murashige and Skoog, FeSO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> EDTA 2,5 µM indole-3-butyric acid	Sự thiếu FeSO <sub>4</sub> trong môi trường làm giảm sự phát triển của cây con. Việc bổ sung Fe-EDDHA/CaCO <sub>3</sub> làm tăng số lượng chồi. Khả năng giải phóng sắt chậm của Fe-EDDHA /CaCO <sub>3</sub>	[48]

### 1.2.3. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào

#### 1.2.3.1. Giới thiệu chung

Sau gần 50 năm kể từ khi khái niệm lớp tế bào mỏng (TCL) được đề xuất [41], có hơn 77 loài thực vật hoặc cây lai khác nhau đã được vi nhân giống thành công bằng phương pháp TCL [49,50]. Các loài được nghiên cứu bao gồm 50% cây cảnh, 25% cây nông nghiệp hoặc rau, 8% cây thuốc, v.v. Khái niệm, thành công và tiềm năng của phương pháp TCL đã được thảo luận [49,50] và cho thấy nuôi cấy lát mỏng có nhiều ưu điểm. Việc lấy mẫu các cơ quan và mô thích hợp được thực hiện nhanh chóng sau khi khử nhiễm bề mặt. Điều này cho phép lựa chọn cơ quan nào phù hợp nhất để tái sinh. Độ dày tiết diện, vị trí và tuổi tối ưu của mẫu có thể được xác định bằng cách nuôi cấy mẫu dọc theo trục. Đối với các mặt cắt ngang mỏng (tTCL), các loại tế bào và mô chịu trách nhiệm tái sinh có thể được nghiên cứu bằng cách sử dụng các phương pháp mô học. Tác động của cực trục dọc, nếu có, đối với sự tái sinh có thể được khảo sát bằng cách sử dụng các đoạn mỏng cắt dọc (ITCL). Hơn nữa, các “tiềm năng vẫn chưa được khai thác của các lớp tế bào mỏng thực vật” vì “các phân tử đánh dấu/gen biệt hóa có thể dễ dàng khu trú tại chỗ trong tế bào đích/tế bào chịu trách nhiệm” [51]. Mặt khác, trong hệ thống TCL, các yếu tố nội sinh thường không lớn và quá trình vận chuyển ít phức tạp hơn so với khi sử dụng các mẫu cây lớn. Tế bào đích/tế bào đáp ứng thường tiếp xúc với các tế bào bị thương do cắt ra khỏi cơ quan thông qua những mảnh thành tế bào hoặc oligosaccharide, một dạng của oligogalacturonides [52].

Nuôi cấy lớp mỏng tế bào cũng được ứng dụng trong kỹ thuật di truyền, TCL sẽ giảm được sự có mặt của các tế bào không nhận gen chuyển bởi vì tất cả các tế bào nằm trên lớp mỏng đều được đưa gen vào và tiếp xúc với môi trường chứa các tác nhân kiểm soát. Chỉ có các tế bào chứa các gen chọn lọc trong hệ gen mới có thể tăng sinh trên môi trường chọn lọc, đặc biệt là những cơ quan chỉ có một lớp tế bào và vì vậy đã loại bỏ được sự tạo thành các cơ quan không mong muốn. TCL cũng đã thành công như một phương pháp hiệu quả để tăng cường sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp và dược phẩm thông qua nuôi cấy cơ quan chuyển gen, chẳng hạn như những thứ do vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* tạo ra [53].

Đối với chi *Actinidia*, nghiên cứu vi nhân giống sử dụng các vật liệu như hạt nảy mầm hoặc toàn bộ lá [19], nội nhũ [54], ngọn chồi [55], các đoạn thân [56], nhị

hoa màu mỡ hoặc vô sinh [57] cây con [38], v.v... Tuy nhiên, những nghiên cứu đó chủ yếu tập trung vào *A. deliciosa*, *A. Polygama* [58], v.v. Ngoài ra, trong nhân giống ống nghiệm của *Actinidia spp.* với số lượng lớn các loại cây phục vụ cho ngành công nghiệp đã được áp dụng ở nhiều nước như New Zealand, Ý, Pháp,... [59] Hơn nữa, có rất ít nghiên cứu về vi nhân giống của *A. chinensis* [17,38] đặc biệt là ứng dụng kỹ thuật TCL trên cây *A. chinensis* hiện nay chưa được nghiên cứu.

*1.2.3.2. Ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong vi nhân giống một số đối tượng cây trồng.*

Sự thành công của hệ thống TCL được chứng minh ở cả loài cây một lá mầm và cây hai lá mầm, bao gồm sự phát sinh mô sẹo, phôi, các cơ quan, sự ra hoa *in vitro* ở các loài trong cây cảnh, cây họ đậu và cây lấy gỗ, ngũ cốc và cỏ.

Hiện nay, đã có nhiều công bố nghiên cứu về nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong vi nhân giống ở nhiều loài thực vật khác nhau, chưa có công bố nghiên cứu nào về nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong vi nhân giống chi *Actinidia*.

**Bảng 1.3.** Một số thành tựu nghiên cứu sử dụng kỹ thuật TCL trong vi nhân giống

Chi, loài, giống	Môi trường nuôi cấy, PGRs, các điều kiện khác	Nhận xét, kết quả, sự thích nghi và biến đổi	Tài liệu tham khảo
<i>Nicotiana tabacum</i>	MS + Auxin và cytokinin	Sự hình thành mô sẹo, hình thành rễ, hình thành chồi sinh dưỡng và hình thành chồi hoa	[41]
<i>Bambusa spp.; Dendrocalamus spp.; Musa sp. Manihot esculenta Citrus spp.; Poncirus trifoliata; Cocos nucifera...</i>	Hệ thống nuôi cấy lớp mỏng tế bào: Tái sinh và ứng dụng chuyển đổi	Một số nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật TCL trên một đối tượng thực vật.	[11]
<i>Begonia tuberosus</i>	TCL từ cuống lá, thân cây, hoa dày 0,2–1,0 mm. MS + BA NAA và TDZ	Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cây TCL	[52]
<i>Begonia tuberosus</i>	AgNPs khử trùng cho cuống lá, cuống hoa và thân. Cảm ứng hình thành phôi soma trong mẫu cây TCL	AgNPs loại bỏ 4 loài nấm ( <i>Fusarium sp.</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>Trichoderma sp.</i> và <i>Penicillium sp.</i> ), 1 loài vi khuẩn ( <i>Pseudomonas sp.</i> ) Hiệu quả hình thành phôi soma từ cuống lá, cuống hoa và thân cây TCL đạt 40,00%	[60]
Blackberry	tTCL thân, MS + BA + KIN	Phát sinh phôi soma từ mẫu cây TCL cắt ngang thân	[61]
<i>Hedychium coronarium</i>	TCL từ gốc của cây con	Tạo cây tứ bội; chiều cao cây, số lượng thân rễ, kích thước khí khổng của cây tứ bội đều cao và lớn hơn của cây lưỡng bội	[62]

Chi, loài, giống	Môi trường nuôi cấy, PGRs, các điều kiện khác	Nhận xét, kết quả, sự thích nghi và biến đổi	Tài liệu tham khảo
<i>Cattleya forbesii</i> Lindl.	tTCL-PLB dày 0,5–1,5 mm	Ứng dụng kỹ thuật TCL tái sinh phôi PLB để nhân giống số lượng lớn cây giống	[63]
<i>Ficus carica</i> L. 'Sabz' và 'Torsh'	TCL đoạn thân (10 mm) cắt ngang (0,5–0,8 mm)	Tái sinh chồi tối đa (45%). Phép đo dòng chảy tế bào và phân tích chỉ thị phân tử ISSR: sự ổn định đơn bội và đặc điểm di truyền của cây tái sinh	[64]
<i>Ceropegia bulbosa</i> Roxb.	Các tTCL được khử trùng bề mặt (dày 1-4 mm) từ các đoạn chồi của cây <i>ex vitro</i> . MS + 4,5 $\mu$ M 2,4-D + 2,2 $\mu$ M BA (CIM). MS + 8,8 $\mu$ M BA + 0,27 $\mu$ M NAA (SIM); 1/2MS (RIM) không có PGR; pH 5,6; 3% đường; 0,8% thạch	95% tTCL hình thành mô sẹo trong CIM. 22,2 chồi/ tTCL trên SIM. 89% cây con sống ngoài vườn ươm. Không có sự khác biệt giữa các cây con có nguồn gốc từ tTCL được ISSR đánh giá	[65]
<i>Cymbidium</i> Twilight Moon 'Day Light'	tTCL (dày 1-2 mm) từ PLBs; TC + 1/2 mg/L 2,4-D hoặc 1 mg/L TDZ (CIM). TC + 1 mg/L AdS hoặc 1/2/4 mg/L BA hoặc 1/2 mg/L Kin hoặc 1 mg/L ZR hoặc 1 mg/L 2iP (PIM); 2 mg/L tryptone; pH 5,3; 2% đường; 0,8% thạch Bacto	26 PGR đã được thử nghiệm. Ánh sáng tốt hơn bóng tối cho sự hình thành PLB. Các biện pháp kiểm soát hình thành 8,3 PLB/tTCL mới nhưng tất cả PIM cho kết quả tối đa 1,1 PLB/tTCL mới	[66]



### **1.2.4. Phát sinh phôi soma**

#### *1.2.4.1. Giới thiệu chung*

Trong quá trình nhân giống *in vitro*, có một số tế bào có hiện tượng tạo phôi, mẫu cấy có thể trải qua quá trình phản biệt hóa hoặc phân hóa để bước vào một quy trình sinh học mới tạo ra phôi soma. Phát sinh phôi soma là một quá trình trong đó các cấu trúc giống như phôi được hình thành từ các mô soma và phát triển thành một cây hoàn chỉnh [67]. Sự phát sinh phôi soma xảy ra thông qua một số giai đoạn tương tự như phôi hữu tính. Phôi vô tính có thể biệt hóa trực tiếp từ mẫu cấy hoặc gián tiếp thông qua giai đoạn tạo mô sẹo [68]. Đến nay, hơn 200 loài thực vật đã được nhân giống thành công bằng công nghệ phôi soma. Phôi soma có thể bảo quản được lâu và nảy mầm vào thời vụ thích hợp. Công nghệ tạo phôi soma vẫn là một công nghệ tiên tiến trong lĩnh vực nhân giống cây trồng trên toàn thế giới [69].

Khả năng hình thành phôi soma được biểu hiện chủ yếu ở cấp độ kiểu gen. Mặc dù các điều kiện tạo phôi đã được thiết lập cho nhiều loài thực vật, nhưng vẫn còn một số lượng lớn các loài chưa thể hình thành phôi soma [70]. Ngay trong cùng một loài, có kiểu gen dễ phát sinh phôi, nhưng cũng có kiểu gen ngăn cản quá trình phát sinh phôi. Tuy nhiên, cần nhấn mạnh rằng trong nhiều trường hợp, sự ức chế hình thành phôi có thể được giải quyết bằng cách tối ưu hóa các điều kiện sinh trưởng của cây hoặc bằng cách chọn mẫu cấy thích hợp. Khả năng hình thành phôi soma trong tế bào soma chỉ được thể hiện khi các tế bào này được đặt trong môi trường nuôi cấy *in vitro* và được xác định thông qua chu trình tăng trưởng thực vật cũng như các dấu hiệu môi trường.

Tế bào phôi được đặc trưng bởi một nhân nằm ở trung tâm, với các vi ống nổi bật gần nhân và các sợi actin [71]. Bên cạnh đó, chúng còn có cấu trúc thành tế bào đặc biệt với tế bào vừa có nguồn gốc từ mô phân sinh (hay mô phát sinh phôi) vừa có thể sinh ra từ tế bào có không bào lớn trong những điều kiện thích hợp nhất định; chẳng hạn như sau khi xử lý bằng 2,4-D. Nhiều hệ thống nuôi cấy mô đã sử dụng 2,4-D làm chất cảm ứng hiệu quả cho SE. Tuy nhiên, phải mất 2-3 tuần sau khi cảm ứng trước khi có thể quan sát thấy những phôi đầu tiên trên bề mặt mô sẹo. Những nghiên cứu này đã chỉ ra rằng 2,4-D rất cần thiết để bắt đầu chương trình hình thành phôi. Việc cấy chuyển sang môi trường không chứa 2,4-D có vai trò quan trọng trong việc thiết lập tính phân cực của tế bào, đây được coi là một trong

những sự kiện đầu tiên của sự phát triển phôi [72].

Tái sinh thông qua hình thành phôi soma trong công nghệ sinh học hiện đại có thể được sử dụng không chỉ để nhân giống cây trồng, mà còn để ổn định thực vật di truyền bởi vì thực vật có nguồn gốc từ tế bào soma [73].

Từ năm 1992, Oliveira và cộng sự [74] đã nghiên cứu trên chồi nách của *Actinidia deliciosa* var. *cv deliciosa* (Hayward) được đưa vào nhiệt độ lạnh ở 4°C và không cung cấp dinh dưỡng trong 1,5 tháng. Các lá phát triển ở điều kiện này có khả năng tạo phôi. Sau đó những chiếc lá này, được nuôi trong bóng tối trong 1,5 tháng trên môi trường có chứa zeatin như một chất điều hòa sinh trưởng duy nhất, tạo ra các cấu trúc nhỏ gọn mà từ đó phôi phát triển. Sự phân chia của lá ảnh hưởng mạnh đến sự biểu hiện của tiềm năng tạo phôi. Một phần chọn lọc của các tế bào trần được phân lập từ những lá này có thể phát triển theo cách tạo phôi.

Mặc dù sự đa dạng di truyền của *Actinidia* cung cấp tiềm năng to lớn cho việc cải thiện giống cây trồng, nhưng có những đặc điểm (bao gồm đặc tính mạnh về dây leo, bản chất đơn bội và cấu trúc đa bội hoá dạng lưới) khiến *Actinidia* hạn chế trong việc nhân giống so với nhiều loại cây trồng khác. Nuôi cấy mô thực vật, thao tác *in vitro* của tế bào, mô và cơ quan thực vật, là một kỹ thuật quan trọng của công nghệ sinh học thực vật và một số kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật đã được sử dụng để khắc phục một số hạn chế mà *Actinidia* gây ra đối với nhân giống cổ điển [75]. Do đó, việc nghiên cứu sự phát sinh hình thái lên vi nhân giống *Actinidia* góp phần tìm hiểu về sự phát sinh phôi của cây *A. chinensis* nhằm cung cấp nguồn vật liệu cho quá trình nhân giống cây *A. chinensis* đáp ứng một phần cho quá trình thương mại của *A. chinensis* ở Việt Nam.

#### 1.2.4.2. Ứng dụng phát sinh phôi soma trong vi nhân giống một số đối tượng cây trồng

Quá trình phát sinh phôi soma đóng một vai trò quan trọng trong việc nhân giống hàng loạt trong ống nghiệm, bảo tồn nguồn mầm và cải thiện di truyền của cây thân gỗ [76]. Mặc dù quá trình tạo phôi soma đã được sử dụng rộng rãi ở một số loài thân gỗ, tuy nhiên việc nhân giống cây thân gỗ trưởng thành vẫn còn khó khăn [77].

**Bảng 1.4.** Ứng dụng nghiên cứu phát sinh soma

<b>Chi, loài, giống</b>	<b>Môi trường nuôi cấy, PGRs, các điều kiện khác</b>	<b>Nhận xét, kết quả, sự thích nghi và biến đổi</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
<i>A. kolomikta</i>	- Hạt, lá, cuống lá, thân và rễ chưa trưởng thành, MS + 2,4-D và KIN	Phân tích tế bào dòng chảy: cây con thu được là lưỡng bội, dường như có nguồn gốc phôi	[37]
<i>Sapindus trifoliatus</i>	MS chứa 5,0 mg/L 2, 4-D và 0,1 mg/L KIN MS + l-glutamine	MS chứa 200 mg/L l-glutamine tạo ra số lượng tối đa phôi soma giai đoạn hình cầu, tim và lá mầm	[78]
<i>Vaccinium corymbosum L.</i> × <i>V. angustifolium Ait</i>	MS + TDZ (0; 2,3; 4,5; 6,9) hoặc 9 µM.	TDZ (9 µM) cho kết quả sự hình thành phôi soma hiệu quả nhất	[79]
<i>Album Santalum (L.) bạch đàn</i>	MS + 2,4-D và NAA, BAP và KIN, 30 g/L sucrose và 7,5 g/L agar, pH = 5,8	MS + 2,0 mg/L; 2,4-D + 0,5 mg/L BA và 30 g/L sucrose thích hợp sinh trưởng phôi	[80]
<i>Cyathea delgadii Sternb</i> <i>duong xi thân gỗ</i>	MS + 1% (w/v) sucrose: mẫu cấy đơn bào, đa bào	Maltose, 1-kestose, ABA, GA3, axit phenolic hình thành phôi soma đơn bào. Tinh bột, callose, kinetin riboside, arginine và ethylene thúc đẩy hình thành phôi soma đa bào	[81]
<i>A. deliciosa</i> var. <i>Cv deliciosa</i> .	Môi trường tối 1,5 tháng có bổ sung 2mg/L zeatin.	Toàn bộ lá đã phát triển thành phôi từ các gân lá nằm dưới bề mặt nuôi cấy	[74]
<i>Litchi chinensis Sonn.</i>	- Môi trường Murashige và Skoog (MS) bổ sung 1,0 mg/L 2,4 axit dichlorophenoxyacetic (2,4-D) và	MS bổ sung 45 g/L sucrose có hiệu quả trên kích thước của phôi soma trưởng thành (8,00 > 0,5 cm SE và 6,33 < 0,5 cm SE) so với môi trường B5 (4,33 >	[82]

Chi, loài, giống	Môi trường nuôi cấy, PGRs, các điều kiện khác	Nhận xét, kết quả, sự thích nghi và biến đổi	Tài liệu tham khảo
	<p>0,5 mg/L 6-benzylaminopurine (BA).</p> <p>- Hai loại muối môi trường (MS và Gamborg's B5) với các nồng độ đường sucrose khác nhau</p>	<p>0,5 cm SE và 4,66 &lt; 0,5 cm SE) trên cùng nồng độ sucrose. Sự phát triển của phôi soma xảy ra trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng, phôi soma giai đoạn tim</p>	
<i>Cnidium officinale</i> Makino	<p>- MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs) như 2,4-D và BA</p> <p>- MS chứa 1,5 mg/L 2,4-D và 0,5 mg/L BA</p>	<p>Các mô sẹo sinh phôi, màu trắng mờ được quan sát ở giai đoạn tim và lá mầm dưới kính hiển vi soi nổi. Các phôi soma riêng lẻ được chuyển sang môi trường MS không có PGRs (MS0) và 100% chồi nảy mầm</p>	[83]
<i>Pulsatilla tongkangensis</i> Y.N. Lee & T.C. Lee	<p>MS có bổ sung zeatin (Zn) và IAA</p>	<p>Mẫu cây sau 6 - 7 tuần nuôi cấy, nhiều chồi phát triển từ các chồi nách. Tuy nhiên, phân tích hình thái mô học của các cấu trúc hình cầu màu xanh lục nhạt, hình trái tim giống như phôi soma cho thấy rằng chúng là những cơ quan phát sinh phôi, với các nhu mô không bào được bao quanh bởi một lớp tế bào biểu sinh và các quản bào, nhưng không có cực rễ. Các mô sẹo màu trắng sữa cũng phát triển xung quanh chồi nách sau 4 - 6 tuần. Các giai đoạn hình cầu, hình tim và hình ngư lôi có trong mô sẹo đã cho thấy sự phát triển của phôi soma trong cấu trúc màu trắng sữa, các tế bào nhỏ với nhiều tế bào chất, rất ít mô mạch trong các phôi đang phát triển, và không có kết nối mạch dẫn với mô sẹo xung quanh.</p>	[84]

### 1.3. Đánh giá đa dạng di truyền và xác định giới tính thực vật

#### 1.3.1. Giới thiệu chung

Có nhiều phương pháp nghiên cứu khác nhau trong phân loại và xác định loài ở thực vật và hầu hết các phương pháp này đều dựa trên nguyên tắc như những loài có chung nguồn gốc. Sự giống nhau có thể dựa trên đặc điểm hình thái học của các loài thực vật qua nhận biết hình thái lá, hoa, quả, cách thức phân cành... có ưu điểm dễ quan sát trực tiếp bằng trực quan nhưng chỉ dựa vào thống kê phân tích một hoặc nhiều tính trạng được thể hiện ra bên ngoài nên hiệu quả thấp. Điều này thật sự gặp nhiều khó khăn khi các mẫu vật cần giám định không còn nguyên vẹn, mất hình thái bên ngoài. Do vậy, việc định danh dựa trên quan sát hình thái và kinh nghiệm dân gian sẽ được hỗ trợ chính xác hơn nếu sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại [85].

Các phương pháp phân loại học phân tử và xác định loài là hướng nghiên cứu được phát triển mạnh trên thế giới hiện nay, được xây dựng dựa trên việc nhận biết thành phần và cấu trúc của các gen đặc hữu của các taxon sinh vật. Hiện nay, các kỹ thuật dựa trên phân tích DNA là phương pháp có hiệu quả cao trong việc định danh và giám định loài. Năm 2003, Paul Hebert, nhà nghiên cứu tại Đại học Guelph ở Ontario, Canada, đề nghị "DNA barcode" như một cách để xác định loài. So với chỉ thị hình thái và chỉ thị hoá học, chỉ thị DNA cho độ chính xác cao hơn mà không lệ thuộc vào bất cứ yếu tố khách quan nào [86].

Hai vùng gen phổ biến được dùng trong nghiên cứu DNA barcode là *rbcL* ở lục lạp và *COI* ở ty thể. Đoạn DNA *rbcL* nằm trên hệ gen lục lạp, là một phần của gen mã hóa cho rubisco tiểu đơn vị lớn. Enzyme Rubisco xúc tác bước đầu tiên cho carbon cố định. Ngoài ra, *matK* là một trong những ứng cử viên hứa hẹn nhất cho mã vạch thực vật. Gen *matK* có chiều dài khoảng 1570 bp và mã hóa cho một protein maturase. Vùng mã hóa của *matK* thường nằm trong một intron của gen *trnK* của lục lạp, tốc độ tiến hóa rất cao của *matK* đã làm cho nó có thể được sử dụng trong việc phân loại phát sinh loài ở cấp độ phân loài cao như Thứ tự hoặc Họ, và đôi khi cũng ở các cấp độ phân loài thấp như Chi hoặc Loài [87]. Năm 2009, Hiệp hội Mã vạch Sự sống đã phê duyệt các lục thể gồm *matK* và *rbcL* là vùng mã vạch để sử dụng cho các loài thực vật trên cạn [88]. Gần đây, ITS cũng đã được khuyến nghị đưa vào mã vạch cốt lõi cho cây giống [89,90]. Bộ đệm phiên mã bên trong (ITS) của hạt nhân 18S -

5,8S - 26S của ribosome là vùng mục tiêu phổ biến nhất trong bộ gen nhân, mặt khác kích thước vừa phải của ITS (dưới 700bp) thường cho phép khuếch đại và giải trình tự mà không cần mồi bên trong. [91]. Ngoài ra, rất ít trong số các locus này đủ để xác định hoặc phân biệt giữa các loài thực vật khi sử dụng một mình, dẫn đến việc đề xuất sử dụng kết hợp một số locus để tăng khả năng xác định hoặc phân biệt giữa các loài thực vật. Khó khăn trong việc chọn các gen cụ thể để làm mã vạch thực vật là do sự không hoàn hảo của bất kỳ gen nào từ hệ gen lục lạp, ty thể hoặc hạt nhân. Các gen ty thể thực vật tiến hóa chậm và do đó không hiệu quả để phân biệt giữa các loài thực vật khác nhau. CBOL (2009) đã đề xuất *matK* + *rbcL* kết hợp để sử dụng làm mã vạch. Nhân thường xuất hiện ở nhiều bản sao và có tính bảo tồn không cao, làm cho việc thiết kế các đoạn gen gặp nhiều khó khăn [92].

Ismail và cộng sự (2020), đã nghiên cứu thành công khi chọn hai DNA marker gốc lục lạp (*rbcL* và *matK*) để xác định loài *A. albida*, *A. ampliceps*, *A. catechu*, *A. coriacea* và *A. tortilis*. Phát hiện này nhấn mạnh tiềm năng của mã vạch DNA để xác định hiệu quả và có thể nhân giống các loài [93].

Theo phương pháp dựa trên DNA barcode, các trình tự của các đoạn DNA barcode được sử dụng để tìm kiếm và so sánh trên một cơ sở dữ liệu trình tự DNA (ví dụ như trên NCBI). Dựa trên kết quả so sánh với các trình tự sẵn có trên cơ sở dữ liệu, việc nhận dạng một loài nhanh chóng được xác định và giúp dự đoán được nguồn gốc của các loài lai tạo.

Ở thực vật, giới tính được xác định ở cấp độ mô-đun, mô hoặc tế bào [94]. Các loài đơn bội có nhiễm sắc thể giới tính đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp, đặc biệt là đối với sự di truyền giới tính.

Hầu hết các loài trong họ *Actinidia* (Actinidiaceae) là đơn bội. Cây đực rất cần thiết cho quá trình thụ phấn và tạo quả trên cây cái. Thông thường, một cây đực được trồng xen với 6 đến 10 cây cái để tăng năng suất tạo quả [95]. Giới tính ở *Actinidia* được kiểm soát về mặt di truyền, với giới tính đực là XY và giới tính cái là XX. Các cá thể mang ít nhất một bản sao của nhiễm sắc thể Y là cây đực, không phụ thuộc vào mức độ dị bội, cho thấy rằng locus xác định giới tính bao gồm một yếu tố quyết định giới tính đực. Các phân tích tế bào học trước đây và lập bản đồ di truyền xung quanh vùng xác định giới tính cho thấy rằng các nhiễm sắc thể giới tính ở trạng thái ban đầu

và tương đồng, với một vùng xác định giới tính nhỏ về mặt vật lý. Bản thảo trình tự hệ gen của trái Kiwi gần đây đã được tạo ra từ một giống cây cái [96], nhưng trình tự cụ thể Y và bối cảnh hệ gen xung quanh các yếu tố quyết định giới tính tiềm năng vẫn chưa được biết đến nhiều [2,97]. Năm 2014, Atak đã xác định SmY là đoạn môi nhiều thông tin nhất để xác định giới tính của cây con ở *A. chinensis* trong quần thể sinh sản.

### ***1.3.2. Ứng dụng sinh học phân tử và phương pháp xác định giới tính ở một số đối tượng cây trồng***

**Bảng 1.5.** Một số thành tựu nghiên cứu sinh học phân tử

<b>Chi, loài, giống</b>	<b>Phương pháp</b>	<b>Kết quả</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
<i>Thực vật trong hệ thực vật ôn đới</i>	Sử dụng mã vạch DNA <i>rbcL</i> + <i>matK</i>	Phân biệt 436 loài trong 269 chi thực vật trên cạn.	[98]
<i>A. chinensis</i> <i>A. deliciosa</i>	Sử dụng các điểm đánh dấu: <i>RAPD</i> , <i>SSR</i> , <i>SCAR</i> và môi: <i>OPM 12</i> ; <i>SMY f</i> ; <i>SMY r</i> ; <i>SMX f</i> ; <i>SMX r</i> ; <i>SMY1 f</i> ; <i>SMY1 r</i> ...	SMY1 giúp xác định giới tính đực	[99]
<i>Physalis L.</i>	<i>psbA</i> - <i>trnH</i> của lục lạp, MEGA V6.0	<i>psbA</i> - <i>trnH</i> - DNA barcode hiệu quả để xác định mối quan hệ giữa các loài <i>Physalis</i> và các loài có quan hệ họ hàng gần	[100]
<i>A. chinensis</i>	DNA barcode khuếch đại vùng lục lạp <i>psbA-trnH</i> , <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>ycf1b</i> , <i>trnL</i> và <i>rpl32_trnL</i> , vùng hạt nhân <i>At103</i> và vùng giữa gen <i>ITS2</i>	Chỉ thị phân tử <i>matK</i> , <i>ITS2</i> và <i>rpl32_trnL</i> (UAG) xác định được các giống CuiYu, JinYan, HuaYou, XuXiang, HuangJinGuo, ChuanHuangJin, YaTe và HongYang	[101]
<i>Carica papaya L.</i>	Cá thể đực (XY) và cái (XX) được giải trình tự và so sánh trên NCBI với 2 NST giới tính đực, <i>MSY</i> và <i>Yh</i> lưỡng tính	NST <i>Yh</i> thể hiện sự đa dạng nucleotide thấp hơn <i>Y</i> , <i>Yh</i> có khả năng là sản phẩm của quá trình thuần hóa của con người, không xuất hiện ở cây hoang dại.	[102]
<i>A. chinensis</i> var <i>deliciosa</i> .	- Sử dụng kỹ thuật <i>RAPD</i> - Các cặp môi PCR: <i>SMYf1</i> và <i>SMYr1</i> ( <i>SmY</i> ); <i>SMXf</i> và <i>SMXr</i> ; <i>SyGl-F</i> và <i>SyGl-R</i>	Chỉ thị <i>SmY</i> , <i>SyGl</i> đều phù hợp để xác định giới tính. <i>SMYf1</i> và <i>SMYr1</i> , <i>SyGl</i> : cũng có mặt trong tất cả các mẫu đực nhưng không có trong các mẫu cái	[42]
<i>Actinidia</i>	- Chiết xuất DNA bằng phương pháp <i>CTAB</i> .	- <i>ITS</i> có tỷ lệ giải trình tự là 72% và tỷ lệ phân biệt các loài là 60,7%	[90]



Chi, loài, giống	Phương pháp	Kết quả	Tài liệu tham khảo
	- Sử dụng phương pháp khuếch đại DNA của các vùng (ITS), <i>rbcL</i> , <i>matK</i> và <i>trnH-psbA</i> .	- Tỷ lệ giải trình tự thành công cho <i>matK</i> + <i>rbcL</i> là 97,4% và 48,3% số loài được phân biệt - Mã vạch <i>trnH-psbA</i> chỉ có thể xác định <i>Actinidia eriantha</i>	
<i>Actinidia chinensis</i> var. <i>cv chinensis</i> . Hongyang	- Tách chiết ARN và tổng hợp cDNA - Sự sắp xếp nhiều trình tự và phân tích phát sinh loài của các gen bZIP của trái Kiwi - Phân tích cấu trúc exon-intron, phân bố gen bZIP của trái Kiwi	- 80 gen AcbZIP đã được xác định trong hệ gen, phân tích được chức năng của các gen này và cung cấp thông tin quan trọng về cơ sở phân tử của sự phát triển và khả năng chống chịu stress ở Kiwi - Các phân đoạn trùng lặp đã góp phần vào việc mở rộng họ AcbZIP của Kiwi, en AcbZIP có chung nguồn gốc tổ tiên	[103]
<i>Diospyros kaki</i> <i>Thunb.</i>	Sử dụng đánh dấu locus OGI và đánh dấu DISx-AF4S phân tích biểu hiện giới tính của hoa cho 1.186 đối tượng	Điểm đánh dấu DISx-AF4S cho kết quả 889 mẫu vật sống từ các tổ hợp chéo khác nhau, 636 cá thể đã được chọn. Kết quả phân tích chỉ thị và biểu hiện giới tính hoa nhận thấy sự khác biệt ở 247 cá thể	[104]
<i>Actinidia arguta</i> và <i>A. kolomikta</i>	- Tách chiết DNA bằng phương pháp CTAB và xác định liên kết giới tính bằng phân tích giải trình tự theo trình tự (GBS) và PCR dựa trên gel và điểm đánh dấu	Mã đánh dấu 161 bp cho <i>A. kolomikta</i> được thiết kế với đoạn môi dành riêng cho alen đực dựa trên indel 3 bp trong đoạn GBS 270 bp. Cả hai dấu hiệu đã được xác nhận trong các quần thể độc lập và hiện đang được sử dụng cho các xét nghiệm sàng lọc giới tính hiệu quả cao của các quần thể cây con	[105]

**CHƯƠNG 2**

**VẬT LIỆU, NỘI DUNG  
VÀ PHƯƠNG PHÁP  
NGHIÊN CỨU**

## 2.1. Vật liệu nghiên cứu

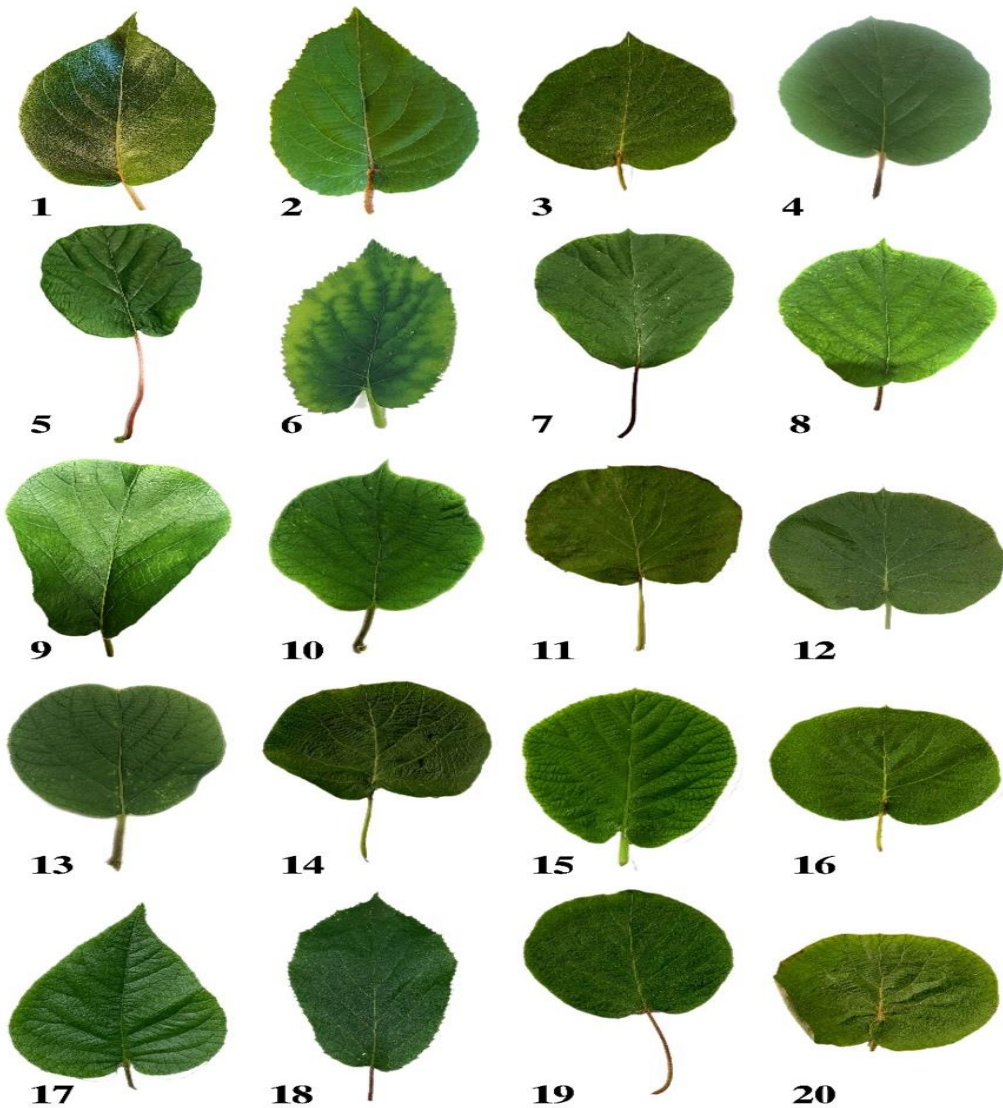
### 2.1.1. Vật liệu thực vật

Mẫu lá của 20 cây 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) để đánh giá mối quan hệ di truyền và nhận diện loài (Hình 2.1; Phụ lục 1) bao gồm:

+ 01 mẫu tự nhiên thu được ở xã Đăk 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 Khương, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội.



**Hình 2.1.** Hình thái lá của 20 mẫu Kiwi

### 2.1.2. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất

#### 2.1.2.1. Thiết bị và dụng cụ

Máy ly tâm nhiệt độ thường (Eppendorf Centrifuge), máy ly tâm làm lạnh (Eppendorf Centrifuge), máy vortex (Cleaver-Scientific-Anh), cân điện tử (Denver Instrument), lò vi sóng (Electrolux), nanoDrop One<sup>C</sup> (Thermo Scientific<sup>TM</sup>), máy điện di (Mupid-exu takara), bồn ủ nhiệt (Stuart, SBH200D), máy chụp gel (GelDoc-It®2315 imager UVP-Mỹ), máy PCR (Eppendorf), máy ủ heat block techne (Dri-block DB-2D), máy đo quang phổ, tủ ủ 37°C, tủ âm -80°C, -20°C, cân phân tích (Satorius, Max 220.000mg), máy cất nước 2 lần (Jencons), máy đo pH (WTW), nồi hấp vô trùng (Human Lab®), kính hiển vi soi nổi [106], kính hiển vi quang học (Optika –B192 – Ý).

Các loại cốc thủy tinh, Micropipet (200-1000µl, 20-200µl, 2-20µl), đầu típ (10µl, 200µl, 1000µl), găng tay, khẩu trang, dây thun, nylon, giá đỡ Eppendorf, còi chày bằng sứ, Eppendorf (0,5mL; 1,5mL; 2mL). Dao cắt, đĩa cắt, panh cắt, kéo, bình nuôi cấy 350 ml và 500ml. Ống nhỏ giọt, đèn cồn, lam kính, lamel, dao lam, kẹp nhọn và kim mũi giáo, bộ dụng cụ nhuộm mẫu. Dụng cụ được khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong 20 phút.

#### 2.1.2.2. Hóa chất

*Hoá chất xác định đa dạng di truyền và xác định giới tính cây Kiwi:* Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Merck KgaA, Đức); Tris (Merck KgaA, Đức); Chloroform (Merck KgaA, Đức); Isoamyl alcohol (Merck KgaA, Đức); Natri Clorua (Merck KgaA, Đức); Ethanol tuyệt đối (Merck KgaA, Đức); β-mercaptoethanol (Merck KgaA, Đức); Acid acetic (Merck KgaA, Đức); Agarose (Thermo Scientific<sup>TM</sup>); EDTA (pH 8) (Merck KgaA, Đức); Thang DNA ladder (Generuler) 100bp (Thermos Scientific<sup>TM</sup>); Ethidium bromide (Thermos Scientific<sup>TM</sup>); DNA loading Dye (Thermo Scientific<sup>TM</sup>); RNAase (Thermo Scientific<sup>TM</sup>); DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (#K1082); Nitơ lỏng; Nước cất hai lần hấp khử trùng.

*Hoá chất nuôi cấy in vitro:* Môi trường MS (Murasin Skoog) bao gồm các khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin (Merck Đức). Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (NAA, BA và TDZ) (Duchefa Hà Lan). Nguồn carbohydrate (sucrose) (Công ty đường Biên Hòa Việt Nam), agar (Công ty TNHH Nam Hạ Long Việt Nam).

*Hóa chất trong giải phẫu:* Javel (Việt Nam), acid acetic (Trung Quốc) và phẩm nhuộm hai màu đỏ carmin - xanh iod (Merck Đức), glycerin (Việt Nam).

*Hoá chất khử trùng:* Dung dịch nano bạc (AgNPs) với các hạt có kích thước trung bình  $\leq 20$  nm được thiết lập theo tỷ lệ:  $\text{AgNO}_3 = 700 - 1000$  ppm;  $\beta$ -chitosan = 250 - 300 ppm;  $\text{NaBH}_4 = 200$  ppm; Tỷ lệ mol  $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3 = 1/4$ ; Tốc độ nhỏ giọt  $\text{NaBH}_4 = 10 - 12$  giọt/phút [107].

Dung dịch nano bạc được cung cấp bởi Viện Công nghệ Môi trường (VAST).

## **2.2. Nội dung nghiên cứu**

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

- + Thu thập các cây Kiwi tự nhiên ở Việt Nam và thương mại.
- + Tách chiết và giải trình tự DNA của các mẫu.
- + Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn.
- + Xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự DNA các vùng *rbcL*, *matK*, ITS.
- + Xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử với cặp primer SmY1\_F và SmY1\_R.

### **2.2.2. Ứng dụng vi nhân giống cây Kiwi phục vụ công tác nhân giống**

- Tạo nguồn mẫu *in vitro*: Khử trùng bề mặt mẫu cấy và tái sinh chồi; Tăng sinh cụm chồi.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của kiểu cắt và kích thước mẫu đến quá trình phát sinh phôi soma thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào của gân lá chính và cuống lá.
- Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng thực vật đơn lẻ lên khả năng tái sinh chồi của phôi soma Kiwi.
- Ảnh hưởng của NAA lên khả năng ra rễ và thích nghi của cây con trong ống nghiệm.
- Ảnh hưởng của giá thể lên sự sinh trưởng cây Kiwi trong nhà kính.

## **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

### 2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

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

\* Cặp môi khuếch đại DNA

**Bảng 2.1.** Các cặp primer khuếch đại vùng *rbcL*, *matK*, ITS

Tên primer	Trình tự 5' – 3'	Chiều dài sản phẩm (bp)	Nguồn
<i>rbcL</i> 1-F <i>rbcL</i> 724-R	ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC	700-800	[108]
<i>matK</i> -KIM3-F <i>matK</i> -KIM1-R	CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC	900 - 950	[109]
ITS1-5F ITS4-R	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	750 - 800	[110]

Thiết kế dựa trên các trình tự gen *rbcL*, *matK* và ITS của một số loài được công bố trên ngân hàng gen NCBI, kiểm tra vùng trình tự bằng công cụ BLAST.

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 [111]. Các mẫu Kiwi thu thập ngoài tự nhiên và cây thương mại được giải trình tự thông qua việc sử dụng DNA tổng số của các mẫu cây để nghiền 50 mg mẫu lá trong 500 µl CTAB 2% + PVP 2% ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp mẫu/CTAB được ủ ở 65°C trong 60 phút, ly tâm hỗn hợp mẫu/CTAB ở 14.000 rpm trong 10 phút. Chuyển dịch nổi sang ống mới, bổ sung 4 µl RNAase, ủ ở 37°C trong thời gian 5 phút, bổ sung 500 µl hỗn hợp chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1), lắc đều, ly tâm ở tốc độ 14.000 rpm trong 10 phút. Thu dịch nổi (chứa DNA) sang ống mới (khoảng 450 – 500 µl), bổ sung ethanol tuyệt đối (tỷ lệ 1 : 1 so với thể tích thu được) và ½ thể tích NaCl 5M so với thể tích thu được. Hỗn hợp được ủ trên đá trong 1 giờ, ly tâm 13.000 rpm trong 10 phút. Hỗn hợp sau ly tâm được loại bỏ dịch nổi và thu tủa, bổ sung 500 µl ethanol 70% lạnh và đảo ống, ly tâm 13.000 rpm trong 5 phút (lặp lại 2 lần), loại bỏ dịch nổi, thu tủa. Để khô kết tủa ở nhiệt độ phòng. Hòa DNA trong 200 µl nước khử trùng hai lần.

\* *Phương pháp PCR*

Các phản ứng 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') [108], *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') [109], ITS1-5F (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3') và ITS4-R (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') [110]. Thành phần cơ bản cho 1 phản ứng PCR 20 µl: 0,2 mM dNTP mix, enzyme DreamTaq polymerase 1U, dream taq buffer 10X, 0,4 µM primer xuôi, 0,4 µM primer ngược, nước cất 2 lần khử trùng, 1 µl mẫu với nồng độ DNA từ 100 – 500 ng/µl. Chu kỳ PCR tiền biến tính 95°C trong 1 phút; 30 chu kỳ (biến tính ở 95°C trong 30 giây; bắt cặp (Ta: *rbcL* (53°C), *matK* (49°C), ITS (54°C)) trong 30 giây; 72°C trong 40 giây); chu kỳ hoàn thành 72°C trong 10 phút. Kết quả PCR được phân tích đánh giá trên gel agarose 1,2%, hiệu điện thế 100V, thời gian 30-45 phút, nhuộm với ethidium bromide và chụp hình trên máy chụp gel (GelDoc-It@2315 imager UVP-Mỹ). Mã vạch DNA thực vật dành cho DNA lập thể chủ yếu bao gồm maturase K (*matK*) và ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) [112]. Một số gen như *rpoB*, *rpoC1* và *rbcL* có tốc độ tiến hóa nhanh, đã được đề xuất làm vùng mã vạch [113]. Tương tự như vậy, các bộ đệm giữa các gen như *trnH-psbA*, *atpF-atpH* và *psbK-psbI* đã được sử dụng làm vùng mã vạch [114] và sử dụng kết hợp hai locus của *rbcL* và *matK* làm vùng lõi mã vạch, do tỷ lệ thu hồi *rbcL* cao và độ phân giải của *matK*. Đối với một trình tự cặp mỗi đơn, *matK* rất khó sử dụng [115], trong khi đó, mặc dù độ phân giải hạn chế của nó, *rbcL* của *matK* được xem xét về khả năng khuếch đại, giải trình tự và liên kết từ đó tạo bộ dữ liệu mã vạch DNA thực vật [116].

\* *Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn*

Trên cơ sở phân tích khả năng khuếch đại thành công của các cặp primer với các vùng gen tương ứng cho tỷ lệ khuếch đại thành công cao nhất cho tất cả các mẫu sẽ được chọn để giải trình tự DNA. 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 BLAST.

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

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.0 (The Molecular Evolution Genetics Analysis) với hệ số boottrap 1000.

\* *Các chỉ tiêu theo dõi:* Tỷ lệ khuếch đại các vùng DNA barcode *rbcL*, *matK*, ITS của các mẫu Kiwi nghiên cứu, sản phẩm PCR, kích thước DNA (bp); vị trí biến đổi, vị trí sai khác của ba vùng; cây phát sinh chủng loài và trình tự tham chiếu trên NCBI.

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

\* *Cặp mồi khuếch đại DNA*

**Bảng 2.2.** Cặp primer khuếch đại vùng SmY

Tên primer	Trình tự 5' – 3'	Chiều dài sản phẩm (bp)	Nguồn
SmY1_F	TCG CAA TTC GTT AGG GAT GAT GCG	770	[92]
SmY1_R	CAT AAT CAA CCA TCC ATA AAA ACC AT		

Các mẫu lá của cây Kiwi (*Actinidia* sp.) sau khi đánh giá mối quan hệ di truyền và nhận diện loài được lấy đại diện ở các loài *A. deliciosa*, *A. latifolia*, *A. chinensis*. Mẫu lá của 8 cây Kiwi bao gồm *A. deliciosa* (1), *A. latifolia* (2), *A. chinensis* (3), *A. chinensis* (4), *A. chinensis* (5), *A. chinensis* (6), *A. chinensis* (7) và *A. chinensis* (8) được thu nhận nhằm xác định giới tính (Phụ lục 2).

\* *Ly trích DNA tổng số*

Dựa trên quy trình CTAB cơ bản được thay đổi một số điều kiện [111].

\* *Kiểm tra độ tinh sạch DNA*

DNA trong hệ gen của các mẫu Kiwi được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260 nm và 280 nm trên máy quang phổ BioDrop™ µLITE (Anh Quốc).

\* *Phương pháp PCR*

Phản ứng 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. Thành phần của một phản ứng PCR với tổng thể tích 25  $\mu$ L bao gồm: 12,5  $\mu$ L MyTaq Mix (Bioline); 0,5 $\mu$ l mỗi primer (nồng độ 10  $\mu$ M); 9,5  $\mu$ L nước khử ion và 2  $\mu$ L DNA hệ gen. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR là: 94°C trong 4 phút ; 35 chu kỳ: 94°C trong 50 giây, 55°C trong 55 giây, 72°C trong 50 giây; 72°C trong 7 phút.

\* *Điện di sản phẩm PCR và đọc kết quả*

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TAE 0,5X, dưới hiệu điện thế 100V trong thời gian 30 phút. Gel được nhuộm bằng Gelred và quan sát kết quả dưới đèn UV, chụp hình trên máy chụp gel (GelDoc-It®2315 imager UVP-Mỹ).

\* *Các chỉ tiêu theo dõi:* Nồng độ và độ tinh sạch của DNA; điểm đánh dấu ở kích thước 770 bp trên điện di agarose.

### 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

Từ thí nghiệm xác định giới tính, lựa chọn mẫu lá *A. chinensis* (7) được lấy ở vị trí cách ngọn 10cm được thu nhận từ cây đã xác định giới tính và rửa dưới vòi nước chảy trong 30 phút. Sau đó, mẫu lá được ngâm trong dung dịch nước rửa chén Sunlight (Unilever, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam) 20% trong 10 phút và rửa lại bằng nước máy nhiều lần. Mẫu lá được rửa sạch bằng nước cất vô trùng trước khi đưa mẫu lá vào tủ cấy. Trong tủ cấy, mẫu lá được rửa với nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 5 phút. Tiếp theo, mẫu được khử trùng sơ bộ bằng Ethanol 70% trong 30 giây, rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Sau đó, mẫu lá được khử trùng bằng 1 g/L HgCl<sub>2</sub>, [117]; 10 g/L NaOCl [42] và AgNPs ở các nồng độ khác nhau (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm và 500 ppm) có bổ sung vài giọt Tween-80 trong thời gian 8 phút. Cuối cùng, mẫu được rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng trước khi cắt mẫu và cấy vào môi trường nuôi cấy.

Mẫu lá sau khi được khử trùng được cắt thành hình chữ nhật (0,5 cm  $\times$  1 cm) có chứa gân chính và được cấy lên môi trường cảm ứng mô sẹo (môi trường MS có bổ sung 0,8 mg/L 2,4-D) [10] làm nguồn vật liệu ban đầu cho nuôi cấy *in vitro*. Sau

4 tuần nuôi cấy ghi nhận số liệu. Những mẫu cấy này tiếp tục theo dõi đến tuần thứ 8 và thu nhận số liệu.

\* *Các chỉ tiêu theo dõi:* Tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu hoại tử/chết và tỷ lệ mẫu sống và cảm ứng mô sẹo (%). Số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (mg) và khối lượng khô (mg).

\* *Tăng sinh cụm chồi*

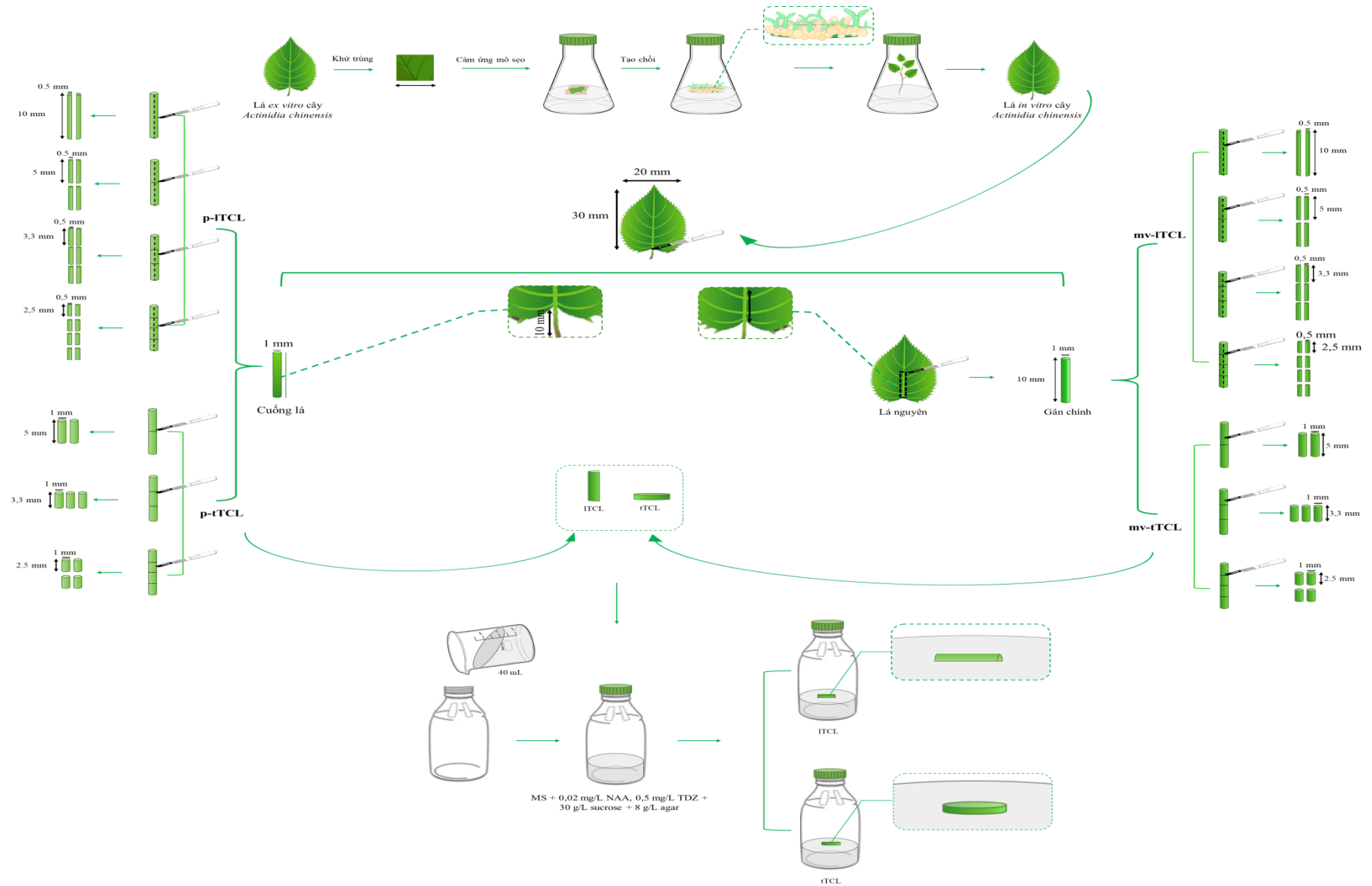
Các cụm chồi có nguồn gốc từ mẫu lá được cắt thành các cụm chồi nhỏ chứa 3 chồi mẫu; sau đó, các cụm chồi được cấy lên môi trường có bổ sung các dịch chiết hữu cơ nhằm tăng sinh cụm chồi. Dịch chiết chuối xanh được tạo ra bằng cách nấu chín 20g, xay nhuyễn trong 1000 mL nước cất và dịch chiết khoai tây cũng được tạo ra bằng cách nấu chín 20g, xay nhuyễn trong 1000 mL nước cất. Cả ba dịch chiết được bổ sung với các nồng độ khác nhau về thể tích (v/v) là (5%, 10%, 15% và 20%).

\* *Các chỉ tiêu theo dõi:* Chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, khối lượng tươi (g) và hình thái chồi.

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

Thí nghiệm này được thực hiện để nghiên cứu các kiểu cắt TCL và kích thước mẫu gân chính lá, cuống lá cây Kiwi tác động lên sự hình thành phôi soma.

Mẫu cấy 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-ITCL đối với mẫu cấy có gân lá chính; p-tTCL và p-ITCL đối với mẫu cấy ở cuống lá) với các kích thước khác nhau. Mẫu cắt lát dọc được cắt bằng cách dùng đầu kẹp panh giữ theo chiều dọc của mẫu và sử dụng mũi dao nhọn, sắc để cắt từ ngoài vào trong một đường thẳng (Hình 2.2). 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 [10]. 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.



**Hình 2.2.** Sơ đồ minh họa ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào để tạo ra các mẫu cây khác nhau từ gân chính của lá (mv) và cuống lá (p) của Kiwi.

Đối với phương pháp cắt tTCL, cuống lá (p) và gân lá chính (mv) có kích thước  $1 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  (rộng  $\times$  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). Trong khi đối với mẫu cắt lTCL, mẫu p và mv có kích thước  $1 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  (rộng  $\times$  dài) được cắt dọc thành 2 mẫu ( $\frac{1}{2}$  mv-lTCL và  $\frac{1}{2}$  p-lTCL). Mỗi mẫu  $\frac{1}{2}$  mv-lTCL và  $\frac{1}{2}$  p-lTCL được cắt ngang thành 2 mẫu ( $\frac{1}{4}$  mv-lTCL và  $\frac{1}{4}$  p-lTCL) hoặc cắt ngang thành 3 mẫu ( $\frac{1}{6}$  mv-lTCL và  $\frac{1}{6}$  p-lTCL) hoặc cắt ngang thành 4 mẫu ( $\frac{1}{8}$  mv-lTCL và  $\frac{1}{8}$  p-lTCL) (Hình 2.2). Sau đó, mẫu p-TCL và mv-TCL được đặt trên bề mặt môi trường nuôi cấy sao cho tất cả các vết thương của mẫu đều tiếp xúc với môi trường nuôi cấy.

Hiệu quả của SEM từ mẫu cây cuống lá (p-tTCL và p-lTCL) và mẫu cây gân chính của lá (mv-tTCL và mv-lTCL) được so sánh dựa trên tổng số SE. Sau đó, các mẫu cây cho SEM cao nhất được chọn để tái sinh chồi của *A. chinensis*. Cảm ứng SE (ngày) được định nghĩa là lần cảm ứng SE lần đầu tiên xảy ra.

\* *Các chỉ tiêu theo dõi*: Tỷ lệ SEM (%), số lượng SE trên một mẫu, tổng số SE, trọng lượng tươi của cụm SE (mg), và hình thái của các SE được ghi lại sau 8 tuần nuôi cấy.

c. Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng thực vật 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 với 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.

\* *Các chỉ tiêu theo dõi*: Trọng lượng tươi (g), số chồi trên mỗi mẫu, chiều cao chồi (cm) và số lá trên mỗi chồi thu được sau 6 tuần nuôi cấy.

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 với 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. 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.

\* *Các chỉ tiêu theo dõi*: Trọng lượng tươi (g), chiều cao cây con (cm), số rễ trên mỗi cây con, chiều dài rễ (cm), số lá trên mỗi cây con, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) và chỉ số SPAD (được đo bởi máy SPAD 502 Minolta, Nhật Bản) được ghi lại sau 8 tuần nuôi cấy.

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 giá thể gồm đất mùn và xơ dừa, (Công ty TNHH Nguồn Sinh Thái, Việt Nam), phân bón vi sinh (Công ty TNHH Trang Trại Việt, Việt Nam): 1: 0: 0; 1: 3: 1; 2: 4: 1; 2: 3: 1; 2: 2: 1 và được đặt trong nhà kính (Bảng 2.5). Cây con được tưới ngày 2 lần trong tuần đầu, sau đó tưới ngày 1 lần vào sáng sớm. Cây con được tưới ngày 2 lần trong tuần đầu, sau đó tưới ngày 1 lần vào sáng sớm.

\* *Các chỉ tiêu theo dõi*: Tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây con (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm) và chiều rộng lá (cm) được thu thập sau 6 tuần.

**Bảng 2.3.** Tỷ lệ phối trộn giá thể đất mùn, xơ dừa và phân bón vi sinh

Giá thể	Đất mùn (HM)	Xơ dừa (CF)	Phân bón vi sinh (BF)
	1	0	0
	1	3	1
Tỷ lệ	2	4	1
	2	3	1
	2	2	1

### 2.3.2. Phương pháp quan sát giải phẫu hình thái phát sinh phôi soma

Các mẫu phôi 6 tuần tuổi và 8 tuần tuổi được cắt, nhuộm màu và quan sát dưới kính hiển vi soi nổi [106] theo các bước sau: (1) Phôi được cắt thành từng lát mỏng (30 - 40  $\mu\text{m}$ ). (2) Ngâm các mẫu đã cắt trong dung dịch Javel 10% trong 15 phút. (3) Rửa sạch mẫu bằng nước cất sau đó mẫu được ngâm trong axit axetic 10% trong 10 phút. (4) Rửa sạch mẫu bằng nước cất khoảng 3 lần. (5) Nhuộm mẫu bằng dung dịch thuốc nhuộm 2 màu (đỏ carmine - xanh iodine) trong 5 phút. (6) Rửa lại mẫu bằng nước cất cho đến khi mẫu không còn màu phẩm nhuộm. (7) Đặt mẫu lên lam kính nhỏ thêm 1 giọt nước hoặc glycerin và đậy bằng lammen. (8) Quan sát, chụp hình và ghi kết quả dưới kính hiển vi quang học có vật kính 10X và 40X. (9) Quan sát sự phát sinh phôi soma: Quá trình phát sinh phôi soma được theo dõi hằng ngày, ghi nhận các dạng hình thái của phôi vô tính và chụp ảnh bằng kính hiển vi soi nổi và kính hiển vi quang học có vật kính 10X và 40X.

### 2.3.3. Phương pháp ghi nhận số liệu

*Xác định thời gian cảm ứng phát sinh phôi soma:* Thời gian cảm ứng phát sinh phôi soma được ghi nhận bắt đầu từ ngày mẫu có hiện tượng phát sinh phôi ở các vết thương của mẫu.

*Tỷ lệ phát sinh phôi (%):* Tỷ lệ phát sinh phôi (%) = Tổng mẫu cấy có SE / Tổng số mẫu ban đầu \* 100

*Xác định số lượng phôi soma trên mỗi mẫu cấy:* phôi soma được thu thập trên mẫu cấy có phát sinh phôi soma, đếm trên kính lúp sau 8 tuần nuôi cấy.

*Công thức hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF):* GCF được đưa vào để đánh giá ảnh hưởng của từng loại TCL được cắt so với đối chứng (toàn bộ mẫu) dựa trên “số lượng phôi soma trên mỗi mẫu” và “hệ số mẫu”. GCF của các SE được thu thập được tính theo công thức sau đây bởi Teixeira da Silva và Dobránszki (2011) [118]:

Đối với mẫu cấy thông thường (đối chứng):  $GCF_{DC} = N \times (R\%_{DC} \times SEN_{DC}) / 100$

Đối với mẫu cấy TCL:  $GCF_{TCL} = N \times (R\%_{TCL} \times SEN_{TCL}) / 100$

**R%** = tỷ lệ phần trăm mẫu SEM; **SEN** = Số lượng SEs trên mỗi mẫu; **N**: Hệ số mẫu TCL.

*Xác định khối lượng tươi của cụm phôi soma:* bằng cách thấm nước cụm phôi trên giấy thấm. Sau đó cân cụm phôi trên cân điện tử có giới hạn 500 g với độ chia

nhỏ nhất là 2 g và cân phân tích có giới hạn 200 g với độ chia nhỏ nhất 0,0001g.

*Xác định khối lượng khô của mẫu* : Thu thập các mẫu tươi (cụm phôi soma, mô sẹo, v.v...) sau khi đã xác định khối lượng tươi và gói các mẫu trong các túi giấy, ký hiệu mẫu và đặt hộp chứa mẫu vào tủ sấy, mở nắp và sấy trong ít nhất 72 giờ với điều kiện áp suất là 1,3kPa và nhiệt độ 70°C trong tủ sấy chân không. Đóng nắp hộp trước khi lấy ra khỏi tủ sấy, làm nguội trong bình hút ẩm trong 30 phút và cân với độ chính xác 1mg. Lặp lại thao tác sấy đến khi sự khác biệt giữa hai lần cân liên tiếp không đổi.

#### **2.3.4. Môi trường nuôi cấy/trồng**

*Môi trường nuôi cấy in vitro*: Môi trường được sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar; môi trường phát sinh phôi soma (MSE). Bố trí thí nghiệm với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật gồm NAA(0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/L), BA (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) hoặc TDZ (0,01; 0,03; 0,05; 0,07 mg/L) bổ sung riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau.

*Môi trường trong nhà kính*: Giá thể trồng cây con Kiwi ở giai đoạn vườn ươm gồm có xơ dừa, đất mùn (Công ty TNHH Nguồn Sinh Thái, Việt Nam), và phân vi sinh (Công ty TNHH Trang Trại Việt, Việt Nam) được phối trộn với tỷ lệ khác nhau trước khi trồng.

#### **2.3.5. Điều kiện nuôi cấy**

*In vitro*: Các thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi cấy với nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , độ ẩm 55 - 60%, sử dụng đèn huỳnh quang cường độ 40 - 45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , quang chu kỳ 16 h/ngày.

*Ex vitro*: Cây con trồng trong nhà kính với nhiệt độ ban ngày  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , nhiệt độ ban đêm  $15 \pm 2^\circ\text{C}$ , độ ẩm trung bình 75 – 80%, độ che sáng 50%, pH đất 6,5.

#### **2.3.6. Phân tích thống kê**

Trên cơ sở phân tích khả năng khuếch đại thành công của các cặp primer với các vùng gen tương ứng cho tỷ lệ khuếch đại thành công cao nhất cho tất cả các mẫu sẽ được chọn để giải trình tự DNA. 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 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  $p < 0,05$  [119].

### ***2.3.7. Địa điểm và thời gian nghiên cứu***

*Địa điểm nghiên cứu:* Phòng sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên; Viện Nghiên cứu CNSH & MT thuộc Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh; Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. HCM; Phòng Công nghệ sinh học thuộc Trường Đại học Khoa học Tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh; Trường Cao đẳng Nghề Đà Lạt.

#### *Thời gian nghiên cứu*

Thời gian thực hiện đề tài: 5/2017 - 5/2022.

Thí nghiệm khảo sát về sinh học phân tử từ tháng 7/2017 - 7/2019.

Thí nghiệm khảo sát về phát sinh hình thái, phát sinh phôi từ tháng 7/2019 - 9/2020.

Thí nghiệm khảo sát về nhân giống từ tháng 10/2020 - 6/2021.

Thí nghiệm khảo sát sự thích nghi của cây con ngoài vườn ươm từ tháng 6/2021 - 12/2021.



**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 (Phụ lục 3).

Kết quả PCR của 20 mẫu Kiwi được nghiên cứu (trong đó mẫu *Actinidia 1* và *Actinidia 2* là hai mẫu tự nhiên được thu trong nước và 18 mẫu còn lại là các mẫu nhập nội) dựa trên các vùng *rbcL*, *matK*, ITS với các primer tương ứng *rbcL1-F* và *rbcL 724-R*; *matK-KIM3-F* và *matK-KIM1-R*; ITS1-5F và ITS4-R cho thấy các băng xuất hiện rõ. Tỷ lệ khuếch đại của các vùng DNA barcode khác nhau với primer chuyên biệt cho từng barcode cho tỷ lệ khuếch đại khác nhau. Sản phẩm PCR của các mẫu Kiwi khuếch đại thành công dựa trên các vùng *rbcL*, *matK*, ITS được giải trình tự tại công ty Macrogen (10F, 254 Beotkkot-ro geumcheon-gu, Soul 08511, Rep. of Korea). Các trình tự DNA sau khi được hiệu chỉnh trình tự bằng phần mềm ATGC có kích thước lần lượt *rbcL* (701 -720 bp), *matK* (773 - 858 bp), ITS (706 - 715 bp) (Bảng 3.1).

**Bảng 3.1.** Tỷ lệ khuếch đại các vùng DNA barcode *rbcL*, *matK*, ITS của 20 mẫu Kiwi nghiên cứu

TT	Mẫu	<i>rbcL</i>		<i>matK</i>		ITS	
		Sản phẩm PCR	Kích thước DNA (bp)	Sản phẩm PCR	Kích thước DNA (bp)	Sản phẩm PCR	Kích thước DNA (bp)
1	<i>Actinidia 1</i>	x	712	x	855	x	706
2	<i>Actinidia 2</i>	x	710	x	853	x	707
3	<i>Actinidia 3</i>	x	710	x	773	x	717
4	<i>Actinidia 4</i>	x	718	-	-	-	-
5	<i>Actinidia 5</i>	x	707	x	850	x	722

TT	Mẫu	<i>rbcL</i>		<i>matK</i>		ITS	
		Sản phẩm PCR	Kích thước DNA (bp)	Sản phẩm PCR	Kích thước DNA (bp)	Sản phẩm PCR	Kích thước DNA (bp)
6	<i>Actinidia 6</i>	x	708	x	858	x	708
7	<i>Actinidia 7</i>	x	706	x	850	x	711
8	<i>Actinidia 8</i>	x	706	x	779	x	711
9	<i>Actinidia 9</i>	x	701	x	773	x	712
10	<i>Actinidia 10</i>	x	720	x	800	x	715
11	<i>Actinidia 11</i>	x	701	-	-	-	-
12	<i>Actinidia 12</i>	x	708	x	775	x	706
13	<i>Actinidia 13</i>	x	711	x	774	x	710
14	<i>Actinidia 14</i>	x	710	x	776	-	-
15	<i>Actinidia 15</i>	x	701	x	773	x	709
16	<i>Actinidia 16</i>	x	701	-	-	-	-
17	<i>Actinidia 17</i>	-	-	-	-	x	708
18	<i>Actinidia 18</i>	x	712	x	773	-	-
19	<i>Actinidia 19</i>	x	715	x	773	x	706
20	<i>Actinidia 20</i>	x	701	x	775	x	706
<b>Tỷ lệ khuếch đại và giải trình tự DNA (%)</b>		<b>19/20 (95%)</b>	<b>19/19 (100%)</b>	<b>16/20 (80%)</b>	<b>16/16 (100%)</b>	<b>15/20 (75%)</b>	<b>15/15 (100%)</b>

‘-‘: là ký hiệu tại vị trí của trình tự DNA bị mất nucleotide so với các trình tự DNA còn lại.

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. Một số nghiên cứu trước đây lại cho tỷ lệ khuếch đại đạt 100% nhưng tỷ lệ giải trình tự thành công chỉ đạt từ 72 - 99,3% [90]. Theo Huang, các loài *Actinidia* có sự biến đổi về mặt sinh học rất lớn khi trồng ở các vùng khí hậu và địa lý khác nhau, đồng thời chúng dễ dàng lai với nhau trong tự nhiên và tạo ra giống lai trong tự nhiên [1]. 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 cây Kiwi**

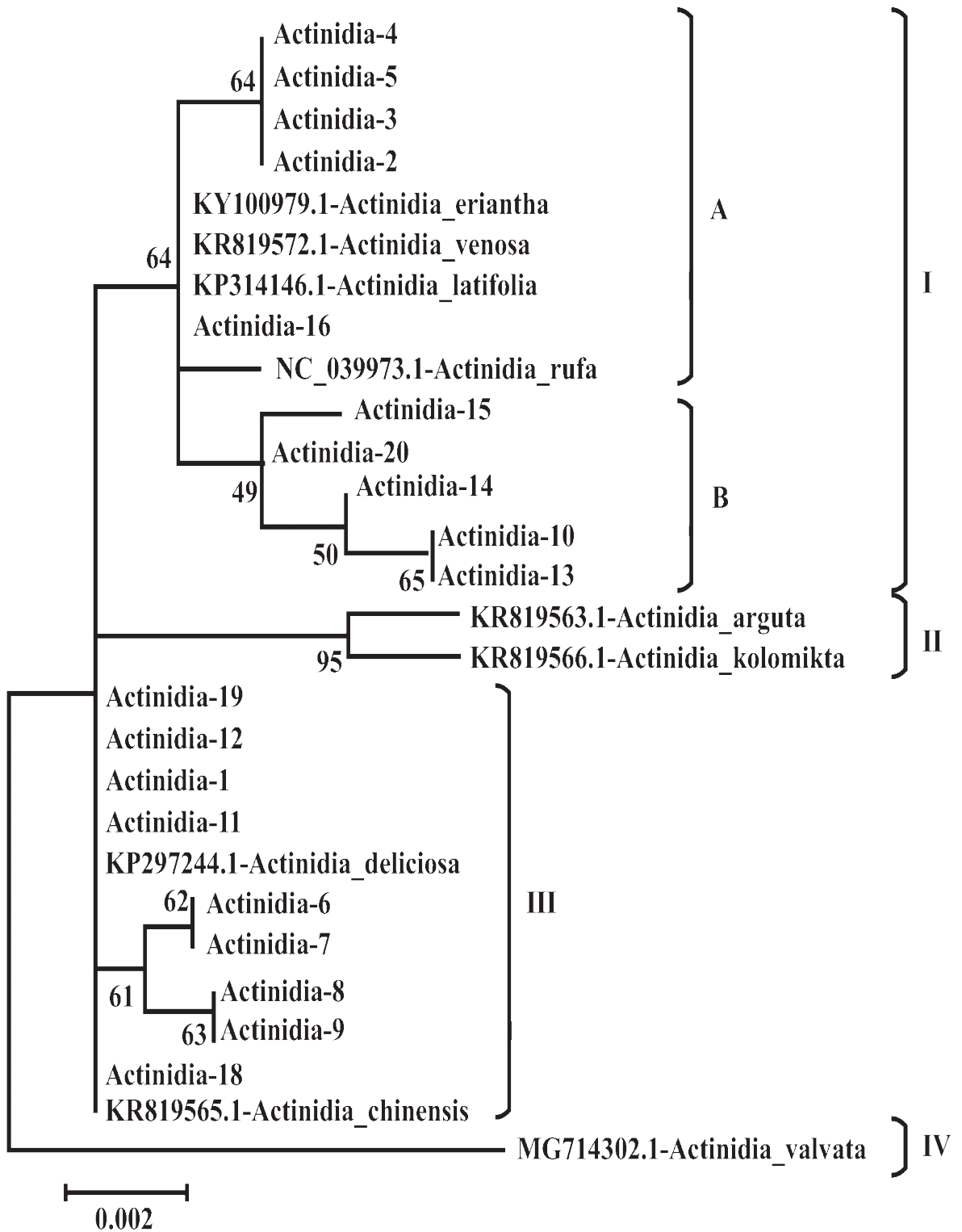
Các trình tự sau khi hiệu chỉnh bằng BLAST trên NCBI và cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.0 với hệ số bootstrap là 1000 cho kết quả cho thấy trình tự tương đồng và mức độ bao phủ của các DNA barcode nghiên cứu và trình tự trên NCBI của các mẫu Kiwi nghiên cứu là vùng *rbcL* (99% - 100%, 97,7 - 100%), *matK* (99,7% - 100%, 99 - 100%), ITS (87% - 100%, 95,6 - 100%). Điều này cho thấy các 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.

Kết quả phân tích trình tự DNA của các mẫu Kiwi bằng phần mềm MEGA 7.0 cho kết quả 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 ITS2 675/706, vùng biến đổi là 68/706, chỉ số Pi là 22/706 (Phụ lục 3; Phụ lục 4; Phụ lục 5).

Từ kết quả trên chúng tôi xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự DNA các vùng *rbcL*, *matK*, ITS của các mẫu Kiwi bằng phần mềm MEGA 7.0 để phân tích mối quan hệ di truyền.

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

Trình tự DNA vùng *rbcL* giữa 19 mẫu Kiwi có sự khác nhau tại các vị trí 47 (T/A), 272 (G/A), 388 (A/G), 640 (G/A), 661 (T/A), 673 (T/A/C), 675 (T/C) (Phụ lục 4).



**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

Dựa trên kết quả khuếch đại và giải trình tự thành công vùng *rbcL* của 19/20 mẫu Kiwi thu thập, mối quan hệ di truyền giữa các mẫu này và 9 mẫu tham chiếu trên GeneBank được xây dựng (Hình 3.1). 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

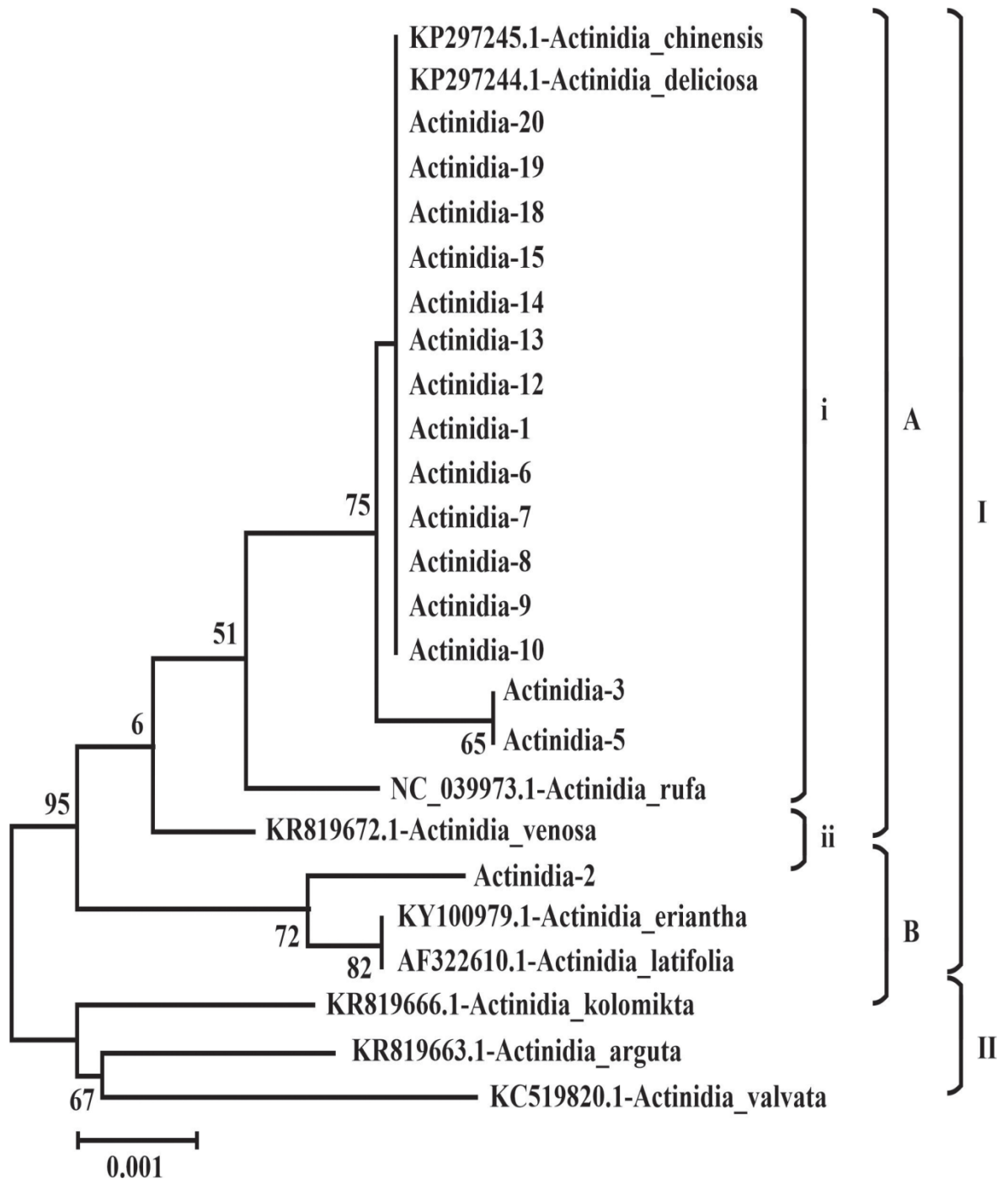
thuộc nhóm I, cùng nhóm với các mẫu tham chiếu thuộc các loài như *A. eriantha*, *A. venosa*, *A. latifolia*, *A. rufa* và 9 mẫu Kiwi còn lại thuộc nhóm III, cùng nhóm với các mẫu tham chiếu thuộc các loài như *A. deliciosa*, *A. chinensis*. Đối với nhóm II chỉ gồm các mẫu tham chiếu thuộc các loài *A. 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 chia thành 2 nhóm rõ rệt (Phụ lục 4).

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

Dựa trên kết quả khuếch đại và giải trình tự thành công vùng *matK* của 16/20 mẫu Kiwi thu thập, mối quan hệ di truyền giữa các mẫu này và 9 mẫu tham chiếu trên GeneBank được xây dựng (Hình 3.2). Cây phát sinh chủng loài của 16 mẫu Kiwi và 9 trình tự tham chiếu chia làm 2 nhóm chính. Trong đó, nhóm II gồm 3 trình tự tham chiếu thuộc 3 loài *A. arguta*, *A. kolomika*, *A. valvata*, nhóm I gồm 16 mẫu Kiwi và 6 trình tự tham chiếu thuộc các loài *A. eriantha*, *A. venosa*, *A. latifolia*, *A. rufa*, *A. deliciosa* và *A. chinensis*. Nhóm I chia làm 2 phân nhóm IA và IB, chỉ mẫu *Actinidia 2* thuộc nhóm IB, còn 15 mẫu Kiwi còn lại thuộc nhóm IA. Kết quả phân tích nhóm IA cho thấy 15 mẫu Kiwi thuộc chung một nhóm di truyền và tách riêng với nhóm còn lại gồm chỉ một mẫu tham chiếu thuộc loài *A. rufa*. Điểm đáng chú ý trong 15 mẫu Kiwi này cho thấy 2 mẫu *Actinidia 3* và *Actinidia 5* không có sự khác biệt và tách riêng với nhóm kia gồm 13 mẫu Kiwi còn lại. 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 *Actinidia 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 (Phụ lục 5).

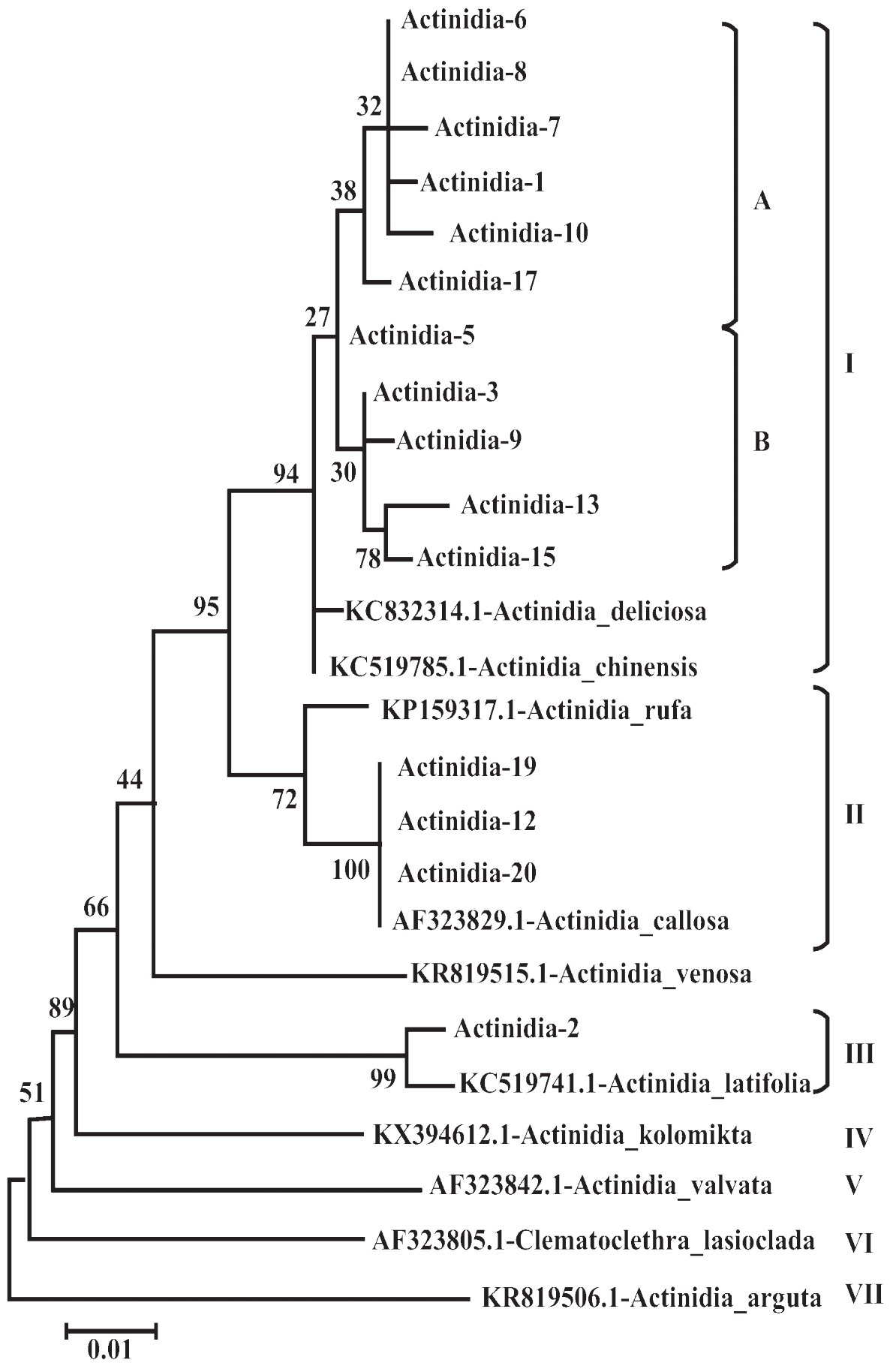
Kết quả phân tích tỉ lệ phân nhóm di truyền của các mẫu Kiwi thu thập dựa trên vùng *matK* cho thấy chỉ có mẫu Kiwi thu thập từ nguồn tự nhiên Việt Nam thuộc một nhóm, tách riêng với các mẫu còn lại. Trong đó, mẫu cây Kiwi thu thập từ nguồn tự nhiên Việt Nam có mối quan hệ di truyền gần với 12 mẫu Kiwi 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 15 mẫu Kiwi thu thập

Phân tích trình tự DNA vùng ITS của 15 mẫu Kiwi cho thấy có sự khác nhau ở 68 vị trí của các trình tự nghiên cứu. Vùng ITS nằm trong nhân nên trong quá trình lai tạo đã làm biến đổi một số vị trí nucleotide trên trình tự DNA do đó có nhiều sự biến đổi hơn so với các trình tự DNA các vùng gen trong lục lạp.



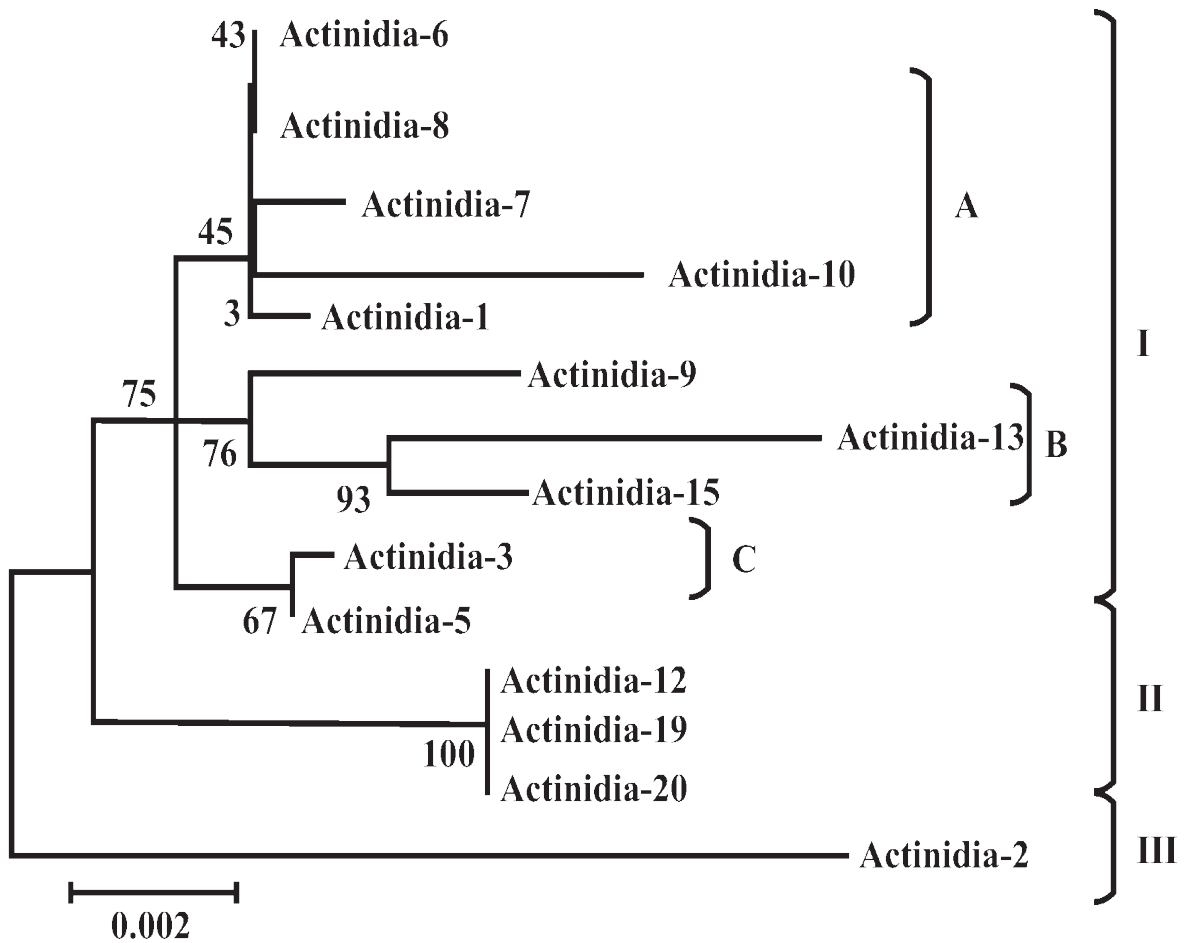
**Hình 3.3.** Cây phát sinh chủng loài của 15 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của vùng ITS



Dựa trên kết quả khuếch đại và giải trình tự thành công vùng ITS của 15/20 mẫu Kiwi thu thập, mối quan hệ di truyền giữa các mẫu này và 10 mẫu tham chiếu trên GeneBank được xây dựng (Hình 3.3). Cây phát sinh chủng loài của 15 mẫu Kiwi và 10 trình tự tham chiếu chia làm 7 nhóm chính. Trong đó, nhóm IV, V, VI, VII bao gồm các trình tự tham chiếu thuộc các loài *A. kolomika*, *A. valvata*, *A. lasioclada*, *A. arguta*. Nhóm III gồm mẫu *Actinidia 2* và trình tự tham chiếu của loài *A. latifolia*. Nhóm II gồm 3 mẫu *Actinidia 12*, *Actinidia 19* và *20* và 2 trình tự tham chiếu thuộc loài *A. callosa* và *A. rufa*. Kết quả phân nhóm 11 mẫu Kiwi còn lại cùng nhóm với 2 trình tự tham chiếu thuộc 2 loài *A. deliciosa* và *A. chinensis*. Kết quả phân tích dựa trên trình tự vùng ITS 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, nhóm 2 gồm 3 mẫu *Actinidia 12*, *Actinidia 19* và *Actinidia 20*, nhóm còn lại chỉ có mẫu *Actinidia 2* và tương đối tách biệt với 2 nhóm kia (Phụ lục 6).

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.

Dựa trên kết quả phân tích mối quan hệ di truyền của 20 mẫu Kiwi thu thập dựa trên từng vùng trình tự như *rbcL*, *matK*, ITS riêng rẽ cho thấy đa số các mẫu thu thập có quan hệ di truyền gần với hai loài *Actinidia deliciosa* và *Actinidia chinensis*. Trong đó mẫu *Actinidia 2* có nguồn gốc gần với loài *Actinidia latifolia* và có nguồn gốc tương đối tách biệt so với các mẫu Kiwi còn lại. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên từng vùng trình tự cũng cho thấy có sự khác nhau nhất định giữa các cây phát sinh loài. Điều này có thể giải thích do một số nguyên nhân: (1) khả năng lai tạo tự do giữa các loài thuộc chi *Actinidia* với nhau từ đó dẫn đến nguồn gốc loài thường phức tạp khi phân tích dựa trên di truyền DNA [120,7]; (2) sự phức tạp trong di truyền lục lạp ở các loài thuộc chi này, trong đó lục lạp được di truyền từ bố còn ty thể di truyền từ mẹ [121]; (3) mức độ đa bội ở các loài tự nhiên và lai tạo ở Kiwi là tương đối khác biệt từ nhị bội đến lục bội, một số loài có thể có bát bội thập bội hay nhiều hơn [40,8] Đây cũng là một phần lý do sự phức tạp trong phân tích giới tính đực/cái ở cây Kiwi cũng như việc phân tích nguồn gốc của các loài trong tự nhiên.

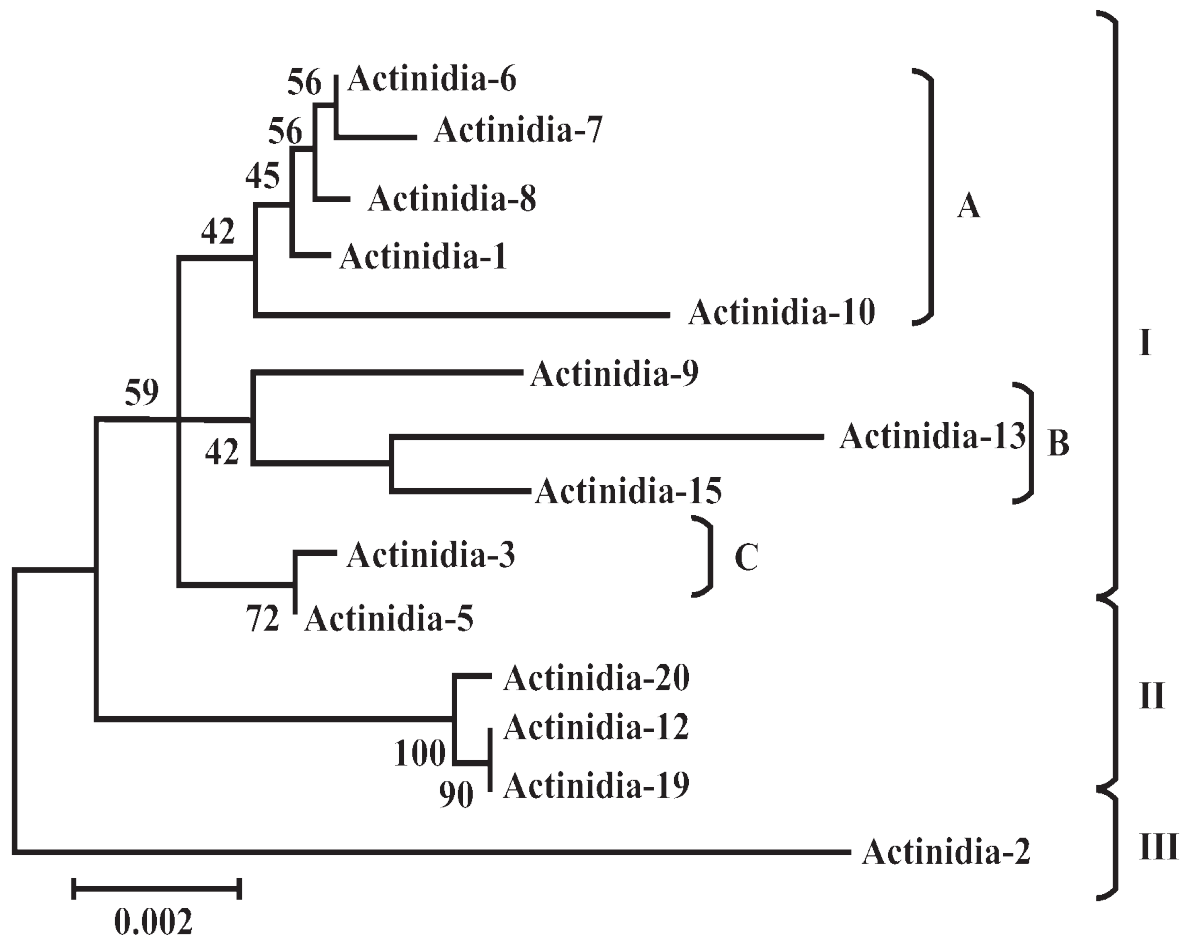
3.1.2.4. Vùng *matK* + ITS

**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 (Hình 3.4). Songzhi Xu và cộng sự (2015) đã nghiên cứu trên *Dendrobium*, một trong những chi lớn nhất của thực vật có hoa, chứa nhiều loài quan trọng trong bảo tồn đa dạng sinh học. *Dendrobium* là một nhóm nổi tiếng khó xác định loài nên nhóm tác giả này đã kết hợp hai vùng *matK* + ITS để xác định 184 loài *Dendrobium*. ITS + *matK* là mã vạch tối ưu dựa trên tất cả các phương pháp đánh giá. Hơn nữa, hiệu quả của ITS + *matK* đã được xác minh trong bốn chi lớn khác bao gồm *Ficus*, *Lysimachia*, *Paphiopedilum* và *Pedicularis* trong nghiên cứu này. Do đó, CBOL đã đề xuất kết hợp ITS + *matK* làm mã vạch DNA cốt lõi cho các chi thực vật có hoa lớn [122].

### 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

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, các vùng gen khác nhau có hiệu quả đánh giá mối quan hệ di truyền và xác định giống khác nhau. Trong nghiên cứu này cho thấy vùng gen trong lục lạp có sự bảo tồn cao hơn trong nhân. Trong đó khi sử dụng hai vùng gen *rbcL* và *matK* cho sự khác biệt của các trình tự nghiên cứu là 7 vị trí trong khi đó vùng ITS trong nhân cho sự khác biệt giữa các trình tự với 68 vị trí khác biệt.

Vùng ITS trong nhân cho nhiều vị trí sai khác như vậy do trong quá trình sinh trưởng và phát triển đã xảy ra quá trình lai tạo dẫn đến trình tự DNA trong nhân có sự biến đổi đồng thời đặc điểm di truyền của cây Kiwi dễ ảnh hưởng bởi điều kiện môi

trường bên ngoài. Đồng thời khi kết hợp nhiều trình tự DNA của các vùng gen cho thấy có hiệu quả hơn trong việc sử dụng từng vùng gen riêng lẻ (Hình 3.5). Zang (2012) cho rằng *rbcL* và *matK* là mã vạch cốt lõi trong thực vật, nhưng chúng không đủ mạnh để phân biệt giữa các nhóm thực vật có quan hệ họ hàng gần. Mã vạch kết hợp cần được đánh giá để cải thiện mức độ phân biệt giữa các loài thực vật. Kết quả nghiên cứu ở lan hồ điệp *Paphiopedilum*, cho thấy khi kết hợp hai vùng ITS + *matK* cho kết quả khoảng cách trung bình giữa các loài lớn hơn so với khi sử dụng vùng riêng lẻ *matK* là (0,8%) và khi kết hợp ITS + *matK* + *rbcL* làm mã vạch cốt lõi ở *Lysimachia*, kết quả cho thấy có sự phân kỳ giữa các vùng đặc hiệu là (4,4%) [123]. Như vậy, khi đánh giá các kết quả phân tích di truyền các mẫu nghiên cứu dựa trên từng vùng gen riêng lẻ và kết hợp cho thấy sự kết hợp giữa 2 vùng gen *matK*+ ITS hay 3 vùng gen *rbcL*+*matK*+ITS có hiệu quả hơn khi phân tích dựa trên từng vùng gen đơn lẻ.

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

Kết quả kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA hệ gen sau khi ly trích được (Bảng 3.5) cho thấy DNA của 8 mẫu Kiwi đều được ly trích thành công. DNA thu được có độ tinh sạch cao (OD260/OD280 nằm trong khoảng 1,8 - 2,0).

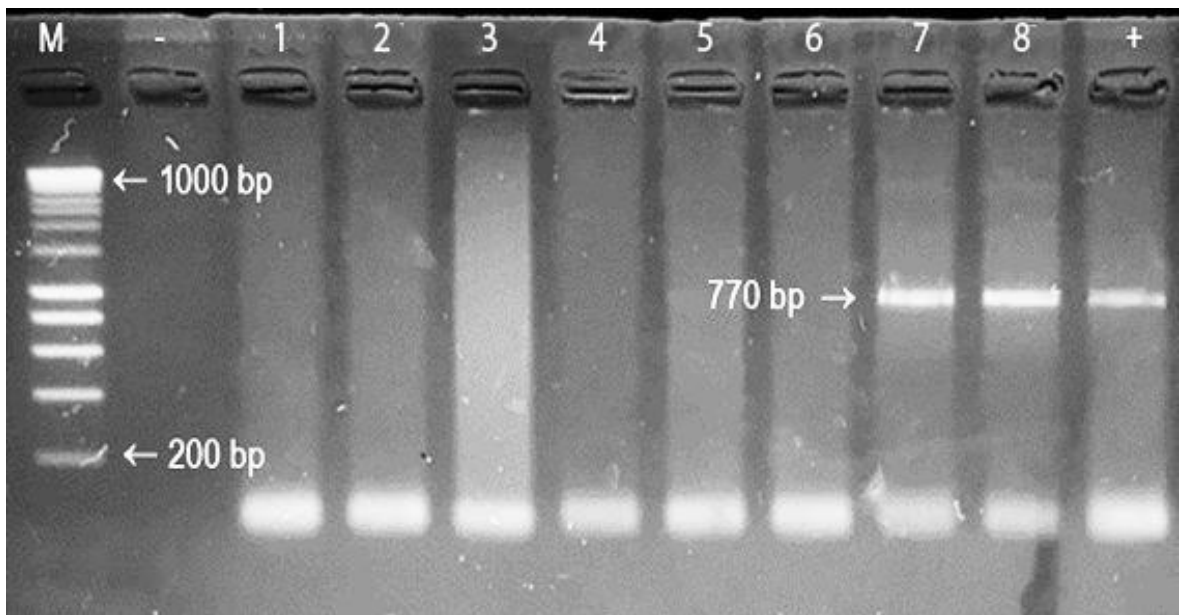
**Bảng 3.2.** Kết quả ly trích DNA tổng số

Mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8
Nồng độ (ng/μl)	99,76	51,57	127,8	38,74	36,38	31,20	53,19	41,44
OD260/280	2,046	2,017	1,942	1,962	1,877	1,926	1,956	1,933

Kết quả điện di và kiểm tra sản phẩm PCR cho thấy tất cả mẫu cái (1, 2, 3, 4, 5 và 6) 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 cây số 7 và cây số 8 (Hình 3.6).

Nghiên cứu của Akagi (2019) [124] đã chỉ ra rằng, nhiễm sắc thể Y ngăn chặn sự phát triển của các cơ quan hoa cái và thúc đẩy sự phát triển hoa đực và sự biểu hiện của nó ở cây Kiwi dẫn đến sự phát triển cây đơn tính; Điều này xuất hiện ở tất cả các loài trên các cá thể riêng biệt và cơ chế này đã phát triển trước khi hình loài và trước khi đa bội hóa. Cây cái tạo ra những hoa hoàn hảo về mặt hình thái với

nhụy và nhị hoa phát triển tốt, tuy nhiên, nhị của chúng tạo ra phấn hoa không thể sống được; trong khi đó hoa của cây đực có bầu noãn nhỏ, không có noãn nhưng nhị của chúng có phấn hoa. Sự phát triển nhị ở hoa dừng lại ở giai đoạn đầu trong khi sự phát triển của hạt phấn trong nhụy hoa dừng lại ở giai đoạn phát triển rất muộn [99]. Vì vậy, việc phát hiện ra nhiễm sắc thể Y nhằm xác định giới tính của cây Kiwi có ý nghĩa rất quan trọng trong công tác nhân giống và bảo tồn nguồn gen. Ngoài ra, cây Kiwi cần 4 - 8 năm trồng ngoài tự nhiên mới có thể xác định được giới tính là một vấn đề lớn [8]. Vì vậy, chỉ thị phân tử rất hữu ích để xác định giới tính ở giai đoạn phát triển ban đầu. Hơn nữa, giới tính của cây rất khó phân biệt ở giai đoạn đầu của quá trình phát triển và trước khi ra hoa. Do đó việc xác định cây đực và cây cái đang trở thành ưu tiên của các nhà chọn giống, đặc biệt là trước khi nhân giống, vì điều này sẽ giúp cải thiện mùa vụ và tăng lợi nhuận [125]. Đối với cây Kiwi, do thời gian sinh trưởng dài từ 6-8 năm, nên việc xác định giới tính ở giai đoạn đầu quá trình phát triển là tiềm năng trong sản xuất giống cây trồng.



**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; (1): *Actinidia* 1; (2):  
*Actinidia* 2; (3): *Actinidia* 5; (4): *Actinidia* 7; (5): *Actinidia* 8;  
 (6): *Actinidia* 9; (7): *Actinidia* 10; (8): *Actinidia* 13

Dựa trên kết quả xác định giới tính của 8 mẫu cây Kiwi thuộc 03 loài *A. deliciosa*; *A. latifolia*; *A. chinensis*; chỉ có 02 mẫu thuộc loài *A. chinensis* có giới tính đực là mẫu *Actinidia* 7 và mẫu *Actinidia* 8. Do đó, mẫu đực của cây *Actinidia* 7 được sử dụng làm nguồn vật liệu để nhân giống *in vitro* trong thí nghiệm tiếp theo.

### 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 cây và tái sinh chồi

Kết quả ghi nhận được cho thấy, các chất khử trùng mẫu cây khác nhau (AgNPs, HgCl<sub>2</sub> và NaOCl) ảnh hưởng khác nhau lên khả năng khử trùng bề mặt mẫu cây và cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.3). Kết quả ghi nhận được cho thấy rằng AgNPs và các chất khử trùng thông dụng có hiệu quả trong khử trùng bề mặt mẫu lá và cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.3). Tuy nhiên, 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, HgCl<sub>2</sub> 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). Quan sát sự sinh trưởng của mẫu cây đến tuần thứ 8 cho thấy, mẫu lá có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs cho khả năng tái sinh chồi cũng như sinh trưởng của chồi tốt hơn so với 2 chất khử trùng còn lại (Bảng 3.4 và Hình 3.7 a, b).

**Bảng 3.3.** Ảnh hưởng của các chất khử trùng lên khả năng khử trùng bề mặt mẫu cây 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 cây hầu hết bị nhiễm
	200 ppm	35,56b	13,33cd	51,11a	Mẫu cây xanh và ít tổn thương
	300 ppm	33,33b	31,11b	35,56b	Mẫu cây chuyển sang màu nâu và bị tổn thương nhiều
	500 ppm	15,56c	60,00a	24,44c	Mẫu cây hầu hết bị hoại tử hoặc chết

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
HgCl <sub>2</sub>	1 g/L	22,22c	40,00b	37,78b	Mẫu cây hầu hết chuyển sang màu trắng và bị tổn thương
NaOCl	10 g/L	48,89a	17,78c	33,33b	Mẫu cây bị nhiễm nhiều

\* Những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở  $p < 0,05$  theo phép thử Duncan.

**Bảng 3.4.** Sự tái sinh chồi từ mẫu cây lá Kiwi được khử trùng bằng AgNPs, HgCl<sub>2</sub> và NaOCl sau 8 tuần nuôi cấy

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

\* Những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở  $p < 0,05$  theo phép thử Duncan.

Khi nghiên cứu về khả năng khử trùng bề mặt mẫu cây của các chất khử trùng, các nhà khoa học thường sử dụng AgNPs, HgCl<sub>2</sub> và NaOCl để khử trùng các loại mẫu cây khác nhau (lá, đốt thân, chồi ngủ,...) [60,126]. Trong lĩnh vực sinh học - nông nghiệp, đặc biệt là nuôi cấy mô, tế bào và cơ quan thực vật AgNPs được sử dụng như là một chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm gia tăng sinh trưởng, phát triển, tích lũy hoạt chất thứ cấp, khắc phục các hiện tượng bất thường,... [127,128]. Gần đây, AgNPs được sử dụng như là tác nhân khử trùng mẫu cây cây *African violet* [129], Rong bắp sù [130], cây Cúc [126], cây Dâu tây [131], cây sâm Ngọc Linh [132]. Trong nghiên cứu này, 200 ppm AgNPs không những có vai trò trong khử trùng mẫu cây mà AgNPs còn có tác dụng ít làm tổn thương mẫu cây như chất khử trùng HgCl<sub>2</sub> 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

Kết quả ghi nhận được cho thấy, các dịch chiết hữu cơ có hiệu quả lên khả năng tăng sinh cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy (Bảng 3.5).

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

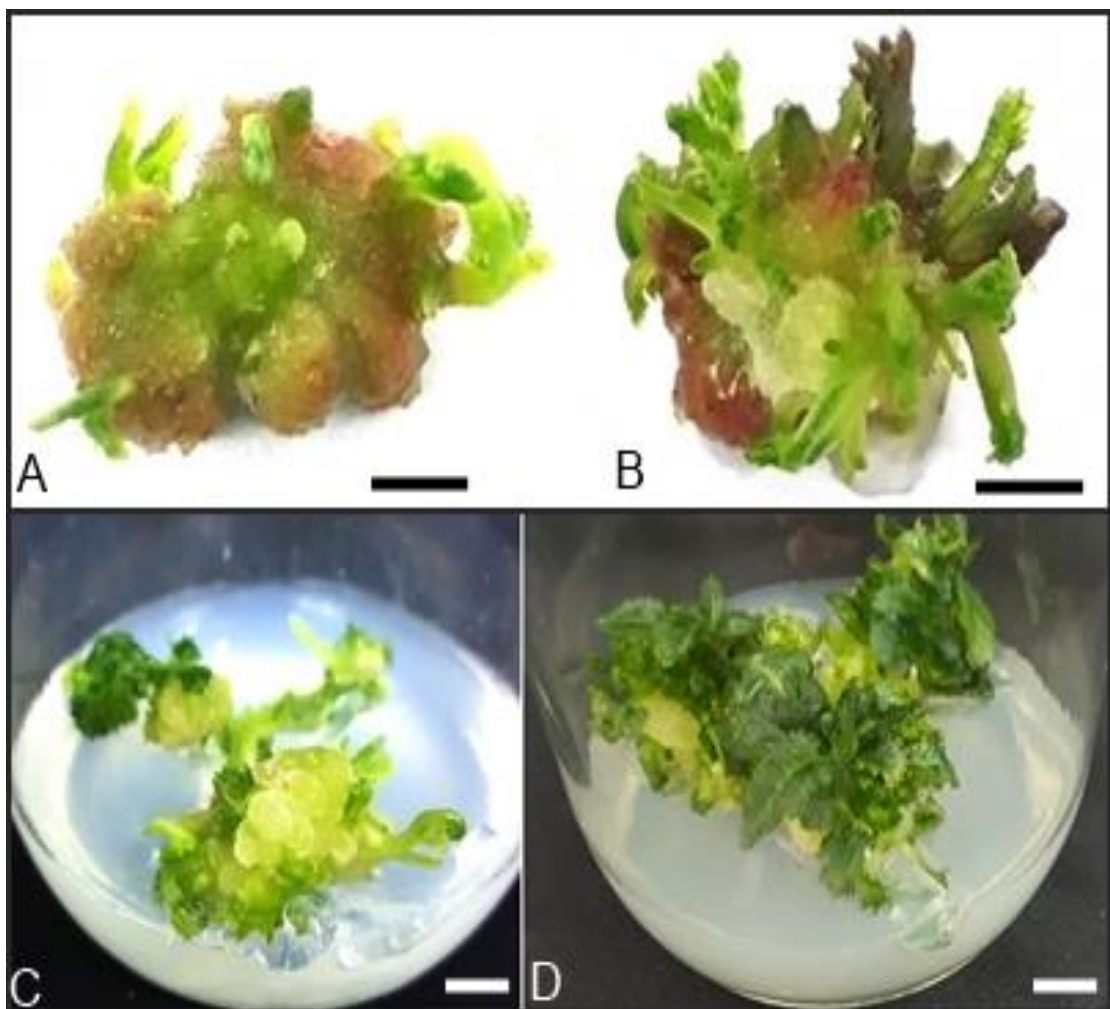
Dịch chiết hữu cơ	Nồng độ (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Khối lượng tươi (g)	Hình thái chồi
ĐC	0	3,05bc	2,67bcd	1,65c	Các chồi nhỏ
Nước dừa	5	2,90bcd	2,33cd	1,83bc	Chồi khỏe, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	10	3,27b	3,33abc	2,40b	
	15	3,30b	3,33abc	2,46b	Chồi khỏe,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

\* Các chữ cái khác nhau được hiển thị trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt



đáng kể ở mức  $p < 0,05$  trong phép thử Duncan.

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 3.5 và hình 3.7c, d). Cúc và cộng sự (2014) [35] đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ như chuối, khoai tây, nước dừa trên *Paphiopedilum delenatii*, kết quả cho thấy cả ba nhóm hợp chất hữu cơ đều có tác dụng làm gia tăng số lượng chồi. Trong đó, chuối có tác động mạnh lên quá trình tạo chồi và số chồi đạt cao nhất ở nồng độ 20 g/L với 3,8 chồi/mẫu cấy. Chen (1998) [128] ghi nhận môi trường có chứa dịch chiết của chuối, cà rốt, khoai tây, nước dừa giúp cây lan *Oncidium* phát triển tốt nhất với chiều cao, số lá, số rễ, chiều dài rễ, trọng lượng tươi và trọng lượng khô cao hơn đáng kể so với đối chứng. Islam và cộng sự (2000) [133] báo cáo chiết xuất khoai tây và chuối chứa niacin và các vitamin khác, trong đó niacin và thiamine giúp tăng cường sự phát triển của chồi và cây con [134].



**Hình 3.7.** Tạo nguồn mẫu *in vitro* cây Kiwi  
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 Kiwi 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-lTCL**

Kết quả cho thấy mẫu cây gân lá chính của Kiwi được cắt bằng kỹ thuật TCL (mv-tTCL và mv-lTCL) ảnh hưởng đáng kể đến phát sinh phôi vô tính (Bảng 3.6 và Hình 3.8 a-x). 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 lTCL (Bảng 3.6). Cảm ứng phôi vô tính (14,00 - 14,66 ngày) thể hiện trong các mẫu  $\frac{1}{4}$  mv-lTCL 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.

Các phôi vô tính chủ yếu hình thành theo chiều dọc của vết thương ở gân chính của lá, có màu trắng và xanh nhạt. 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-lTCL trên môi trường cảm ứng phôi cho thấy cảm ứng phát sinh phôi vô tính muộn nhất (20,66 ngày) (Bảng 3.6). 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% (Bảng 3.6 và 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-lTCL (Bảng 3.6). Trọng lượng tươi của các cụm phát sinh phôi cũng được ghi nhận là có sự khác biệt đáng kể, kích thước mẫu cây nhỏ hơn, trọng lượng tươi của cụm thấp hơn. Đối với toàn bộ gân lá chính (đối 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-lTCL**

Đối với mẫu cây cuống lá, phát sinh phôi vô tính cũng được ghi nhận trong tất cả các mẫu TCL. Các mẫu p-tTCL và p-lTCL được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng phôi ảnh hưởng đáng kể đến cảm ứng phôi vô tính, phát sinh phôi vô tính, số lượng phôi vô tính trên mỗi mẫu, tổng số phôi vô tính và trọng lượng tươi của

cụm phôi soma cũng như hình thái phôi vô tính (Bảng 3.7).

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 3.7). 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 như  $\frac{1}{4}$  p-ITCL và  $\frac{1}{8}$  p-ITCL, cảm ứng phôi vô tính sớm hơn là 16 ngày, trong khi đối với mẫu p-tTCL có kích thước lớn hơn như  $\frac{1}{2}$  p-tTCL, cảm ứng SE cũng sớm hơn là 15,33 ngày (Bảng 3.7). Phát sinh phôi vô tính (92,33%) là cao nhất ở mẫu  $\frac{1}{6}$  p-ITCL (Bảng 3.7). Kết quả cũng cho thấy khối lượng tươi của mẫu cấy tỷ lệ thuận với kích thước mẫu cấy, mẫu p-ITCL có kích thước từ  $\frac{1}{2}$  p-ITCL đến  $\frac{1}{8}$  p-ITCL cho kích thước giảm dần từ 977,66 mg xuống 459,66mg; tương tự đối với mẫu p-tTCL có kích thước từ  $\frac{1}{2}$  p-tTCL đến  $\frac{1}{4}$  p-tTCL cho kích thước giảm dần từ 954,33mg xuống 493,66mg. Hơn nữa, trọng lượng tươi của SE là cao nhất (1658,66 mg) ở mẫu đối 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 cấy **	GCF <sub>TCL</sub>	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	
½ mv-ITCL	27,00a	72,33c	6,00b	8,68d	937,33b	Phôi soma với các hình dạng khác nhau (hình cầu, trái tim và ngư lôi) và màu sắc (trắng hoặc xanh lục nhạt)
¼ mv-ITCL	14,00c	72,66c	6,66b	19,36ab	531,33d	
⅙ mv-ITCL	19,66b	54,00e	5,33b	17,27ab	419,66f	
⅛ mv-ITCL	20,66b	61,00d	2,66c	12,98bcd	412,33f	
½ mv-tTCL	14,66c	98,67a	10,66a	21,04a	945,00b	Phôi soma với các hình dạng khác nhau (hình cầu, hình trái tim, hình ngư lôi và lá mầm) và màu sắc (trắng hoặc xanh đậm)
⅓ mv-tTCL	19,66b	59,33d	6,00b	10,68cd	595,33c	
¼ mv-tTCL	20,00b	72,66c	5,33b	15,49abc	459,33e	

\* Những chữ cái khác nhau được hiển thị trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy  $p < 0,05$  trong phép phân tích Duncan.

\*\* Chỉ thu thập trên mẫu cấy có phát sinh phôi soma.

Nghiên cứu cho thấy mẫu cấy  $1/8$  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 cấy  $1/8$  p-ITCL có hình cầu, trái tim và hình ngư lôi trong khi mẫu cấy  $1/2$  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 3.7 cũng cho thấy rằng kích thước của mẫu cấy cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của các phôi vô tính. Đối với mẫu cuống lá nguyên ( $1 \times 10$  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 Kiwi thông qua 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;  $\frac{1}{2}$  mv-ITCL;  $\frac{1}{4}$  mv-ITCL;  $\frac{1}{6}$  mv-ITCL;  $\frac{1}{8}$  mv-ITCL;  $\frac{1}{2}$  mv-tTCL;  $\frac{1}{3}$  mv-tTCL;  $\frac{1}{4}$  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;  $\frac{1}{2}$  p-ITCL;  $\frac{1}{4}$  p-ITCL;  $\frac{1}{6}$  p-ITCL;  $\frac{1}{8}$  p-ITCL;  $\frac{1}{2}$  p-tTCL;  $\frac{1}{3}$  p-tTCL;  $\frac{1}{4}$  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  $\mu$ m*).

**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 cấy **	GCF <sub>TCL</sub>	Khối lượng tươi 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 với các hình dạng khác nhau (hình cầu, trái tim và ngư lôi) và màu sắc (trắng hoặc xanh lục nhạt)
¼ p-ITCL	16,00c	74,33c	5,00bc	14,87b	545,00e	
⅙ p-ITCL	16,33bc	92,33a	5,66bc	31,36a	464,66f	
⅛ 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 với các hình dạng khác nhau (hình cầu, hình trái tim, hình ngư lôi và lá mầm) và màu sắc (trắng hoặc xanh đậm)
⅓ p-tTCL	20,00a	75,66c	6,33b	14,37b	596,33d	
¼ p-tTCL	20,33a	78,00c	5,66bc	17,66b	493,66f	

\* Những chữ cái khác nhau được hiển thị trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy  $p < 0,05$  trong phép phân tích Duncan.

\*\* Chỉ thu thập trên mẫu cấy có phát sinh phôi soma.



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

**Bảng 3.8.** So sánh hệ số điều chỉnh tăng trưởng của các phôi vô tính

Mẫu TCL	Cảm ứng phát sinh phôi soma (ngày)		Số lượng phôi soma trên mỗi mẫu cấy**		Hệ số tái sinh	
	mv	p	mv	p	mv	p
(ĐC)	19,66b*	15,66c*	10,00a	6,66b	9,20cd	5,90c
½ ITCL	27,00a	19,33ab	6,00b	4,33c	8,68d	7,56c
¼ ITCL	14,00c	16,00c	6,66b	5,00bc	19,36ab	14,87b
⅙ ITCL	19,66b	16,33bc	5,33b	5,66bc	17,27ab	31,36a
⅛ ITCL	20,66b	16,00c	2,66c	6,00bc	12,98bcd	32,00a
½ tTCL	14,66c	15,33c	10,66a	8,66a	21,04a	15,18b
⅓ tTCL	19,66b	20,00a	6,00b	6,33b	10,68cd	14,37b
¼ tTCL	20,00b	20,33a	5,33b	5,66bc	15,49abc	17,66b

\* Những chữ cái khác nhau được hiển thị trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy  $p < 0,05$  trong phép phân tích Duncan.

\*\* Chỉ thu thập trên mẫu cấy có phát sinh phôi soma.

Khi so sánh hệ số điều chỉnh tăng trưởng của các phôi vô tính phát sinh, kết quả cho thấy, có sự khác biệt đáng kể về phát sinh phôi vô tính giữa các mẫu A. chinensis khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy. 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<sub>TCL</sub> thu được với ½ mv-tTCL và ½ p-tTCL lần lượt là 21,0 và 15,2; trong khi đó GCF<sub>ĐC</sub> của toàn bộ mẫu gân lá nguyên là 9,2 và GCF<sub>ĐC</sub> của mẫu cuống lá nguyên là 5,9 (Bảng 3.8). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy mẫu mv-tTCL và p-tTCL được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng phôi cho cảm ứng phát sinh phôi lần đầu (từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 16). Những phôi phát sinh này đã phát triển với hình dạng đầy đủ với hình cầu, trái tim, ngư lôi và lá mầm (Hình 3.8r-x) có tiềm năng tái sinh chồi cao. Ngược lại, các phôi đã phát sinh chỉ được quan sát ở dạng hình cầu, hình trái tim và hình ngư lôi đối với gân lá nguyên và cuống lá nguyên. Kết quả này cũng cho thấy rằng tTCL cho phát sinh phôi vô

tính hiệu quả hơn ITCL. Lý do cho sự khác biệt về số lượng phôi được ghi nhận từ mẫu tTCL và ITCL là do số lượng tế bào có khả năng hình thành phôi soma trên mỗi mẫu khác nhau [11]. Sabooni và Shekafandeh (2017) [61] báo cáo rằng tTCL mẫu thử nghiệm cho phát sinh phôi vô tính tối ưu hơn ITCL trong cây Dâu đen.

Trong nghiên cứu này, kết quả cũng cho thấy tổng số phôi phát sinh được ghi nhận ở mẫu mv-tTCL được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng phôi (môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L NAA; 0,5 mg/L TDZ; 30 g/L đường và 8 g/L agar) cao hơn so với mẫu cấy p-tTCL. Bên cạnh đó, các mẫu cấy cuống lá (p) và gân lá (mv) được nuôi cấy trên môi trường này cũng thu được các phôi phát sinh; Tuy nhiên, những kết quả này cho thấy việc cắt mẫu cấy theo chiều ngang (tTCL) hoặc chiều dọc (ITCL) với các cách cắt khác nhau làm tăng hiệu quả tạo phôi soma cũng như hình dạng của phôi soma. Ngoài ra, Ramírez-Mosqueda và cộng sự (2019) [135] đã nghiên cứu cây *Pinus patula* Schl. et Cham cho thấy phát sinh phôi vô tính của mẫu cấy ITCL cao hơn so với mẫu cấy tTCL của mẫu trụ trên lá mầm và trụ dưới lá mầm. Theo Teixeira da Silva và Dobránszki (2019) [136], các mẫu cấy khác nhau có các con đường phát sinh hình thái, cơ quan hoặc phản ứng khác nhau trong cùng điều kiện nuôi cấy. Kết quả cho thấy rằng phát sinh phôi vô tính cao nhất của *A. chinensis* được ghi nhận qua nuôi cấy là mẫu  $\frac{1}{2}$  mv-TCL (98,67%) so với các mv-TCL khác; trong khi đó, không có sự khác biệt đáng kể giữa các mẫu cấy cuống lá  $\frac{1}{2}$  p-ITCL,  $\frac{1}{6}$  p-ITCL,  $\frac{1}{2}$  p-tTCL. Nghiên cứu hiện tại đã chỉ ra rằng quy trình lấy TCL - SEM của gân lá và cuống lá 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, khỏe và cho khả năng tái sinh chồi cao so với các phương pháp khác.

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào từ lâu đã được chứng minh 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 [11]. Các mẫu cấy TCL có đặc điểm chung là mỏng [41]. 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 [41]. Lý do cơ bản của việc ứng dụng một vài tế bào trong hệ thống TCL là vì chúng có mối liên hệ

mật thiết với các tế bào bị tổn thương khi cắt và chất dinh dưỡng cùng với các yếu tố khác bên trong môi trường để kiểm soát sự phát sinh hình thái. Bên cạnh đó, dựa vào đặc tính mỏng nên mẫu dễ dàng hấp thu các chất dinh dưỡng từ môi trường. Hơn nữa, mẫu cũng dễ được định vị cho vùng phản ứng do chỉ có một loại lớp mỏng tế bào, mẫu nuôi cấy cũng đồng nhất và nhanh chóng phản ứng với môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, lượng hormone nội sinh trong mẫu thấp vì thế các chất điều hòa sinh trưởng thực vật dễ tác động lên mẫu. Bên cạnh đó, hệ thống TCL có sự hình thành nhiều loại cấu trúc, kể cả những cấu trúc mới, phôi và các cơ quan sơ khởi được hình thành ở tần số cao (là do số lượng tế bào được cảm ứng phát sinh hình thái cao). Hiện nay trên thế giới chưa có nghiên cứu về kỹ thuật TCL trên đối tượng cây Kiwi, do đó việc ứng dụng thành công kỹ thuật TCL để phát sinh phôi soma cây Kiwi từ nguồn mẫu cuống lá và gân lá trong nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng trong công tác nhân giống vô tính đối tượng cây trồng này.

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

Các phôi có hình dạng lá mầm với chiều cao 2 cm sau khi bổ sung BA và TDZ sau 6-8 tuần nuôi cấy cho thấy kết quả chất điều hoà tăng trưởng BA hiệu quả hơn TDZ trong việc tái sinh chồi và kéo dài chồi của *A. chinensis* (Bảng 3.9) và Hình 3.9a-b). Tổng số chồi, trọng lượng tươi, số lá trên chồi và chiều cao chồi tăng tỷ lệ thuận với sự gia tăng của nồng độ BA từ 0,1 đến 1 mg/L trong khi nồng độ BA cao hơn 1 mg/L cho sự tái sinh chồi giảm đáng kể. Tuy nhiên, các chồi thu được trên môi trường chứa 1 mg/L BA là các chồi lớn và mạnh, khoẻ với các lá màu xanh lục nhạt và được bao phủ bởi lớp lông sáng bóng màu trắng (Hình 3.9b). Hiệu quả tái sinh chồi thấp hơn được quan sát thấy trong môi trường có chứa TDZ (Bảng 3.9). Sự hình thành chồi cao nhất (3,67 chồi) và chồi cao hơn 4 cm (2 chồi) thu được từ nghiệm thức 0,05 và 0,07 mg/L TDZ và thấp hơn so với nghiệm thức 1 mg/L BA. Các chồi được ghi nhận trên môi trường chứa 0,01 và 0,03 mg/L TDZ là các chồi mỏng và nhỏ với lá màu xanh lục nhạt; trong khi các chồi được tái sinh trên môi trường chứa 0,05 và 0,07 mg/L TDZ, các chồi lớn và khoẻ, có lá màu vàng và được bao phủ bởi lớp lông sáng bóng màu trắng (Bảng 3.9).

**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	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 và nhỏ có lá màu 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 và khỏe, 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 khỏe, 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 khỏe, lá màu vàng và được bao phủ bởi lớp lông màu trắng
	0,01	2,33d	1,33cd	3,35bcd	3,33de	3,13d	
TDZ	0,03	2,67cd	1,33cd	2,41d	3,67cde	3,16d	Chồi mỏng và nhỏ có lá màu xanh lục nhạt
	0,05	3,67bc	2,00c	3,90bc	4,33bcd	3,94a	
	0,07	3,67bc	2,00c	2,87d	4,67abc	3,53c	Chồi lớn và khỏe, lá màu vàng và được bao phủ bởi lớp lông màu trắng

\* Những chữ cái khác nhau được hiển thị trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy  $p < 0,05$  trong phép phân tích Duncan.

Theo Akbaş và cộng sự, (2007) [137], cytokinin có hiệu quả cao trong việc nhân chồi và kéo dài chồi của Kiwi vì lượng cytokinin nội sinh trong mẫu cây không đủ để tái sinh chồi mới trong điều kiện *in vitro*. Seelye và cộng sự, (1991) [138] đã ghi nhận các chồi chất lượng cao thu được từ các mẫu lá của *A. deliciosa* trồng trên môi trường có bổ sung 5 - 45  $\mu\text{M}$  TDZ. Trong khi đó, Purohit và cộng sự, (2021) [139] chỉ ra rằng lá *A. deliciosa* được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 9  $\mu\text{M}$  BA thu được các chồi tái sinh sau 5 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, Chen và cộng sự, (2020) [140] đã chỉ ra rằng sự tái sinh chồi được ghi nhận trên thân của *Euryodendron excelsum* được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 5,0  $\mu\text{M}$  BA có hiệu quả cao nhất sau 2 tháng nuôi cấy. 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 (Bảng 3.9).

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

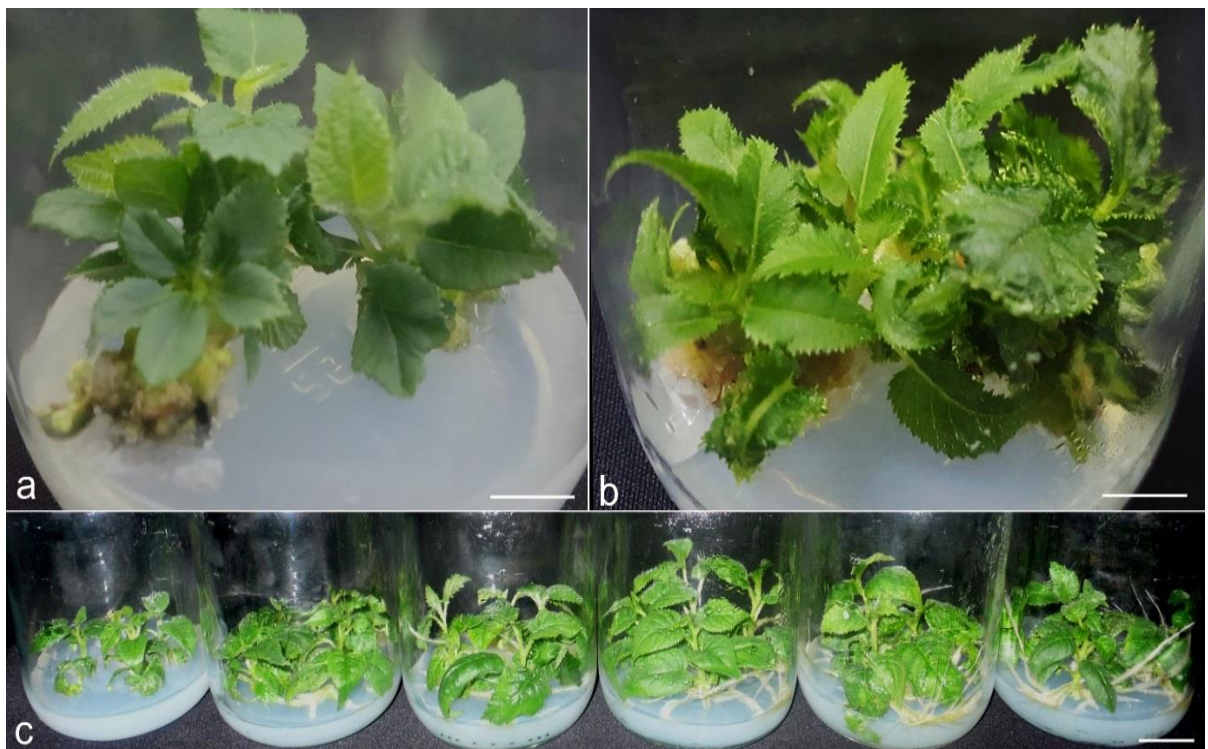
Tất cả các chồi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung hoặc không có NAA đều cho thấy sự ra rễ *in vitro* sau 8 tuần. Tuy nhiên, sự hình thành rễ cũng như chất lượng cây con phụ thuộc vào nồng độ NAA được thêm vào môi trường nuôi cấy (Bảng 3.10). Số rễ trên mỗi cây con và chiều dài rễ tăng tương 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) (Bảng 3.10). 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 Kiwi 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	Khối 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

\* Những chữ cái khác nhau được hiển thị trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy  $p < 0,05$  trong phép phân tích Duncan.

Giai đoạn tạo rễ *in vitro* là giai đoạn quan trọng và cần thiết trong nuôi cấy mô thực vật. Nếu quá trình tạo rễ *in vitro* không hiệu quả, việc thích nghi của cây con với điều kiện *ex vitro* có thể rất khó khăn, làm giảm tỷ lệ sống và hiệu quả nhân giống của cây con [16]. Auxin đóng một vai trò quan trọng trong việc xác định hướng phân chia tế bào trước khi bắt đầu hình thành rễ bên cũng như ảnh hưởng đến tỷ lệ ra rễ, số lượng rễ, chiều dài rễ và sinh khối chồi. Akbaş và cộng sự, (2007) [137] chỉ ra rằng chồi Kiwi trên môi trường MS được bổ sung 1,0 mg/L NAA ra rễ *in vitro* tốt hơn và thích nghi tốt trong nhà kính. Bourrain và cộng sự, (2018) [16] cũng báo cáo rằng 0,5 đến 1 mg/L NAA kích thích sự hình thành rễ ở *A. rubricaulis* Dunn. Ở *D. salicifolia*, sự hình thành rễ được quan sát thấy trên môi trường nuôi cấy bổ sung 0,5 mg/L NAA và 0,3 mg/L axit indole-3-butyric [141]. Bên cạnh đó, NAA ở các nồng độ khác nhau cũng được sử dụng trong việc tạo rễ của chồi *Orthosiphon stamineus* [142], *Vitis vinifera* L. [143], v.v. Những kết quả này đã chứng minh rằng NAA được sử dụng phổ biến khi tạo rễ trong ống nghiệm ở một số cây thân gỗ.



**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 (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/L) (từ trái qua phải).

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

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 và BF (với tỷ lệ 2: 3: 1 về trọng lượng) cho kết quả tối ưu sau 2 và 6 tuần trong nhà kính (Bảng 3.11 và Hình 3.10b-c).

Giá thể mùn được hình thành bằng cách trộn đất hữu cơ gốc và các thành phần hữu cơ khác (mùn vi sinh, đá trân châu, trấu, v.v.); vì vậy mùn là môi trường tốt cho bộ rễ phát triển, giữ cho cây ổn định và giữ ẩm. Ngoài ra, xơ dừa là một loại giá thể rẻ và có khả năng tạo độ thông thoáng tốt cho sự phát triển của cây con. Tuy nhiên, bản thân nó chứa ít chất dinh dưỡng và một mình nó không thể là chất trồng đầy đủ nhưng xơ dừa có khả năng lưu giữ chất dinh dưỡng cao và cải thiện tổng thể chất lượng của đất. Vì vậy, việc phối trộn xơ dừa và đất mùn, phân bón vi sinh giúp bộ rễ cây phát triển tốt hơn [144].

Kết quả cho thấy tỷ lệ hỗn hợp chất nền HM, CF và BF đóng một vai trò quan trọng trong việc thích nghi và phát triển của cây con trong điều kiện nhà kính.





**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 cấy trên môi trường MS có chứa 0,4 mg/L NAA sau 8 tuần nuôi cấy (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)

Các chất nền khác nhau có chứa tro trâu, CF, sợi dương xỉ (sợi Cibolium barometz và cây dương xỉ), rêu sphagnum, và rêu than bùn cũng đã được sử dụng cho các giai đoạn thích nghi và tăng trưởng ở *Paphiopedilum*, *Epidendrum*, v.v. [145,146,147,148]. Tuy nhiên, giá thể phải đáp ứng yêu cầu về độ thoáng khí và khả năng giữ nước (độ ẩm), hàm lượng dinh dưỡng cao. 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 sống (%)	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

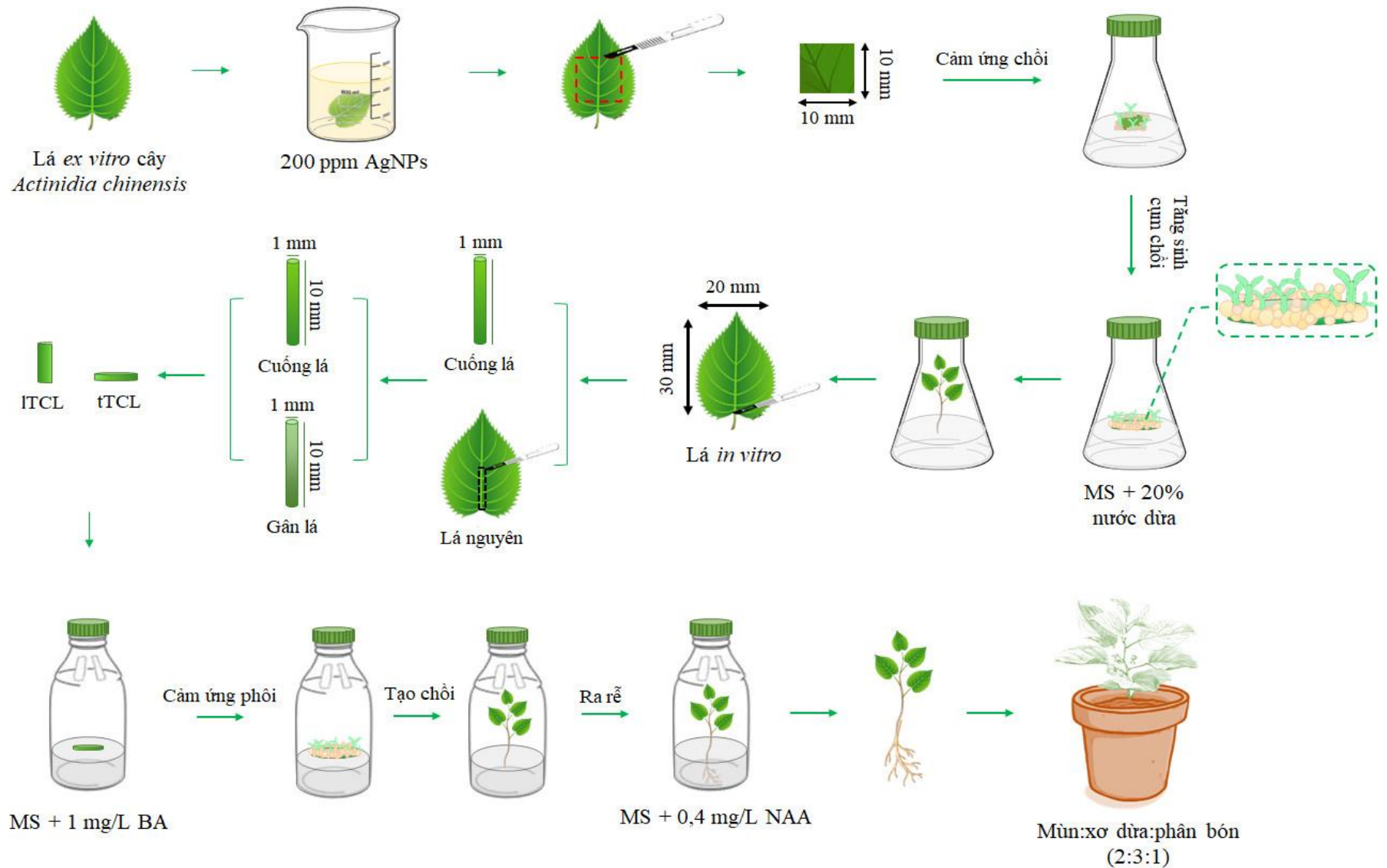
\* Những chữ cái khác nhau được hiển thị trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy  $p < 0,05$  trong phép phân tích Duncan.

**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 cấy gân lá chính; (p-tTCL và p-lTCL) đối với mẫu cấy cuống lá)**

Quy trình vi nhân giống Kiwi thông qua phát sinh phôi vô tính của mẫu TCL (mv-tTCL và mv-lTCL đối với mẫu cấy gân lá chính; p-tTCL và p-lTCL đối với mẫu cấy cuống lá) được mô tả như sau:

Từ các kết quả thực nghiệm của luận án, một 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 cấy gân lá chính; (p-tTCL và p-lTCL) đối với mẫu cấy cuống lá đã được xây dựng (Hình 3.11). Vật liệu được sử dụng ban đầu là lá của cây *Actinidia chinensis ex vitro* sau khi được khử trùng bằng  $AgNO_3$  ở nồng độ 200ppm được cắt với kích thước (0,5 cm × 1 cm) có chứa gân chính và được cấy lên môi trường cảm

ứng mô sẹo. Sau 8 tuần nuôi cấy thì các các cụm chồi có nguồn gốc từ mẫu lá có Màu xanh và ít tổn thương được cắt thành các cụm chồi nhỏ chứa 3 chồi mẫu được chuyển vào môi trường tăng sinh cụm chồi với các dịch chiết hữu cơ được bổ sung gồm dịch chiết khoai tây và chuối xanh, nước dừa, trong đó nồng độ nước dừa 20% (v/v) cho hiệu quả tăng sinh cụm chồi tối ưu hơn các nồng độ khác. Các Mẫu cấy có gân lá chính *in vitro* hình chữ nhật (1 mm × 10 mm) và cuống lá hình chữ nhật (1 mm × 10 mm) từ thí nghiệm trên được cắt lát mỏng theo chiều ngang và chiều dọc (mv-tTCL và mv-lTCL đối với mẫu cấy có gân lá chính; p-tTCL và p-lTCL đối với mẫu cấy ở cuống lá) với các kích thước khác nhau và được cấy vào môi trường cảm ứng phôi có bổ sung 0,02 mg/L NAA; 0,5 mg/L TDZ; 30 g/L đường và 8 g/L agar. Hiệu quả của phát sinh phôi vô tính từ mẫu cấy cuống lá (p-tTCL và p-lTCL) và mẫu cấy gân chính của lá (mv-tTCL và mv-lTCL) được so sánh dựa trên tổng số phôi. Sau đó, các mẫu cấy cho phôi vô tính cao nhất được chọn để tái sinh chồi trên môi trường có bổ sung BA hoặc TDZ. Các chồi 6 tuần tuổi được nuôi cấy trên môi trường MS với các nồng độ NAA khác nhau để tăng khả năng ra rễ và thích nghi của cây con trong ống nghiệm. Các cây con sau 8 tuần nuôi cấy 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 giá thể gồm đất mùn và xơ dừa, phân bón vi sinh và Cây con được đặt trong nhà kính để chăm sóc.



**Hình 3.11.** 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 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-lTCL) đối với mẫu cây gân lá chính; (p-tTCL và p-lTCL) 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 hệ gen cũng như việc đã giải trình tự hệ 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.

## 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 Lệ, 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 Lệ, 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).



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. H. Huang, *Kiwifruit: The Genus Actinidia*, 350p, Academic Press, 2016, UK.
2. A.R. Ferguson, *Kiwifruit (actinidia)*, Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops , 1991, 290, 603-656
3. S. P. Dhakal, *An introduction of Kiwifruit and Cultivation Technology*, Temperate fruits rootstock development centre, 2018, Charikot, Nepal.
4. J. Li, X. Li, and D. Soejarto, *Actinidiaceae*, Z.Wu; P. H. Raven; D. Y. Hong, Flora of China, Ed., Science Press and Missouri Botanical Garden, 2007, 12, Beijing, St. Louis.
5. J. Yue et al., *Kiwifruit Genome Database (KGD): a comprehensive resource for kiwifruit genomics*, Horticulture research, 2020, 7
6. R. He et al., *Genetic diversity of Pseudomonas syringae pv. actinidiae strains from different geographic regions in China*, Phytopathology, 2019, 109 (3), 347-357
7. A.M. Hirsch, R. Testolin, S. Brown, J. Chat, and D. Denay D.D. Bureau, *Embryo rescue from interspecific crosses in the genus Actinidia (kiwifruit)*, Plant cell reports , 2001, 20 (6), 508-516
8. A. R. Ferguson and H. Huang, *Genetic resources of kiwifruit: domestication and breeding*, Horticultural reviews, 2007, 33, 1-121
9. L.G. Fraser and et al., *A gene-rich linkage map in the dioecious species Actinidia chinensis (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes.*, BMC Genomics, 2009, 10, 102
10. D.T. Nhut, T.T.T. Ha, T.T.Huong, H.V. Cuong, and N.P Huy, *Nghiên cứu sự hình thành mô sẹo và tế bào đơn cây Kiwi (Actinidia deliciosa)*, Tạp chí sinh học, 2012, 34 (4), 505-514
11. D.T. Nhut, J.A.T. da Silva, B.V. Le, and K.T.T. Van, *Thin cell layer (TCL) morphogenesis as a powerful tool in woody plant and fruit crop micropropagation and biotechnology, floral genetics and genetic*

- transformation*, Micropropagation of woody trees and fruits 2003, Springer, Dordrech.
12. A.R.Ferguson, *New temperate fruits: Actinidia chinensis and Actinidia deliciosa.*, ASHS Press, Ed.1999, United States, V.A.Alexandria.
  13. G. Cipriani, R. Di Bella, and R. Testolin, *Typing kiwifruit cultivars by means of RAPD markers*, Acta Hortic, 1997, 444, 103-108
  14. K. Patterson, J. Burdon, and N. Lallu, *'HORT16A' Kiwifruit: progress and issues with commercialisation*, Acta Hortic, 2003, 610, 267-273
  15. C. R. Deb and P. K. Gangmei, *In vitro Propagation of Kiwi from Nodal Segments and Development, a New Rooting Technique of Micro Shoots*, Biotechnology, 2019, 18 (2), 64-76
  16. Laurence Bourrain, *In vitro propagation of Actinidia melanandra Franch. and Actinidia rubricaulis Dunn. from shoot tip explants*, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2018, 46 (2), 162-173
  17. Y.J. Wu, M. Xie, and Q.J. Long, *In vitro organogenesis and plant regeneration from leaves of Actinidia eriantha Benth. cv White (kiwifruit)*, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2011, 29 (4), 231-240
  18. Maria Salomé Pais, *Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICs Data Assessment*, Front Plant Sci, 2019, 10, 240
  19. Dương Tấn Nhật, Trần Thị Thu Hà, Trịnh Thị Hương, Hoàng Văn Cường, and Nguyễn Phúc Huy, *Study the formation of callus and single cell of kiwi (Actinidia deliciosa).*, Acad J Biol, 2012, 34 (4), 505-514
  20. H.T. Truong and N.T. Nguyen, *Kết quả nhân giống cây dương đào lá rộng (Actinidia latifolia) và cây Kiwi (Actinidia deliciosa) tại Lâm Đồng, Viet Nam*, Dalat University Journal of Science, 2021, 23-33
  21. Richardson D.P., Ansell J., and Drummond L.N., *The nutritional and health attributes of kiwifruit: a review*, European Journal of Nutrition, 2018, 57 (8), 2659-2676

22. David Yerex and Westbrook Haines, *The Kiwifruit Story*, 1st, Agricultural Publishing Associates , 1983, Masterton, New Zealand.
23. L. Mapu et al., *Kiwifruit industry insights update 2019 - Estment opportunities and challenges*, 2019, ANZ Bank New Zealand Limited
24. Market Intelligence Team, *Industry Report: Kiwi2021*.
25. L.B. Windauer, P. Insausti, F. Biganzoli, R. Benech-Arnold, and M. M. Izaguirre, *Dormancy and germination responses of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)*, *Seeds To Environmental Cues*, 2016, 26 (4), 342-350
26. G.S. Lawes and D.R. Erson, *Influence of temperature and gibberellic acid on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) seed germination*, *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 1980, 8 (3-4), 277-280
27. H. Celik, H. Zenginbal, and M. Özcan, *Enhancing germination of kiwifruit seeds with temperature, medium and gibberellic acid*, *Horticultural Science*, 2006, 33 (1), 39-45
28. H. Zenginbal, M. Ozcan, A. Haznedar, and T. Demir, *Comparisons of methods and time of budding in kiwifruit (*Actinida deliciosa* Chev.)*, *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 2007, 1 (1), 23-28
29. A. Richardson et al., *Early Shoot Development Affects Carbohydrate Supply and Fruit Quality of Red-Fleshed *Actinidia chinensis* var. *chinensis* ‘Zes008’*, *Agronomy*, 2021, 11 (1), 66
30. W. Bao et al., *Validation of micrografting to analyze compatibility, shoot growth, and root formation in micrografts of kiwifruit (*Actinidia* spp.)*, *Plant cell, tissue, and organ culture*, 2020, 140 (1), 209-214
31. Babar Ali, Jawad Ali, and Aziz Khan and Muhammad Basit Ali Shah, *Rooting response of kiwi cuttings by using different concentration of IBA under green house condition*, *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 2018, 16 (1), 26-29
32. M.B. Díaz Hernandez, M.Ciordia Ara, J.C.Garcia Rubio, and J.Garcia Berrios,

- Performance of kiwifruit plant material propagated by different methods*, Acta Hortic, 1997, 444, 155-16
33. E.Rugini & P. Gutiérrez-Pesce, *Micropropagation of kiwifruit (Actinidia spp.)*, Springer, Dordrecht, 2003.
  34. A. Nasib, K. Ali, and S. Khan, *An optimized and improved method for the in vitro propagation of kiwifruit (Actinidia deliciosa) using coconut water*, Pakistan Journal of Botany, 2008, 40 (6), 2355-2360
  35. Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Văn Kết, Dương Tấn Nhựt, and Nguyễn Thị Kim Lý, *Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển cây lan hài hồng (Paphiopedilum delenatii) in vitro*, Tạp chí sinh học, 2014, 36 (1SE), 250-256
  36. P. Srinivasan, H. D. Raja, and R.Tamilvanan, *Effect of coconut water and cytokinins on rapid micropropagation of Ranunculus wallichianus Wight & Arn— a rare and endemic medicinal plant of the Western Ghats, India*, Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2021, 57.
  37. I.Asakura & Y. Hoshino, *Evaluation of plant regeneration ability of different explants and establishment of an efficient regeneration system using immature seeds in Actinidia kolomikta, a cold-hardy kiwifruit relative*, Scientia Horticulturae, 2017, 220, 275-282
  38. H. Saeiaahagh, M. Mousavi, C. Wiedow, H. B. Bassett, and R. Pathirana, *Effect of cytokinins and sucrose concentration on the efficiency of micropropagation of 'Zes006' Actinidia chinensis var. chinensis, a red-fleshed kiwifruit cultivar*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2019, 138 (1), 1-10
  39. A. M.Dattilo et al., *Morphological anomalies in pollen tubes of Actinidia deliciosa (Kiwi) exposed to 50 Hz magnetic field.*, Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics SociSociety, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association, 2005
  40. M.Abdullah et al., *Effect of medium composition, genotype and age of explant*

- on the regeneration of hexaploid plants from endosperm culture of tetraploid kiwiberry (Actinidia arguta).*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2021, 147 (3), 569-582.
41. T.T. Van, *In vitro control of de novo flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues*, Nature, 1973, 246 (5427), 44-45
  42. I. Chłosta, D. Kwolek, E. Sliwinska, G. Góralski, and M. Popielarska-Konieczna, *Sex-Linked Molecular Markers Identify Female Lines in Endosperm-Derived Kiwifruit Callus and in Regenerants*, Plants, 2021, 10 (3), 526
  43. Dương Tấn Nhựt et al., *Sự phát sinh cơ quan và nhân giống vô tính cây kiwi (Actinidia deliciosa) thông qua nuôi cấy mô lá in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2013, 11 (3), 495-503
  44. T.A. Arteta, R. Hameg, M. Landin, PP. Barreal, and Gallego M.E., *Neural networks models as decision-making tool for in vitro proliferation of hardy kiwi*, European Journal of Horticultural Science, 2018, 83 (4), 259-265
  45. Chitta Ranjan Deb and Philip Kadunlung Gangmei, *In vitro Propagation of Kiwi from Nodal Segments and Development, a New Rooting Technique of Micro Shoots*, Biotechnology, 2019, 18 (2), 64-76
  46. Yang Di et al., *Micropropagation in vitro of Actinidia chinensis 'Yangshi Jinhong 50'*, Guangxi Zhiwu / Guihaia, 2018, 38 (12), 1667-1674
  47. Maryam Maghdouri, Mahmood Ghasemnezhad, Babak Rabie, and Morteza Golmohammadi and Arif Atak, *Optimizing Seed Germination and Seedling Growth in Different Kiwifruit Genotypes*, Horticulturae, 2021, 7 (9), 314
  48. Marino Grazia, Muzzi Enrico, Marzadori Claudio, Ciavatta Claudio, Tavoni Marta, Di Giosia Matteo, Calvaresi Matteo, Falini Giuseppe, Zerbetto Francesco and Toselli Moreno Baldi Elena, *Effectiveness of synthetic calcite doped with Fe-EDDHA as a slow-release Fe source: In-vitro experiment on kiwifruit (Actinidia chinensis var. deliciosa) plants*, Agriculture, 2019, 4 (1), 127-135

49. J. A. Teixeira da Silva and J. Dobránszki, *Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration*, Journal of Plant Growth Regulation, 2013, 32, 922-943
50. Jaime A. Teixeira da Silva, *The in vitro culture of Ceropogia species, important medicinal and ornamental plants: a review*, Environmental and Experimental Biology, 2015, 13, 1-11
51. C.V. da Silva et al., *Organogenesis from root explants of commercial populations of Passiflora edulis Sims and a wild passionfruit species, P. cincinnata Masters*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 107 (3), 407-416
52. Nhut D.T., Hai N.T., and Phan M.X., *A highly efficient protocol for micropropagation of Begonia tuberosus*, Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, 2010, Humana Press.
53. Jaime A. Teixeira da Silva and Seiichi Fukai, *Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control*, Asian Journal of Plant Sciences, 2003, 2 (6), 505-514
54. G. Góralski, M. Popielarska, H. Ślesak, D. Siwińska, and M. Batycka, *Organogenesis in endosperm of Actinidia deliciosa cv. Hayward cultured in vitro*, Acta Biol Crac Ser Bot, 2005, 47 (2), 121-128
55. Janya W. and Kouzou K., *Research on tissue culture and reproductive capacity of Actinidia chinensis*, J For Res, 1998, 11 (6), 635-639
56. R.J. Gautheret, *La culture des tissus végétaux* 1960.
57. D. Brossard-Chriqui and B.K. Tripathi, *Comparison of morphogenetic ability in fertile and sterile stamens of A. chinensis cultured in vitro*, Can J Bo, 1984, 62 (9), 1940-1946
58. W. Takahashi et al., *Plant regeneration in Actinidia polygama Miq. by leaf, stem, and petiole culture with zeatin, and from stem-derived calli on low-sucrose medium*, Journal of Forest Research, 2004, 9 (1), 85-88
59. H.W. Huang, A.R. Ferguson R. Testolin, *The Kiwifruit Genome. Cham,*

Switzerland:, Springer, 2016, Cham, Switzerland.

60. H. T. Tung et al., *Silver nanoparticles enhanced efficiency of explant surface disinfection and somatic embryogenesis in Begonia tuberosa via thin cell layer culture.*, Vietnam Journal of Biotechnology, 2021, 19 (2), 337-347
61. N. Sabooni and A. Shekafandeh, *Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique*, Plant Cell Tiss. Org. Cult, 2017, 130 (2), 313-321
62. H. Y. Tu et al., *Induction and identification of tetraploid Hedychium coronarium through thin cell layer culture*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2018, 135 (3), 395-406
63. M. Ekmekçigil, M. Bayraktar, Ö. Akkuş, and A. Gürel, *High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in Cattleya forbesii Lindl.*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) , 2019, 136, 451–464
64. A. Gharaghani and A. Alemzadeh, *Indirect regeneration of Ficus carica by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR.* 2020.
65. R. Dhir and G. S. Shekhawat, *Ecophysiology and biochemical studies of Ceropogia bulbosa Roxb.: a threatened medicinal succulent*, Acta Physiologiae Plantarum , 2014, 36 (6), 1335–1343
66. Teixeira da Silva, *Filter paper inhibits in vitro protocorm-like body formation in hybrid Cymbidium and reduces synseed germination, but buffers the negative impact of antibiotics*, Biological lett. IOLOGICAL LETT., 2014, 51 (1), 47-54
67. S.M. Jain, P.K. Gupta, and R.J. Newton (Eds.), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Springer Science & Business Media, 2013, 6 (67)
68. E.G. Maheswara and G. Williams, *Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as on embryogenic group*, Annals of botany, 1986, 57 (4), 443-462

69. Ledezma-Rodríguez M, Avilez- Montalvo RN, Juárez-Gómez Y.L. Méndez-Hernández HA, Skeete A., Avilez-Montalvo J., De-la-Peña C., and Loyola-Vargas V.M., *Signaling overview of plant somatic embryogenesis*, *Frontiers in Plant Science* , 2019, 10, 1-42
70. R. Moltrasio et al., *Alfalfa (Medicago sativa) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 77, 119-124
71. J. Šamaj, F. Baluska, A. Pretová, and D. Volkmann, *Auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency*, *Planta*, 2002, 214, 505-509
72. A. Feher, T.P. Pasternak, and D. Dudits, *Transition of somatic plant cells to an embryogenic state*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 74, 201-228
73. M. Zhang et al., *Direct and indirect somatic embryogenesis induction in Camellia oleifera Abel*, *Frontiers in plant science*, 2021, 12, 451
74. M. M. Oliveira and M. S. S. Pais, *Somatic embryogenesis in leaves and leaf-derived protoplasts of Actinidia deliciosa var. deliciosa cv. Hayward (kiwifruit)*, *Plant Cell Reports* , 1992, 11 (5), 314-317
75. T. Wang and A.P. Gleave, *Applications of biotechnology in kiwifruit (Actinidia)*, *Innovations in biotechnology*, 2012.
76. Elif Aylin Ozudogru and Maurizio Lambardi, *Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woodyplants*, 2016, 537-550
77. Y. Guan, S. G. Li, X. F. Fan, and Z. H. Su, *Application of somatic embryogenesis in woody plants*, *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7, 938
78. Pooja Asthana, Manoj K.Rai, and UmaJaiswal, *Somatic embryogenesis from sepal explants in Sapindus trifoliatus, a plant valuable in herbal soap industry*, *Industrial Crops and Products*, 2017, 100, 228-235
79. Amrita Ghosh, Abir U. Igamberdiev, and Samir C. Debnath, *Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue*



- cultures of half-high blueberry plants*, Scientific Reports , 2018, 8, 16978
80. Manoj Kumar Tripathi et al., *Optimization of Different Factors for Initiation of Somatic Embryogenesis in Suspension Cultures in Sandalwood (Santalum album L.)*, Horticulturae, 2021, 7 (5), 118
  81. A. Mikula et al., *The Origin of the Cyathea delgadii Sternb. Somatic Embryos Is Determined by the Developmental State of Donor Tissue and Mutual Balance of Selected Metabolites*, Cells, 2021, 10 (6), 1388
  82. H.M. Aboshama, G.A. El-Sayed, and N.I. Al-Dremly, *Somatic embryogenesis induction of litchi (Litchi chinensis Sonn.) from leaves of mature trees* , Journal of Scientific and Innovative Research, 2018, 7 (3), 78-84
  83. Muhammad Adil, Dong Il Kang, and Byoung Ryong Jeong, *Data on recurrent somatic embryogenesis and in vitro micropropagation of Cnidium officinale Makino*, Scienc Direct, 2018, 19, 2311-2314
  84. X. M. Zhao, Y. J. Lian, Z. L. Jin, X. J. Zhang, and S. J. Fan, *Shoot organogenesis and somatic embryogenesis in leaf tissue of Pulsatilla tongkangensis Y.N. Lee & T.C. Lee*, Plant Biotechnology Reports, 2022, 1-12
  85. Hebert Paul D.N and et al, *Biological identifications through DNA barcodes*, Serie B: Biological Sciences, 2005, 270.
  86. A. C. Pires and L. Marinoni, *DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies*, Biota Neotropica, 2010, 10 (2)
  87. J. Yu, J.H. Xue, and S.L. Zhou, *New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms*, Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49 (3), 176-181
  88. CBOL Plant Working Group, *A. DNA barcode for land plants*, Proc. Natl. Acad. Sci., 2009, 106, 12794-12797, USA
  89. China Plant BOL Group et al., *Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the*

- core barcode for seed plants*, Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108 (49), 19641-6
90. Bao Weihong and Dawei Li and Xinwei Li, *DNA barcoding of Actinidia (Actinidiaceae) using internal transcribed spacer, matK, rbcL and trnH-psbA, and its taxonomic implication*, New Zealand Journal of Botany, 2018, 56 (4), 360-371
  91. G.N. Feliner and J.A. Rosselló, (2007). *Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants*, Molecular phylogenetics and evolution, 2007, 44 (2), 911-919
  92. A. Atak, B. Aydin, and K. Abdurrahim Kahraman, *Sex determination of kiwifruit seedlings with molecular markers*, II International Symposium on Biotechnology of Fruit Species, 2012, 1048, 197-203
  93. M. Ismail et al., *Development of DNA barcodes for selected Acacia species by using rbcL and matK DNA markers.*, Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27 (12), 3735-3742
  94. R.J. Pannell, *Plant sex determination*, Current Biology, 2017, 27 (5), R191-R197
  95. Bernadine C. Strik and Amanda J. Davis, *Growing Kiwifruit, A Guide to Kiwiberries and Fuzzy Kiwifruit for Pacific Northwest Producers*, 2021.
  96. S. Huang et al, *Draft genome of the kiwifruit Actinidia chinensis*, Nature Communications , 2013, 4, 2640
  97. T. Akagi et al., *A Y-Encoded Suppressor of Feminization Arose via Lineage-Specific Duplication of a Cytokinin Response Regulator in Kiwifruit*, Plant Cell, 2018, 30, 780-795
  98. K. S. Burgess et al., *Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL+matK DNA barcode*, Methods in Ecology and Evolution , 2011, 2 (4), 333-340
  99. A. Atak, B. Aydin, and K. Abdurrahim Kahraman, *Sex determination of*

- kiwifruit seedlings with molecular markers*, Acta hort, 2014, 1048 (ISHS)
100. S. Feng et al., *Molecular identification of species of Physalis (Solanaceae) using a candidate DNA barcode: the chloroplast psbA–trnH intergenic region*, Genome, 2018 (<https://doi.org/10.1139/gen-2017-0115>)
  101. Q. Xie et al., *Morphology and Molecular Identification of Twelve Commercial Varieties of Kiwifruit*, Molecules, 2019, 24 (5), 888
  102. T. Chae, A. Harkess, and R.C. Moore, *Sex-linked gene expression and the emergence of hermaphrodites in Carica papaya*, American Journal of Botany, 2021, 108 (6)
  103. Zhaobin Jing and Hongqi Fu, *Identification of the basic leucine zipper transcription factor and analysis of expression responses to biotic and abiotic stresses in kiwifruit (Actinidia Lindl.)*, European Journal of Horticultural Science, 2018, 83 (4), 212-223
  104. Park Yeo Ok et al, *Efficiency of Sex-linked Molecular Markers for the Selection of Seedlings Bearing Male Flowers in Persimmon (Diospyros kaki Thunb.)*, Journal of Life Science, 2019, 30 (3), 239-249
  105. I. Hale, A.T.O. Gustafson, and H. Melo, *Sex-linked molecular markers for Actinidia arguta and A. kolomikta*, European Journal of Horticultural Science, 2018, 83 (4), 236-246
  106. R.L., Peterson, C.A. Peterson, and L.H. Melville, *Teaching Plant Anatomy through Creative Laboratory Exercises Ottawa*, 164p, 2008, ON NRC Press, Ottawa, Canada.
  107. H.N. Chau et al., *Some results in manufacturing of nano silver and investigation of its application for disinfection*, Adv Nat Sci, 2008, 9, 241-248
  108. T. Takamiya et al., *Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse groups, Dendrobium section Dendrobium and allies*, AoB Plants, 2014, 6, plu045
  109. H. Topik, T. Yukawa, and I. Motomi, *Molecular phylogenetics of subtribe*

- Aeridinae (Orchidaceae): insights from plastid matK and nuclear ribosomal ITS sequences*, Journal of plant research, 2005, 118 (4), 271-284
110. T. Takamiya et al., *Identification of Dendrobium species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2011, 34 (5), 779-782
111. J.J Doyle and J.L. Doyle, *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*, Phytochemical Bulletin, 1987, 19, 11-15
112. K.S. Burgess et al., *Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL + matK DNA barcode*, Methods Ecol Evol, 2011, 2 (4), 333-340
113. J. Shaw, E. B. Lickey, E. E. Schilling, and R. L. Small, *Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III*, American Journal of Botany, 2007, 94, 275–288
114. Azekas A.J. et al., *Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers?*, Mol Ecol Res, 2009, 9 (1), 130-139
115. L.T. Dunning and V. Savolainen, *Broad-scale amplification of matk for DNA barcoding plants, a technical note*, Bot J Linn Soc, 2010, 164 (1), 1-9
116. G.N. Feliner and J.A. Rosselló, *Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants*, Mol Phylogenet Evol, 2007, 44 (2), 911-919
117. F.A., Isikalan, C., Namli, S., and Basaran, D. Akbas, *Micropropagation of kiwi Actinidia deliciosa*, Int. J. Agric. Biol., 2007, 52, 146-148
118. J.A. Teixeira da Silva and J. Dobránszki, *The plant growth correction factor. I. The hypothetical and philosophical basis*, Int. J. Plant Dev. Biol, 2011, 5, 73-74
119. D.B. Duncan, *Multiple range and multiple F test*, Biometrics, 1955, 11, 1-42

120. L. Li, C.H, Zhong, D.W, and Li, *Diversity of Pseudomonas syringae pv. actinidiae causing bacterial canker of kiwifruit in China.* , Proceedings of 1st International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit (Psa), 2013, Mt Maunganui, New Zealand.
121. J. Chat, L. Chalak, and R.J. Petit, *Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit*, Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99 (1), 314-322
122. S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., & Huang, L Xu, *Evaluation of the DNA barcodes in Dendrobium (Orchidaceae) from mainland Asia*, PloS one, 2015, 10 (1), e0115168
123. C. Y., Wang, F. Y., Yan, H. F., Hao, G., Hu, C. M., & Ge, X. J. Zhang, *Testing DNA barcoding in closely related groups of Lysimachia L.(Myrsinaceae)*, Molecular Ecology Resources, 2012, 12 (1), 98-108
124. T. Akagi et al., *Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit.* , Nat, Plants, 2019, 5, 801-809
125. E. L., Mohasseb, H. A. A., Al-Khateeb, A. A., Al-Khateeb, S. A., Chowdhury, K., El-Shemy, H. A., & Aldaej, M. I. Mohei, *Identification and sequencing of Date-SRY Gene: A novel tool for sex determination of date palm (Phoenix dactylifera L.)*, Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26 (3), 514-523
126. H. T. Tung et al., *Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum*, Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2021, 57 (6), 897-906
127. Y. He et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of Alpinia katsumadai, and their antioxidant, cytotoxicity and antibacterial activities*, RSC advances, 2017, 7 (63), 39842-39851
128. F.C. Chen and Chen, *Effects of salt strength and organic additives on the in vitro growth of protocorm like bodies and plantlets of Oncidium Gower Ramsey*, J Chin Soc Hort Sci, 1998, 44 (4), 403-412

129. Dương Tấn Nhựt et al., *Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong nhân giống vô tính cây african violet (Saintpaulia ionantha H. Wendl.)*, Tạp chí công nghệ sinh học, 2018, 16 (1), 87-97
130. Vu Thi Mo et al., *Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from the seaweed Kappaphycus striatus*, Acta Physiologiae Plantarum, 2020, 44, 112
131. H. T. Tung et al., *Silver nanoparticles improved explant disinfection; in vitro growth; runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (Fragaria × ananassa)*, Plant Cell; Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2021, 145 (2), 393-403
132. M. Do Cuong et al., *Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of Panax vietnamensis—a valuable medicinal plant*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2021, 146 (3), 577-588
133. M.O. Islam, S. Matsui, and S. Ichihashi, *Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in Cattleya seedlings*, Lindleyana, 2000, 15 (2), 81-88
134. J. Arditti and C.R. Harrison, *Vitamin requirements and metabolism in orchids*, J. Arditti, Cornell University Press, 1977, New York.
135. M.A. Ramírez-Mosqueda et al., *Effect of the thin cell layer technique in the induction of somatic embryos in Pinus patula Schl et Cham.*, J. For. Res. , 2019, 30 (4), 1535-1539
136. J. Teixeira da Silva and J. Dobránszki, *Recent advances and novelties in the thin cell layer-based plant biotechnology—a mini-review*, Biotechnologia, 2019, 100 (1), 89-96
137. F. A. Akbaş, C. Işikalan, S. Ü. R. E. Y. Y. A. Namli, and D. A. V. U. T Başaran, *Micropropagation of kiwifruit (Actinidia deliciosa)*, International journal of agriculture & biology, 2007, 9 (3), 489-493
138. P.J. Manson, W.P. Snelgar, and R.J. Seelye, *Relationships between timing of cane tipping and yield of kiwifruit (Actinidia deliciosa)*, J. Hortic. Sci, 1991, 66

- (4), 415-422
139. S. Purohit, J.M. Rawat, V.K. Pathak, D.K. Singh, and B. Rawat, *A hydroponic-based efficient hardening protocol for in vitro raised commercial kiwifruit (Actinidia deliciosa)*, In Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 2021, 57 (3), 541-550
  140. S. Chen et al., *Axillary shoot proliferation and plant regeneration in Euryodendron excelsum HT Chang, a critically endangered species endemic to China*, Scientific Reports, 2020, 10, 14402
  141. V. Rodrigues et al., *Adventitious root cultures of Decalepis salicifolia for the production of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde, a vanillin isomer flavor metabolite.*, App. Microbiol. Biotechnol , 2021, 105 (8), 3087-3099
  142. L.D. Yoong, K.T. Kwame, and L. Chaw, *Effects of different combination concentrations of BAP and NAA on types of explants and its regeneration.* , Int. J. Agric. Sci., 2019, 9 (1), 001-005
  143. F. Kumsa and T. Feyissa, *In vitro regeneration of two grapevine (Vitis vinifera L.) varieties from leaf explants.* , Afr. J. Biotechnol, 2019, 18 (4), 92-100
  144. P. Shrestha, K. Bellitürk, and J.H. Görres, *Phytoremediation of heavy metal-contaminated soil by switchgrass: a comparative study utilizing different composts and coir fiber on pollution remediation, plant productivity, and nutrient leaching*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, 16 (7), 1261
  145. L.W. Zettler, S.B. Poulter, K.I. McDonald, and S.L. Stewart, *Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (Epidendrum nocturnum) with a mycorrhizal fungus.* , HortScience, 2007, 42 (1), 135-139
  146. N.G. Chyuam-Yih, N.M. Saleh, and F.Q. Zaman, *In vitro multiplication of the rare and endangered slipper orchid, Paphiopedilum rothschildianum (Orchidaceae)*, Afr. J. Biotechnol, 2010, 9 (14), 2062-2068
  147. N. Wattanapan, C. Nualsri, and U. Meesawat, *In vitro propagation through transverse thin cell layer (tTCL) culture system of lady's slipper orchid: Paphiopedilum callosum var. sublaeve.* , Songklanakarin J. Sci. Technol. ,

2018, 40 (2), 306-313

148. V.Q. Luan et al., *Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in Paphiopedilum species*, *Sci. Hortic.*, 2019, 256, 108468



## PHỤ LỤC

**Phụ lục 1.** Một số đặc tính hình thái của 20 mẫu Kiwi được sử dụng trong nghiên cứu.

Ký hiệu	Đặc điểm lá				
	Đỉnh lá	Hình dạng	Mép lá	Cuống lá	Mặt phẳng
<i>Actinidia 1</i>	Nhọn dài.	Lá: Dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 10-11 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp, không đối xứng, bề mặt nhẵn, không lông.	Không có răng cưa, có ít lông	Màu đỏ sẫm, nhiều lông. Dài: 2 cm. Đường kính: 3 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tim.
<i>Actinidia 2</i>		Lá: Mỏng, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp, không đối xứng; bề mặt có lông nhưng rất ít.		Màu đỏ sẫm, nhiều lông. Dài 2cm. Đường kính: 3mm.	
<i>Actinidia 3</i>	Nhọn ngắn.	Lá: Mỏng, mặt trên màu xanh hơi tối và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 9-11 cm và rộng 12-14 cm. Gân lá: Thứ cấp, không đối xứng, bề mặt có lông nhưng rất ít; mép lá có lông ngắn.		Màu đỏ nhạt, nhiều lông Dài: 2,5 cm. Đường kính: 3 mm.	
<i>Actinidia 4</i>	Hơi tù.	Lá: Mỏng, mặt trên màu xanh hơi tối và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 9-11 cm và rộng 12-14 cm. Gân lá: Thứ cấp, không đối xứng; bề mặt có lông nhưng rất ít; mép lá có lông ngắn.		Màu xanh nhạt, không có lông Dài: 2,5 cm. Đường kính: 3 mm.	
<i>Actinidia 5</i>	Nhọn bằng.	Lá: Mỏng, mặt trên màu xanh hơi tối và mặt dưới có		Màu xanh nhạt,	

Ký hiệu	Đặc điểm lá				
	Đỉnh lá	Hình dạng	Mép lá	Cuống lá	Mặt phẳng
		màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 8 -10 cm và rộng 12-14 cm. Gân lá: Thứ cấp, không đối xứng; bề mặt nhám không có lông; mép lá có lông ngắn.		không có lông Dài: 4 cm, Đường kính: 2,5 mm	rộng.
<i>Actinidia 6</i>	Nhọn dài.	Lá: Mỏng, mặt trên có màu xanh sáng và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt có lông nhưng rất ít.	Có răng cưa.	Màu xanh, không có lông. Dài: 1cm. Đường kính: 3 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tim.
<i>Actinidia 7</i>	Tù, tròn đều, đối xứng.	Lá: Dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-14 cm và rộng 9-11 cm. Gân lá: Thứ cấp, không đối xứng hai bên và bề mặt nhám không có lông.		Màu đỏ sẫm, không có lông. Dài: 3 cm. Đường kính: 1,5 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tim.
<i>Actinidia 8</i>	Nhọn tròn đều, đối xứng.	Lá: Dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám không có lông.	Không có răng cưa, có ít lông.	Màu xanh đậm và không có lông. Dài: 1,5 cm. Đường kính: 2 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tròn.
<i>Actinidia 9</i>	Tù, tròn dài, đối xứng.	Lá: Mỏng, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp, không đối xứng hai bên; bề mặt có ít lông.		Màu xanh và không có lông. Dài: 1,5 cm. Đường kính: 3 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tim.

Ký hiệu	Đặc điểm lá				
	Đỉnh lá	Hình dạng	Mép lá	Cuống lá	Mặt phẳng
<i>Actinidia 10</i>	Nhọn dài.	Lá: Dày, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp, đối xứng hai bên, bề mặt có ít lông.		Màu xanh đậm, không có lông. Dài: 2 cm. Đường kính: 3 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tim.
<i>Actinidia 11</i>	Nhọn tròn đều, đối xứng.	Lá: hơi dày, mặt trên có màu xanh hơi tối và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám không có lông.		Có màu xanh, không có lông. Dài: 2,7 cm. Đường kính: 1,5 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tròn.
<i>Actinidia 12</i>	Nhọn tròn, đối xứng.	Lá: Hơi dày, mặt trên của lá có màu xanh và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám không có lông.		Màu xanh, không có lông. Dài: 2,7 cm. Đường kính: 1,5 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tim.
<i>Actinidia 13</i>	Lõm tròn đều, đối xứng.	Lá: Dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp, không đối xứng hai bên, bề mặt ít lông.		Màu xanh và không có lông. Dài: 2 cm. Đường kính: 3 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tim.
<i>Actinidia 14</i>	Nhọn tròn, đối xứng.	Lá: Hơi dày, mặt trên của lá có màu xanh tố và mặt dưới có màu xanh xám, với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám không có lông.		Màu xanh, không có lông. Dài: 2 cm. Đường kính: 2 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tròn.

Ký hiệu	Đặc điểm lá				
	Đỉnh lá	Hình dạng	Mép lá	Cuống lá	Mặt phẳng
<i>Actinidia 15</i>	Nhọn tù, đối xứng.	Lá: Dày, mặt trên của lá có màu xanh sáng và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám không có lông.		Màu xanh, có lông ngắn. Dài: 1 cm. Đường kính: 3 mm.	Hình oval dài, có dạng hình tim.
<i>Actinidia 16</i>	Nhọn tròn, đối xứng.	Lá: Hơi dày, mặt trên có màu xanh hơi tối và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 11-13 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám không có lông.		Màu xanh đậm, không có lông. Dài: 1,5 cm. Đường kính: 2 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tròn.
<i>Actinidia 17</i>	Nhọn dài.	Lá: Dày, mặt trên có màu xanh đậm và tối và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 10-11 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhẵn không có lông.		Màu đỏ sẫm, nhiều lông. Dài: 2 cm. Đường kính: 3 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tim.
<i>Actinidia 18</i>	Nhọn dài, đối xứng.	Lá: Mỏng, mặt trên có màu xanh hơi tối. Mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 13-15 cm và rộng 9-11 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám không có lông.	Có răng cưa.	Màu đỏ đậm, có nhiều lông. Dài: 1,7 cm. Đường kính: 2,5 mm.	Hình oval dài, có dạng hình tròn.
<i>Actinidia 19</i>	Nhọn tròn, đối xứng.	Lá: Hơi dày, mặt trên có màu xanh hơi tối và mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng. Phiến lá: Dài 9-11 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám	Không có răng cưa, có ít lông.	Màu đỏ đậm, nhiều lông. Dài: 3 cm. Đường kính: 2,6 mm.	Hình oval rộng, có dạng hình tròn.

Ký hiệu	Đặc điểm lá				
	Đỉnh lá	Hình dạng	Mép lá	Cuống lá	Mặt phẳng
		không có lông.			
<i>Actinidia</i> 20	Nhọn tròn, đối xứng.	Lá: Hơi dày, mặt trên có màu xanh hơi sáng. Mặt dưới có màu xanh xám với những sợi lông màu trắng Phiến lá: Dài 9 -10 cm và rộng 11-14 cm. Gân lá: Thứ cấp không đối xứng hai bên; bề mặt nhám không có lông.	Không có răng cưa, có ít lông.	Màu đỏ đậm, nhiều lông. Dài: 0,5 cm. Đường kính: 2 mm.	

**Phụ lục 2.** Ký hiệu 8 mẫu Kiwi được sử dụng để xác định giới tính

Tên mẫu	Tên loài	Ký hiệu
<i>Actinidia</i> 1	<i>Actinidia deliosa</i>	1
<i>Actinidia</i> 2	<i>Actinidia latifolia</i>	2
<i>Actinidia</i> 5	<i>Actinidia chinensis</i>	3
<i>Actinidia</i> 7	<i>Actinidia chinensis</i>	4
<i>Actinidia</i> 8	<i>Actinidia chinensis</i>	5
<i>Actinidia</i> 9	<i>Actinidia chinensis</i>	6
<i>Actinidia</i> 10	<i>Actinidia chinensis</i>	7
<i>Actinidia</i> 13	<i>Actinidia chinensis</i>	8

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

**Phụ lục 3.** Kết quả ly trích DNA tổng số

Tên mẫu	Nồng độ DNA ng/μl	OD 260/280
Actinidia 1	267	1,97
Actinidia 2	280	1,94
Actinidia 3	139	2,02

Actinidia 4	185	2,04
Actinidia 5	268	1,96
Actinidia 6	140	1,89
Actinidia 7	178	2,01
Actinidia 8	187	2,03
Actinidia 9	184,5	2,01
Actinidia 10	113,8	1,85
Actinidia 11	114,3	1,87
Actinidia 12	130,5	1,98
Actinidia 13	159	2,04
Actinidia 14	156,8	1,85
Actinidia 15	191,7	1,98
Actinidia 16	130,6	1,86
Actinidia 17	115,8	1,97
Actinidia 18	163,5	1,87
Actinidia 19	162,7	1,98
Actinidia 20	205,4	1,92

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

**Phụ lục 4.** Vị trí sai khác của các cây Kiwi dựa trên trình tự DNA vùng *rbcL*

STT	Mẫu	Vị trí biến đổi						
		47	272	388	640	661	673	675
1	<i>Actinidia 2</i>	T	G	A	G	T	T	A
2	<i>Actinidia 3</i>	T	G	A	G	T	T	A
3	<i>Actinidia 4</i>	T	G	A	G	T	T	A

STT	Mẫu	Vị trí biến đổi						
		47	272	388	640	661	673	675
4	<i>Actinidia 5</i>	T	G	A	G	T	T	A
5	<i>Actinidia 10</i>	T	A	G	A	A	T	A
6	<i>Actinidia 13</i>	T	A	G	A	A	T	A
7	<i>Actinidia 14</i>	T	A	A	A	A	T	A
8	<i>Actinidia 15</i>	T	A	A	G	A	T	C
9	<i>Actinidia 16</i>	T	G	A	G	A	T	A
10	<i>Actinidia 20</i>	T	A	A	G	A	T	A
11	<i>Actinidia 1</i>	A	G	A	G	A	T	A
12	<i>Actinidia 6</i>	A	G	A	G	A	C	A
13	<i>Actinidia 7</i>	A	G	A	G	A	C	A
14	<i>Actinidia 8</i>	A	G	A	G	A	A	A
15	<i>Actinidia 9</i>	A	G	A	G	A	A	A
16	<i>Actinidia 11</i>	A	G	A	G	A	T	A
17	<i>Actinidia 12</i>	A	G	A	G	A	T	A
18	<i>Actinidia 18</i>	A	G	A	G	A	T	A
19	<i>Actinidia 19</i>	A	G	A	G	A	T	A

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

**Phụ lục 5.** Vị trí sai khác của các mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA vùng *matK*

TT	Mẫu	Vị trí sai khác						
		73	304	334	457	492	535	555
01	<i>Actinidia 2</i>	G	G	C	G	T	A	G

TT	Mẫu	Vị trí sai khác						
		73	304	334	457	492	535	555
02	<i>Actinidia 3</i>	T	C	A	G	T	A	A
03	<i>Actinidia 5</i>	T	C	A	G	T	A	A
04	<i>Actinidia 1</i>	T	C	A	A	A	G	A
05	<i>Actinidia 6</i>	T	C	A	A	A	G	A
06	<i>Actinidia 7</i>	T	C	A	A	A	G	A
07	<i>Actinidia 8</i>	T	C	A	A	A	G	A
08	<i>Actinidia 9</i>	T	C	A	-	A	G	A
09	<i>Actinidia 10</i>	T	C	A	-	A	G	A
10	<i>Actinidia 12</i>	T	C	A	-	A	G	A
11	<i>Actinidia 13</i>	T	C	A	-	A	G	A
12	<i>Actinidia 14</i>	T	C	A	-	A	G	A
13	<i>Actinidia 15</i>	T	C	A	-	A	G	A
14	<i>Actinidia 18</i>	T	C	A	-	A	G	A
15	<i>Actinidia 19</i>	T	C	A	-	A	G	A
16	<i>Actinidia 20</i>	T	C	A	-	A	G	A

3.1.2.3. Kết quả phân tích sự khác biệt giữa các trình tự ITS của 15 mẫu Kiwi thu thập

**Phụ lục 6.** Vị trí sai khác của các mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA vùng ITS

Mẫu	Vị trí sai khác														
	37	40	48	49	50	57	73	74	79	80	81	83	86	92	93
<i>Actinidia 2</i>	T	A	A	C	T	C	C	T	C	T	C	C	A	A	A
<i>Actinidia 3</i>	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
<i>Actinidia 5</i>	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A



<i>Actinidia 9</i>	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	T	G
<i>Actinidia 17</i>	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
<i>Actinidia 1</i>	T	A	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
<i>Actinidia 6</i>	T	A	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
<i>Actinidia 7</i>	T	A	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
<i>Actinidia 8</i>	T	A	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
<i>Actinidia 12</i>	T	A	C	T	A	T	C	T	T	T	C	T	G	-	A
<i>Actinidia 13</i>	T	A	C	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
<i>Actinidia 15</i>	T	A	C	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
<i>Actinidia 19</i>	T	A	C	T	A	T	C	T	T	T	C	T	G	-	A
<i>Actinidia 20</i>	T	A	C	T	A	T	C	T	T	T	C	T	G	-	A
<i>Actinidia 10</i>	G	G	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
<b>Mẫu</b>	<b>Vị trí sai khác</b>														
	97	109	110	114	117	153	164	177	179	182	189	198	210	220	221
<i>Actinidia 2</i>	G	G	G	C	T	C	G	C	A	C	C	G	G	C	A
<i>Actinidia 3</i>	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	A
<i>Actinidia 5</i>	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	A
<i>Actinidia 9</i>	T	A	G	A	C	A	T	T	G	C	C	G	T	C	A
<i>Actinidia 17</i>	T	A	G	A	C	A	T	T	G	C	C	G	G	C	T
<i>Actinidia 1</i>	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	T
<i>Actinidia 6</i>	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	T
<i>Actinidia 7</i>	T	A	G	A	T	C	T	T	A	C	C	G	G	C	T
<i>Actinidia 8</i>	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	T
<i>Actinidia 12</i>	T	A	A	A	C	C	T	T	A	C	T	A	G	C	A
<i>Actinidia 13</i>	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	A
<i>Actinidia 15</i>	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	A

<i>Actinidia 19</i>	T	A	A	A	C	C	T	T	A	C	T	A	G	C	A
<i>Actinidia 20</i>	T	A	A	A	C	C	T	T	A	C	T	A	G	C	A
<i>Actinidia 10</i>	T	A	G	A	C	A	T	T	G	T	C	G	G	A	T
<b>Mẫu</b>	<b>Vị trí sai khác</b>														
	236	279	280	295	322	502	529	538	546	479	487	518	519	532	542
<i>Actinidia 2</i>	T	C	A	A	G	C	C	G	C	G	C	C	C	G	G
<i>Actinidia 3</i>	A	A	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 5</i>	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 9</i>	A	A	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 17</i>	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 1</i>	A	A	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 6</i>	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 7</i>	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 8</i>	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 12</i>	A	C	G	A	G	C	T	A	T	A	T	T	T	G	A
<i>Actinidia 13</i>	A	A	G	A	G	T	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<i>Actinidia 15</i>	A	A	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	A	G
<i>Actinidia 19</i>	A	C	G	A	G	C	T	A	T	A	T	T	T	G	A
<i>Actinidia 20</i>	A	C	G	A	G	C	T	A	T	A	T	T	T	G	A
<i>Actinidia 10</i>	A	C	G	T	T	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
<b>Mẫu</b>	<b>Vị trí sai khác</b>														
	551	579	606	609	614	617	621	630	631	632	637	641	646	650	651
<i>Actinidia 2</i>	G	T	C	T	T	C	C	T	T	G	C	C	C	G	C
<i>Actinidia 3</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T

<i>Actinidia 5</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<i>Actinidia 9</i>	G	T	T	C	T	G	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<i>Actinidia 17</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<i>Actinidia 1</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<i>Actinidia 6</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<i>Actinidia 7</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<i>Actinidia 8</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<i>Actinidia 12</i>	A	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	T	A	T
<i>Actinidia 13</i>	G	T	T	C	A	A	T	A	A	T	A	T	C	A	T
<i>Actinidia 15</i>	G	A	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<i>Actinidia 19</i>	A	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	T	A	T
<i>Actinidia 20</i>	A	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	T	A	T
<i>Actinidia 10</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
<b>Mẫu</b>	<b>Vị trí sai khác</b>														
	653	654	661	662	664	671	673	679							
<i>Actinidia 2</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 3</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 5</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 9</i>	T	C	G	A	C	T	A	G							
<i>Actinidia 17</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 1</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 6</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 7</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 8</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							

<i>Actinidia 12</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 13</i>	A	T	C	G	G	T	C	G							
<i>Actinidia 15</i>	A	T	G	A	T	T	A	G							
<i>Actinidia 19</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 20</i>	A	C	G	A	C	C	A	G							
<i>Actinidia 10</i>	A	C	G	A	C	C	A	C							

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

Descriptives							
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
TY LE MAU NHIEM	.00	3	53.3333	6.66500	3.84804	36.7766	69.8901
	1.00	3	35.5533	3.85093	2.22333	25.9871	45.1196
	2.00	3	33.3300	.00000	.00000	33.3300	33.3300
	3.00	3	15.5533	3.85093	2.22333	5.9871	25.1196
	4.00	3	22.2233	3.85093	2.22333	12.6571	31.7896
	5.00	3	48.8900	3.84515	2.22000	39.3381	58.4419
	Total	18	34.8139	14.19907	3.34675	27.7529	41.8749
TY LE MAU HOAI TU	.00	3	6.6667	6.66500	3.84804	-9.8901	23.2234
	1.00	3	13.3333	6.66500	3.84804	-3.2234	29.8901
	2.00	3	31.1100	3.84515	2.22000	21.5581	40.6619
	3.00	3	60.0000	6.67000	3.85093	43.4308	76.5692
	4.00	3	40.0000	.00000	.00000	40.0000	40.0000
	5.00	3	17.7767	3.85093	2.22333	8.2104	27.3429
	Total	18	28.1478	19.07067	4.49500	18.6642	37.6314
TY LE SONG	.00	3	40.0000	.00000	.00000	40.0000	40.0000
	1.00	3	51.1100	3.84515	2.22000	41.5581	60.6619
	2.00	3	35.5533	3.85093	2.22333	25.9871	45.1196
	3.00	3	24.4467	3.85093	2.22333	14.8804	34.0129
	4.00	3	37.7767	3.85093	2.22333	28.2104	47.3429
	5.00	3	33.3333	6.66500	3.84804	16.7766	49.8901
	Total	18	37.0367	8.92065	2.10262	32.6005	41.4728

**Homogeneous Subsets**

**TY LE MAU NHIEM**

NGHIEM THUC 1	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3

	3.00	3	15.5533		
	4.00	3	22.2233		
	2.00	3		33.3300	
Duncan <sup>a</sup>	1.00	3		35.5533	
	5.00	3			48.8900
	.00	3			53.3333
	Sig.		.073	.525	.215

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**TY LE MAU HOAI TU**

NGHIEM THUC 1	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	6.6667			
1.00	3	13.3333	13.3333		
5.00	3		17.7767		
Duncan <sup>a</sup> 2.00	3			31.1100	
4.00	3			40.0000	
3.00	3				60.0000
Sig.		.143	.317	.059	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**TY LE SONG**

NGHIEM THUC 1	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3.00	3	24.4467		
5.00	3		33.3333	
2.00	3		35.5533	
4.00	3		37.7767	
.00	3		40.0000	
1.00	3			51.1100
Sig.		1.000	.093	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Bảng 3.4.** Sự tái sinh chồi từ mẫu cây lá cây Kiwi vàng được khử trùng bằng AgNPs, HgCl<sub>2</sub> và NaOCl sau 8 tuần nuôi cấy

Descriptives								
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
						Lower Bound	Upper Bound	
NGHIEM THUC 2	.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676	3.00
	1.00	3	4.6667	1.15470	.66667	1.7982	7.5351	4.00
	2.00	3	6.3333	1.52753	.88192	2.5388	10.1279	5.00
	Total	9	4.7778	1.64148	.54716	3.5160	6.0395	3.00
NGHIEM THUC 3	.00	3	2.3300	.46228	.26690	1.1816	3.4784	2.01
	1.00	3	3.0200	.35679	.20599	2.1337	3.9063	2.78
	2.00	3	3.8233	.65531	.37834	2.1954	5.4512	3.44
	Total	9	3.0578	.78201	.26067	2.4567	3.6589	2.01
NGHIEM THUC 4	.00	3	.6000	.24062	.13892	.0023	1.1977	.37
	1.00	3	.8467	.30072	.17362	.0996	1.5937	.63
	2.00	3	1.4633	.45545	.26295	.3319	2.5947	1.12
	Total	9	.9700	.48708	.16236	.5956	1.3444	.37

### Homogeneous Subsets

#### NGHIEM THUC 2

NGHIEM THUC 1	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.00	3	3.3333	
1.00	3	4.6667	4.6667
2.00	3		6.3333
Sig.		.207	.128

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### NGHIEM THUC 3

NGHIEM THUC 1	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.00	3	2.3300	
1.00	3	3.0200	3.0200
2.00	3		3.8233
Sig.		.146	.100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**NGHIEM THUC 4**

NGHIEM THUC 1	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.00	3	.6000	
Duncan <sup>a</sup> 1.00	3	.8467	.8467
2.00	3		1.4633
Sig.		.414	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

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

**Descriptives**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
TRONG LUONG TUOI	.00	3	1.6500	.08718	.05033	1.4334	1.8666
	1.00	3	1.8267	.08737	.05044	1.6096	2.0437
	2.00	3	2.4033	.36474	.21058	1.4973	3.3094
	3.00	3	2.4600	.06557	.03786	2.2971	2.6229
	4.00	3	3.3333	.69060	.39872	1.6178	5.0489
	5.00	3	1.5867	.05033	.02906	1.4616	1.7117
	6.00	3	2.3633	.35921	.20739	1.4710	3.2557
	7.00	3	2.2733	.15695	.09062	1.8834	2.6632
	8.00	3	1.7600	.41073	.23714	.7397	2.7803
	9.00	3	1.5700	.15133	.08737	1.1941	1.9459
	10.00	3	2.1400	.10536	.06083	1.8783	2.4017
	11.00	3	1.6933	.31770	.18342	.9041	2.4825
	12.00	3	1.4967	.13796	.07965	1.1540	1.8394
	Total	39	2.0428	.56242	.09006	1.8605	2.2251
CHIEU CAO CHOI	.00	3	3.0500	.18028	.10408	2.6022	3.4978
	1.00	3	2.9000	.20000	.11547	2.4032	3.3968
	2.00	3	3.2667	.25166	.14530	2.6415	3.8918
	3.00	3	3.3000	.17321	.10000	2.8697	3.7303
	4.00	3	3.8867	.10263	.05925	3.6317	4.1416
	5.00	3	2.8000	.10000	.05774	2.5516	3.0484
	6.00	3	3.0233	.17786	.10269	2.5815	3.4652
	7.00	3	2.6067	.45015	.25989	1.4884	3.7249
	8.00	3	2.2767	.28537	.16476	1.5678	2.9856
	9.00	3	2.2733	.28572	.16496	1.5636	2.9831
	10.00	3	2.6633	.21362	.12333	2.1327	3.1940
	11.00	3	1.9367	.09609	.05548	1.6980	2.1754
12.00	3	1.4367	.07638	.04410	1.2469	1.6264	

SO LA/CHOI	Total	39	2.7246	.64917	.10395	2.5142	2.9351
	.00	3	2.6667	.57735	.33333	1.2324	4.1009
	1.00	3	2.3333	.57735	.33333	.8991	3.7676
	2.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676
	3.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676
	4.00	3	4.3333	.57735	.33333	2.8991	5.7676
	5.00	3	2.6667	.57735	.33333	1.2324	4.1009
	6.00	3	4.0000	1.00000	.57735	1.5159	6.4841
	7.00	3	3.3333	1.15470	.66667	.4649	6.2018
	8.00	3	2.0000	1.00000	.57735	-.4841	4.4841
	9.00	3	2.0000	1.00000	.57735	-.4841	4.4841
	10.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676
	11.00	3	2.3333	.57735	.33333	.8991	3.7676
	12.00	3	1.6667	.57735	.33333	.2324	3.1009

### Homogeneous Subsets

#### TRONG LUONG TUOI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
12.00	3	1.4967				
9.00	3	1.5700				
5.00	3	1.5867				
.00	3	1.6500	1.6500			
11.00	3	1.6933	1.6933			
8.00	3	1.7600	1.7600	1.7600		
1.00	3	1.8267	1.8267	1.8267		
10.00	3		2.1400	2.1400	2.1400	
7.00	3			2.2733	2.2733	
6.00	3				2.3633	
2.00	3				2.4033	
3.00	3				2.4600	
4.00	3					3.3333
Sig.		.239	.075	.058	.241	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### CHIEU CAO CHOI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
12.00	3	1.4367						
11.00	3		1.9367					
9.00	3		2.2733	2.2733				
8.00	3		2.2767	2.2767				
7.00	3			2.6067	2.6067			



10.00	3			2.6633	2.6633	2.6633		
5.00	3				2.8000	2.8000		
1.00	3				2.9000	2.9000	2.9000	
6.00	3					3.0233	3.0233	
.00	3					3.0500	3.0500	
2.00	3						3.2667	
3.00	3						3.3000	
4.00	3							3.8867
Sig.		1.000	.088	.059	.151	.066	.058	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### SO LA/CHOI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12.00	3	1.6667			
8.00	3	2.0000	2.0000		
9.00	3	2.0000	2.0000		
1.00	3	2.3333	2.3333		
11.00	3	2.3333	2.3333		
.00	3	2.6667	2.6667	2.6667	
5.00	3	2.6667	2.6667	2.6667	
2.00	3		3.3333	3.3333	3.3333
3.00	3		3.3333	3.3333	3.3333
7.00	3		3.3333	3.3333	3.3333
10.00	3		3.3333	3.3333	3.3333
6.00	3			4.0000	4.0000
4.00	3				4.3333
Sig.		.167	.073	.067	.162

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**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.

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	3	15.6667	1.52753	.88192	11.8721	19.4612
1.00	3	19.3333	1.52753	.88192	15.5388	23.1279
2.00	3	16.0000	2.00000	1.15470	11.0317	20.9683
3.00	3	16.3333	2.08167	1.20185	11.1622	21.5045
4.00	3	16.0000	2.00000	1.15470	11.0317	20.9683
5.00	3	15.3333	2.30940	1.33333	9.5965	21.0702

TY LE	6.00	3	20.0000	1.00000	.57735	17.5159	22.4841
	7.00	3	20.3333	1.15470	.66667	17.4649	23.2018
	Total	24	17.3750	2.49891	.51009	16.3198	18.4302
	.00	3	88.6667	1.52753	.88192	84.8721	92.4612
	1.00	3	87.3333	2.51661	1.45297	81.0817	93.5849
	2.00	3	74.3333	1.52753	.88192	70.5388	78.1279
	3.00	3	92.3333	3.51188	2.02759	83.6093	101.0573
	4.00	3	66.6667	2.08167	1.20185	61.4955	71.8378
	5.00	3	87.6667	2.08167	1.20185	82.4955	92.8378
	6.00	3	75.6667	1.15470	.66667	72.7982	78.5351
SO LUONG PHOI	7.00	3	78.0000	2.00000	1.15470	73.0317	82.9683
	Total	24	81.3333	8.72112	1.78019	77.6507	85.0159
	.00	3	6.6667	.57735	.33333	5.2324	8.1009
	1.00	3	4.3333	.57735	.33333	2.8991	5.7676
	2.00	3	5.0000	1.00000	.57735	2.5159	7.4841
	3.00	3	5.6667	.57735	.33333	4.2324	7.1009
	4.00	3	6.0000	1.00000	.57735	3.5159	8.4841
	5.00	3	8.6667	1.52753	.88192	4.8721	12.4612
	6.00	3	6.3333	.57735	.33333	4.8991	7.7676
	7.00	3	5.6667	1.15470	.66667	2.7982	8.5351
GCF	Total	24	6.0417	1.45898	.29781	5.4256	6.6577
	.00	3	5.9067	.44433	.25654	4.8029	7.0105
	1.00	3	7.5633	.82233	.47477	5.5205	9.6061
	2.00	3	14.8667	2.69504	1.55598	8.1718	21.5615
	3.00	3	31.3667	2.32612	1.34299	25.5883	37.1451
	4.00	3	32.0333	6.09289	3.51773	16.8978	47.1689
	5.00	3	15.1833	2.67410	1.54389	8.5405	21.8262
	6.00	3	14.3733	1.51596	.87524	10.6075	18.1392
	7.00	3	17.6667	3.60185	2.07953	8.7192	26.6142
	Total	24	17.3700	9.60532	1.96068	13.3140	21.4260
KHOI LUONG TUOI	.00	3	1658.6667	1.52753	.88192	1654.8721	1662.4612
	1.00	3	977.6667	2.08167	1.20185	972.4955	982.8378
	2.00	3	545.0000	2.00000	1.15470	540.0317	549.9683
	3.00	3	464.6667	4.50925	2.60342	453.4651	475.8683
	4.00	3	459.6667	2.51661	1.45297	453.4151	465.9183
	5.00	3	954.3333	4.50925	2.60342	943.1317	965.5349
	6.00	3	596.3333	1.52753	.88192	592.5388	600.1279
	7.00	3	493.6667	4.16333	2.40370	483.3244	504.0090
	Total	24	768.7500	397.85602	81.21202	600.7501	936.7499

### Homogeneous Subsets

#### CAM UNG PSP

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2.00	3	14.0000		
5.00	3	14.6667		
.00	3		19.6667	
3.00	3		19.6667	
6.00	3		19.6667	

7.00	3	20.0000	
4.00	3	20.6667	
1.00	3		27.0000
Sig.		.526	.392

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### TY LE

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
3.00	3	54.0000				
6.00	3		59.3333			
4.00	3		61.0000			
1.00	3			72.3333		
Duncan <sup>a</sup> 2.00	3			72.6667		
7.00	3			72.6667		
.00	3				92.0000	
5.00	3					98.6667
Sig.		1.000	.243	.822	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### SO LUONG PHI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4.00	3	2.6667		
3.00	3		5.3333	
7.00	3		5.3333	
1.00	3		6.0000	
Duncan <sup>a</sup> 6.00	3		6.0000	
2.00	3		6.6667	
.00	3			10.0000
5.00	3			10.6667
Sig.		1.000	.219	.490

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### GCF

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1.00	3	8.6833			
.00	3	9.2033			
Duncan <sup>a</sup> 6.00	3	10.6767	10.6767		
4.00	3	12.9767	12.9767	12.9767	
7.00	3		15.4900	15.4900	15.4900
3.00	3			17.2700	17.2700

2.00	3				19.3633
5.00	3				21.0433
Sig.		.162	.110	.151	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### KHOI LUONG TUOI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
4.00	3	412.3333					
3.00	3	419.6667					
7.00	3		459.3333				
2.00	3			531.3333			
Duncan <sup>a</sup> 6.00	3				595.3333		
1.00	3					937.3333	
5.00	3					945.0000	
.00	3						1568.0000
Sig.		.340	1.000	1.000	1.000	.319	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**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.

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	3	15.6667	1.52753	.88192	11.8721	19.4612
1.00	3	19.3333	1.52753	.88192	15.5388	23.1279
2.00	3	16.0000	2.00000	1.15470	11.0317	20.9683
3.00	3	16.3333	2.08167	1.20185	11.1622	21.5045
CAM UNG PSP 4.00	3	16.0000	2.00000	1.15470	11.0317	20.9683
5.00	3	15.3333	2.30940	1.33333	9.5965	21.0702
6.00	3	20.0000	1.00000	.57735	17.5159	22.4841
7.00	3	20.3333	1.15470	.66667	17.4649	23.2018
Total	24	17.3750	2.49891	.51009	16.3198	18.4302
.00	3	88.6667	1.52753	.88192	84.8721	92.4612
1.00	3	87.3333	2.51661	1.45297	81.0817	93.5849
2.00	3	74.3333	1.52753	.88192	70.5388	78.1279
TY LE 3.00	3	92.3333	3.51188	2.02759	83.6093	101.0573
4.00	3	66.6667	2.08167	1.20185	61.4955	71.8378
5.00	3	87.6667	2.08167	1.20185	82.4955	92.8378

SO LUONG PHOI	6.00	3	75.6667	1.15470	.66667	72.7982	78.5351
	7.00	3	78.0000	2.00000	1.15470	73.0317	82.9683
	Total	24	81.3333	8.72112	1.78019	77.6507	85.0159
	.00	3	6.6667	.57735	.33333	5.2324	8.1009
	1.00	3	4.3333	.57735	.33333	2.8991	5.7676
	2.00	3	5.0000	1.00000	.57735	2.5159	7.4841
	3.00	3	5.6667	.57735	.33333	4.2324	7.1009
	4.00	3	6.0000	1.00000	.57735	3.5159	8.4841
	5.00	3	8.6667	1.52753	.88192	4.8721	12.4612
	6.00	3	6.3333	.57735	.33333	4.8991	7.7676
GCF	7.00	3	5.6667	1.15470	.66667	2.7982	8.5351
	Total	24	6.0417	1.45898	.29781	5.4256	6.6577
	.00	3	5.9067	.44433	.25654	4.8029	7.0105
	1.00	3	7.5633	.82233	.47477	5.5205	9.6061
	2.00	3	14.8667	2.69504	1.55598	8.1718	21.5615
	3.00	3	31.3667	2.32612	1.34299	25.5883	37.1451
	4.00	3	32.0333	6.09289	3.51773	16.8978	47.1689
	5.00	3	15.1833	2.67410	1.54389	8.5405	21.8262
	6.00	3	14.3733	1.51596	.87524	10.6075	18.1392
	7.00	3	17.6667	3.60185	2.07953	8.7192	26.6142
KHOI LUONG TUOI	Total	24	17.3700	9.60532	1.96068	13.3140	21.4260
	.00	3	1658.6667	1.52753	.88192	1654.8721	1662.4612
	1.00	3	977.6667	2.08167	1.20185	972.4955	982.8378
	2.00	3	545.0000	2.00000	1.15470	540.0317	549.9683
	3.00	3	464.6667	4.50925	2.60342	453.4651	475.8683
	4.00	3	459.6667	2.51661	1.45297	453.4151	465.9183
	5.00	3	954.3333	4.50925	2.60342	943.1317	965.5349
	6.00	3	596.3333	1.52753	.88192	592.5388	600.1279
	7.00	3	493.6667	4.16333	2.40370	483.3244	504.0090
	Total	24	768.7500	397.85602	81.21202	600.7501	936.7499

### Homogeneous Subsets

### CAM UNG PSP

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
5.00	3	15.3333		
.00	3	15.6667		
2.00	3	16.0000		
4.00	3	16.0000		
Duncan <sup>a</sup> 3.00	3	16.3333	16.3333	
1.00	3		19.3333	19.3333
6.00	3			20.0000
7.00	3			20.3333
Sig.		.537	.053	.519

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**TY LE**

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4.00	3	66.6667			
2.00	3		74.3333		
6.00	3		75.6667		
7.00	3		78.0000		
Duncan <sup>a</sup> 1.00	3			87.3333	
5.00	3			87.6667	
.00	3			88.6667	88.6667
3.00	3				92.3333
Sig.		1.000	.065	.485	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**SO LUONG PHOI**

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.00	3	4.3333		
2.00	3	5.0000	5.0000	
3.00	3	5.6667	5.6667	
7.00	3	5.6667	5.6667	
Duncan <sup>a</sup> 4.00	3	6.0000	6.0000	
6.00	3		6.3333	
.00	3		6.6667	
5.00	3			8.6667
Sig.		.065	.068	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**GCF**

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
.00	3	5.9067		
1.00	3	7.5633		
6.00	3		14.3733	
2.00	3		14.8667	
Duncan <sup>a</sup> 5.00	3		15.1833	
7.00	3		17.6667	
3.00	3			31.3667
4.00	3			32.0333
Sig.		.512	.237	.791

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### KHOI LUONG TUOI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
4.00	3	459.6667					
3.00	3	464.6667					
7.00	3		493.6667				
2.00	3			545.0000			
Duncan <sup>a</sup> 6.00	3				596.3333		
5.00	3					954.3333	
1.00	3						977.6667
.00	3						
Sig.		.066	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

### KHOI LUONG TUOI

DOI CHUNG	Subset for alpha = 0.05	
	7	
4.00		
3.00		
7.00		
2.00		
Duncan <sup>a</sup> 6.00		
5.00		
1.00		
.00		1658.6667
Sig.		1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

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

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
TONG SO CHOI	.00	3	2.3333	.57735	.33333	.8991	3.7676
	1.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676
	2.00	3	3.6667	.57735	.33333	2.2324	5.1009
	3.00	3	5.6667	.57735	.33333	4.2324	7.1009
	4.00	3	6.6667	.57735	.33333	5.2324	8.1009
	5.00	3	2.3333	.57735	.33333	.8991	3.7676

>4	6.00	3	2.6667	.57735	.33333	1.2324	4.1009	
	7.00	3	3.6667	.57735	.33333	2.2324	5.1009	
	8.00	3	3.6667	.57735	.33333	2.2324	5.1009	
	Total	27	3.7778	1.50214	.28909	3.1836	4.3720	
	.00	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	
	1.00	3	2.6667	.57735	.33333	1.2324	4.1009	
	2.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676	
	3.00	3	5.0000	.00000	.00000	5.0000	5.0000	
	4.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676	
	5.00	3	1.3333	.57735	.33333	-.1009	2.7676	
	6.00	3	1.3333	.57735	.33333	-.1009	2.7676	
	7.00	3	2.0000	.00000	.00000	2.0000	2.0000	
	8.00	3	2.0000	.00000	.00000	2.0000	2.0000	
	Total	27	2.4444	1.28103	.24653	1.9377	2.9512	
	.00	3	3.3000	.20000	.11547	2.8032	3.7968	
	1.00	3	4.1633	.08083	.04667	3.9625	4.3641	
	2.00	3	4.1767	.06429	.03712	4.0170	4.3364	
	3.00	3	4.8567	.17039	.09838	4.4334	5.2799	
	4.00	3	4.3600	.07211	.04163	4.1809	4.5391	
	CHIEU CAO CHOI	5.00	3	3.3533	.13796	.07965	3.0106	3.6960
	6.00	3	2.4133	.31943	.18442	1.6198	3.2068	
	7.00	3	3.9133	.11846	.06839	3.6191	4.2076	
	8.00	3	2.8700	.11269	.06506	2.5901	3.1499	
	Total	27	3.7119	.76254	.14675	3.4102	4.0135	
	.00	3	2.6667	.57735	.33333	1.2324	4.1009	
	1.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676	
	2.00	3	4.6667	.57735	.33333	3.2324	6.1009	
3.00	3	5.6667	.57735	.33333	4.2324	7.1009		
SO LUONG LA	4.00	3	5.3333	.57735	.33333	3.8991	6.7676	
5.00	3	3.3333	.57735	.33333	1.8991	4.7676		
6.00	3	3.6667	.57735	.33333	2.2324	5.1009		
7.00	3	4.3333	.57735	.33333	2.8991	5.7676		
8.00	3	4.6667	.57735	.33333	3.2324	6.1009		
Total	27	4.1852	1.07550	.20698	3.7597	4.6106		
.00	3	1.6833	.13051	.07535	1.3591	2.0075		
1.00	3	1.9633	.17616	.10171	1.5257	2.4009		
2.00	3	2.2067	.26858	.15506	1.5395	2.8738		
3.00	3	3.7467	.10017	.05783	3.4978	3.9955		
TRONG LUONG	4.00	3	3.0900	.06928	.04000	2.9179	3.2621	
TUOI	5.00	3	3.1267	.06807	.03930	2.9576	3.2958	
6.00	3	3.1600	.01732	.01000	3.1170	3.2030		
7.00	3	3.9433	.10116	.05840	3.6920	4.1946		
8.00	3	3.5333	.26350	.15213	2.8788	4.1879		
Total	27	2.9393	.78440	.15096	2.6290	3.2496		

Homogeneous Subsets

TONG SO CHOI



DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	2.3333			
5.00	3	2.3333			
6.00	3	2.6667	2.6667		
1.00	3	3.3333	3.3333		
2.00	3		3.6667		
7.00	3		3.6667		
8.00	3		3.6667		
3.00	3			5.6667	
4.00	3				6.6667
Sig.		.066	.071	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

>4

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	1.0000				
5.00	3	1.3333	1.3333			
6.00	3	1.3333	1.3333			
7.00	3		2.0000	2.0000		
8.00	3		2.0000	2.0000		
1.00	3			2.6667	2.6667	
2.00	3				3.3333	
4.00	3				3.3333	
3.00	3					5.0000
Sig.		.382	.097	.088	.088	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### CHIEU CAO CHOI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
6.00	3	2.4133					
8.00	3		2.8700				
.00	3			3.3000			
5.00	3			3.3533			
7.00	3				3.9133		
1.00	3				4.1633	4.1633	
2.00	3				4.1767	4.1767	
4.00	3					4.3600	
3.00	3						4.8567

Sig.		1.000	1.000	.689	.072	.173	1.000
------	--	-------	-------	------	------	------	-------

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### SO LUONG LA

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	2.6667				
1.00	3	3.3333	3.3333			
5.00	3	3.3333	3.3333			
6.00	3	3.6667	3.6667	3.6667		
7.00	3		4.3333	4.3333	4.3333	
2.00	3			4.6667	4.6667	4.6667
8.00	3			4.6667	4.6667	4.6667
4.00	3				5.3333	5.3333
3.00	3					5.6667
Sig.		.066	.066	.066	.066	.066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### TRONG LUONG TUOI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	1.6833				
1.00	3		1.9633			
2.00	3		2.2067			
4.00	3			3.0900		
5.00	3			3.1267		
6.00	3			3.1600		
8.00	3				3.5333	
3.00	3				3.7467	3.7467
7.00	3					3.9433
Sig.		1.000	.073	.611	.112	.141

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

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

Descriptives							
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
CHIEU CAO CAY	.00	3	5.0267	.02517	.01453	4.9642	5.0892
	1.00	3	5.1733	.12014	.06936	4.8749	5.4718
	2.00	3	5.6133	.10017	.05783	5.3645	5.8622
	3.00	3	5.3000	.10000	.05774	5.0516	5.5484
	4.00	3	7.0833	.05508	.03180	6.9465	7.2201
	5.00	3	5.5900	.06557	.03786	5.4271	5.7529
	Total	18	5.6311	.70592	.16639	5.2801	5.9822
SO LUONG RE	.00	3	2.3300	.21932	.12662	1.7852	2.8748
	1.00	3	4.6700	.33867	.19553	3.8287	5.5113
	2.00	3	6.3333	.01155	.00667	6.3046	6.3620
	3.00	3	8.3333	.11015	.06360	8.0597	8.6070
	4.00	3	10.6733	.10599	.06119	10.4100	10.9366
	5.00	3	9.3367	.11930	.06888	9.0403	9.6330
	Total	18	6.9461	2.92644	.68977	5.4908	8.4014
CHIEU DAI RE	.00	3	.9000	.33181	.19157	.0757	1.7243
	1.00	3	1.7667	.14572	.08413	1.4047	2.1286
	2.00	3	2.0600	.09849	.05686	1.8153	2.3047
	3.00	3	3.7700	.11358	.06557	3.4879	4.0521
	4.00	3	5.8500	.14731	.08505	5.4841	6.2159
	5.00	3	4.3167	.23245	.13421	3.7392	4.8941
	Total	18	3.1106	1.74946	.41235	2.2406	3.9805
SO LUONG LA	.00	3	5.6700	.15524	.08963	5.2844	6.0556
	1.00	3	6.6700	.21656	.12503	6.1320	7.2080
	2.00	3	6.6700	.13748	.07937	6.3285	7.0115
	3.00	3	6.3300	.09539	.05508	6.0930	6.5670
	4.00	3	7.6733	.24173	.13956	7.0728	8.2738
	5.00	3	5.3333	.08622	.04978	5.1192	5.5475
	Total	18	6.3911	.79174	.18662	5.9974	6.7848
CHIEU DAI LA	.00	3	2.1600	.25515	.14731	1.5262	2.7938
	1.00	3	2.4800	.15100	.08718	2.1049	2.8551
	2.00	3	2.7767	.08145	.04702	2.5743	2.9790
	3.00	3	2.7600	.07550	.04359	2.5725	2.9475
	4.00	3	3.6400	.06245	.03606	3.4849	3.7951
	5.00	3	2.4700	.13077	.07550	2.1452	2.7948
	Total	18	2.7144	.49090	.11571	2.4703	2.9586
CHIEU RONG LA	.00	3	1.7300	.02000	.01155	1.6803	1.7797
	1.00	3	2.3600	.04359	.02517	2.2517	2.4683
	2.00	3	2.3867	.10408	.06009	2.1281	2.6452
	3.00	3	2.5033	.07638	.04410	2.3136	2.6931
	4.00	3	2.6733	.05033	.02906	2.5483	2.7984
	5.00	3	2.5200	.07937	.04583	2.3228	2.7172

### Homogeneous Subsets

#### CHIEU CAO CAY

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	5.0267			
1.00	3	5.1733	5.1733		
3.00	3		5.3000		
Duncan <sup>a</sup> 5.00	3			5.5900	
2.00	3			5.6133	
4.00	3				7.0833
Sig.		.054	.090	.740	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### SO LUONG RE

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
.00	3	2.3300					
1.00	3		4.6700				
2.00	3			6.3333			
Duncan <sup>a</sup> 3.00	3				8.3333		
5.00	3					9.3367	
4.00	3						10.6733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### CHIEU DAI RE

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	.9000				
1.00	3		1.7667			
2.00	3		2.0600			
Duncan <sup>a</sup> 3.00	3			3.7700		
5.00	3				4.3167	
4.00	3					5.8500
Sig.		1.000	.091	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### SO LUONG LA

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
5.00	3	5.3333				
.00	3		5.6700			
3.00	3			6.3300		
Duncan <sup>a</sup> 1.00	3				6.6700	
2.00	3				6.6700	
4.00	3					7.6733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### CHIEU DAI LA

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	2.1600			
5.00	3		2.4700		
1.00	3		2.4800		
Duncan <sup>a</sup> 3.00	3			2.7600	
2.00	3			2.7767	
4.00	3				3.6400
Sig.		1.000	.933	.888	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### CHIEU RONG LA

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	1.7300				
1.00	3		2.3600			
2.00	3		2.3867	2.3867		
Duncan <sup>a</sup> 3.00	3			2.5033	2.5033	
5.00	3				2.5200	
4.00	3					2.6733
Sig.		1.000	.640	.058	.769	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	39.4200				
1.00	3		42.7000			
3.00	3			45.5000		
Duncan <sup>a</sup> 5.00	3			47.0333	47.0333	
2.00	3				48.4667	
4.00	3					52.8767
Sig.		1.000	1.000	.213	.242	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### TRONG LUONG TUOI

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
.00	3	.4667		
1.00	3		.8833	
2.00	3		.9233	
Duncan <sup>a</sup> 4.00	3			1.2233
3.00	3			1.2900
5.00	3			1.3133
Sig.		1.000	.384	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

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

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
TY LE SONG	.00	3	76.0333	1.11505	.64377	73.2634	78.8033
	1.00	3	74.6667	.50332	.29059	73.4163	75.9170
	2.00	3	88.6667	.80208	.46308	86.6742	90.6591
	3.00	3	93.6667	1.50444	.86859	89.9294	97.4039
	4.00	3	85.3333	2.61024	1.50702	78.8491	91.8175
	Total	15	83.6733	7.66984	1.98034	79.4259	87.9207
CHIEU CAO CAY CON	.00	3	7.7133	.68245	.39401	6.0180	9.4086
	1.00	3	8.0000	.25000	.14434	7.3790	8.6210
	2.00	3	9.6100	.20421	.11790	9.1027	10.1173
	3.00	3	10.3633	.18771	.10837	9.8970	10.8296
	4.00	3	9.2167	.74889	.43237	7.3563	11.0770
	Total	15	8.9807	1.10603	.28557	8.3682	9.5932
SO LUONG LA	.00	3	.6667	.57735	.33333	-.7676	2.1009

MOI	1.00	3	1.3333	.57735	.33333	-.1009	2.7676
	2.00	3	1.6667	.57735	.33333	.2324	3.1009
	3.00	3	2.3333	.57735	.33333	.8991	3.7676
	4.00	3	1.6667	.57735	.33333	.2324	3.1009
	Total	15	1.5333	.74322	.19190	1.1217	1.9449
	.00	3	2.3000	.52915	.30551	.9855	3.6145
CHIEU DAI LA	1.00	3	1.9467	.04163	.02404	1.8432	2.0501
	2.00	3	2.8000	.18028	.10408	2.3522	3.2478
	3.00	3	3.8333	.09609	.05548	3.5946	4.0720
	4.00	3	2.5667	.18475	.10667	2.1077	3.0256
	Total	15	2.6893	.69861	.18038	2.3025	3.0762
	.00	3	1.8800	.03606	.02082	1.7904	1.9696
CHIEU RONG LA	1.00	3	1.8800	.11533	.06658	1.5935	2.1665
	2.00	3	2.4733	.10693	.06173	2.2077	2.7390
	3.00	3	2.9200	.03606	.02082	2.8304	3.0096
	4.00	3	2.1533	.10504	.06064	1.8924	2.4143
	Total	15	2.2613	.41581	.10736	2.0311	2.4916

### Homogeneous Subsets

#### TY LE SONG

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1.00	3	74.6667			
.00	3	76.0333			
4.00	3		85.3333		
2.00	3			88.6667	
3.00	3				93.6667
Sig.		.290	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### CHIEU CAO CAY CON

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
.00	3	7.7133		
1.00	3	8.0000		
4.00	3		9.2167	
2.00	3		9.6100	9.6100
3.00	3			10.3633
Sig.		.484	.342	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**SO LUONG LA MOI**

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.00	3	.6667	
1.00	3	1.3333	1.3333
2.00	3	1.6667	1.6667
4.00	3	1.6667	1.6667
3.00	3		2.3333
Sig.		.076	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**CHIEU DAI LA**

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.00	3	1.9467		
.00	3	2.3000	2.3000	
4.00	3		2.5667	
2.00	3		2.8000	
3.00	3			3.8333
Sig.		.137	.053	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**CHIEU RONG LA**

DOI CHUNG	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1.00	3	1.8800			
.00	3	1.8800			
4.00	3		2.1533		
2.00	3			2.4733	
3.00	3				2.9200
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.