

Xác định giới tính bằng chỉ thị phân tử và vi nhân giống cây Kiwi vàng (*Actinidia chinensis*)

Nguyễn Thị Mỹ Hạnh^{1,2,3}, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đắc Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Vũ Quốc Luận¹, Huỳnh Văn Biết⁴, Huỳnh Hữu Đức⁵, Hoàng Thị Như Phương⁶, Bùi Văn Lệ⁷, Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Trường Cao đẳng nghề Đà Lạt

⁴Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

⁵Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh

⁶Trường Đại học Đà Lạt

⁷Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 25/2/2022; ngày chuyển phản biện 2/3/2022; ngày nhận phản biện 28/3/2022; ngày chấp nhận đăng 31/3/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, chỉ thị phân tử liên kết giới tính được sử dụng để xác định giới tính của 8 mẫu cây Kiwi. Ngoài ra, mẫu lá đã xác định giới tính được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu cho quá trình vi nhân giống thông qua quá trình cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi và tăng sinh cụm chồi. Kết quả ghi nhận được cho thấy, phương pháp xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử trên nhiễm sắc thể Y được khuếch đại bằng cặp primer SmY1_F/R đã nhận diện thành công các mẫu Kiwi đực của loài Kiwi vàng (*Actinidia chinensis*). Ngoài ra, quá trình khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi là tối ưu khi mẫu lá được khử trùng với 200 ppm dung dịch nano bạc, trong khi đó, môi trường nuôi cấy bổ sung 20% nước dừa cho hiệu quả tăng sinh cụm chồi tốt nhất.

Từ khóa: giới tính, Kiwi vàng, nano bạc, tăng sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Kiwi vàng là một loại cây ăn quả có giá trị kinh tế cao. Quả Kiwi có vị hơi chua và ngọt thanh, là nguồn cung cấp vitamin và chất xơ dồi dào. Loài quả này cũng chứa nhiều kali, vitamin E và đặc biệt là flavonoid. Những chất dinh dưỡng này mang đến sức khỏe dẻo dai cho con người, chống lại các bệnh về tim mạch, ung thư đường ruột... Kiwi được xem là loại cây ăn quả thành công nhất trong thế kỷ XX vì nó đã được thuần hóa trong ít nhất một thế kỷ [1]. Ngoài ra, các nghiên cứu về phân loại, hệ thống, phân bố địa lý, sự đa dạng di truyền... cũng đã được thực hiện [2].

Nhân giống cây Kiwi đã được cải tiến liên tục về phương pháp và kỹ thuật nhằm đáp ứng nhu cầu về cây trồng chất lượng cao. Hiện nay, Kiwi được trồng từ hạt, cây ghép và cây *in vitro*. Việc trồng từ cây gốc ghép có ưu điểm là cho năng suất cao hơn vì đã ổn định về mặt di truyền [3]. Tuy nhiên, các loài *Actinidia* sp. hiện tại tạo những thách thức đối với việc nghiên cứu và lai tạo, khi tất cả các loài đã biết trong chi đều là đơn tính. 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 nhụy một cách thô sơ, sự phát triển bị kim hãm trước khi kéo dài kiểu dáng hoặc bắt đầu phóng noãn. Giới tính được xác định bằng nhiễm sắc thể (X)₄XX ở cây cái và (X)₄XY ở cây đực [3].

*Tác giả liên hệ: Email: duongtannhut@gmail.com

Nhiễm sắc thể Y quyết định giới tính đực của cây, không phụ thuộc vào số lượng nhiễm sắc thể X và thể bội [4]. Các đề xuất về trình tự đặc hiệu X hoặc Y giả định trong bộ gen gợi ý rằng, một số yếu tố di truyền nhiễm sắc thể thường có thể ảnh hưởng đến việc xác định giới tính [5, 6]. Gần đây, gen mã hóa tín hiệu cytokinin *Shy Girl* (*SyGI*), nằm trên nhiễm sắc thể Y được phát hiện là ngăn chặn sự phát triển của các cơ quan hoa cái, dẫn đến sự phát triển hoa đực [7]. Một gen được đề xuất thứ hai là *Friendly Boy* (*FrBy*) cũng nằm trên nhiễm sắc thể Y, hoạt động độc lập với *SyGI* và sự biểu hiện của nó ở cây Kiwi dẫn đến sự phát triển cây đơn tính [7]. Ngoài ra, một số trình tự như *SmX*, *SmY*, *SmY1* và *SmY2* đã được sử dụng để xác định giới tính một số loài Kiwi, kết quả ghi nhận được cho thấy, *SmY1* đã xác định được giới tính đực cây Kiwi với độ chính xác lên tới 95% [8].

Giai đoạn sinh trưởng của cây Kiwi kéo dài 4-8 năm, do đó việc xác định những cây cái mang trái ở giai đoạn đầu của quá trình sinh trưởng là rất quan trọng đối với các nhà lai tạo [9]. Vì lý do này, ngoài các chỉ thị hình thái và sinh hóa, chỉ thị phân tử rất hữu ích để xác định cây cái và cây đực ở giai đoạn phát triển ban đầu. Mục tiêu chính của nghiên cứu này là phát triển một phương pháp để chọn lọc hiệu quả giới tính cây Kiwi bằng cách sử dụng các chỉ thị phân tử liên kết giới tính. Để đạt được mục tiêu này, chúng tôi đã thử nghiệm các chỉ thị liên kết giới tính phân tử để

Sex determination by molecular markers and micropropagation of *Actinidia chinensis*

Thi My Hanh Nguyen^{1,2,3}, Thanh Tung Hoang¹,
Dac Khai Hoang¹, Manh Cuong Do¹,
Thi Nhu Mai Nguyen¹, Quoc Luan Vu¹,
Van Biet Huynh⁴, Huu Duc Huynh⁵,
Thi Nhu Phuong Hoang⁶,
Van Le Bui⁷, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific and Research, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

³Dalat Vocational Training College

⁴Nong Lam University, Ho Chi Minh city

⁵Biotechnology Center of Ho Chi Minh city

⁶Dalat University

⁷University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city

Received 25 February 2022; accepted 31 March 2022

Abstract:

In this study, a molecular sex-linked marker was used to determine the sex of 8 kiwifruit plants. In addition, leaf explants with sex determination were used as the original plant material for micropropagation via callus induction, shoot regeneration, and shoot cluster proliferation. The results showed that the sex determination method of Kiwi plants based on molecular markers on the Y chromosome amplified by primer pair SmY1_F/R successfully identified male Kiwi explant belonging to *Actinidia chinensis*. In addition, optimal explant surface sterilisation and shoot regeneration were obtained from leaf explants disinfected with 200 ppm silver nanoparticles; meanwhile, the culture medium supplemented with 20% coconut water was suitable for the highest efficiency of shoot cluster proliferation.

Keywords: *Actinidia chinensis*, sex, shoot cluster proliferation, silver nanoparticles.

Classification number: 4.6

xác định giới tính của các mẫu cây Kiwi. Ngoài ra, sau khi xác định được giới tính của cây Kiwi vàng, những mẫu lá sẽ được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu nhằm tạo nguồn mẫu *in vitro* thông qua quá trình cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi và tăng sinh cụm chồi để làm vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguồn mẫu và dung dịch nano bạc

Các mẫu lá của cây Kiwi (*Actinidia* sp.) được lấy ở vị trí cách ngọn 10 cm từ cây ngoài tự nhiên (1 năm tuổi) và các mẫu thương mại trên thị trường ở 2 tỉnh Kon Tum và Lâm Đồng. Mẫu lá của 8 cây Kiwi, bao gồm *A. deliciosa* (AD1), *A. latifolia* (AL2), *A. chinensis* (AC3), *A. chinensis* (AC4), *A. chinensis* (AC5), *A. chinensis* (AC6), *A. chinensis* (AC7) và *A. chinensis* (AC8) được thu nhận và định danh tên khoa học thông qua DNA barcode (*rbcL*, *matK*, ITS) để phân tích đa dạng di truyền và nhận diện các loài Kiwi trước khi được sử dụng làm nguồn mẫu để xác định giới tính (bảng 1). Sau khi xác định giới tính của giống Kiwi *A. chinensis*, mẫu lá được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho nuôi cấy *in vitro*.

Dung dịch nano bạc (AgNPs) được cung cấp bởi Viện Công nghệ Môi trường, VAST. AgNPs có kích thước nhỏ hơn 20 nm được tạo bằng phương pháp khử dung dịch nước sử dụng tiền chất là AgNO_3 , tác nhân khử là NaBH_4 và chất ổn định được sử dụng là chitosan [10]. Nồng độ của AgNPs là 1.000 ppm. Dung dịch AgNPs được pha với nước cất khử trùng thành các nồng độ: 100, 200, 300 và 500 ppm để khử trùng mẫu lá.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường cảm ứng mẫu cây và tái sinh chồi là MS [11] bổ sung 0,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [12]. Môi trường tăng sinh cụm chồi là MS bổ sung 0,01 mg/l TDZ, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [13]. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH=5,8 và được đổ vào bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường; sau đó hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong thời gian 20 phút.

Điều kiện nuôi cấy









Mẫu cây được nuôi cấy trong phòng nuôi cấy được điều chỉnh điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dưới ánh sáng huỳnh quang và độ ẩm trung bình 55-60%.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định giới tính Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử:

- Ly trích DNA tổng số: DNA bộ gen của các mẫu cây Kiwi được ly trích bằng phương pháp sử dụng CTAB và chloroform. Mẫu lá (0,05 g) được nghiền trong dung dịch ly trích (CTAB 20 g/l, NaCl 1,4 mol/l, Tris HCl 0,1 mol/l, Na_2EDTA 0,02 mol/l, polyvinylpyrrolidone (PVP) 1%, để

Bảng 1. Một số đặc tính hình thái của 8 mẫu Kiwi được sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mẫu	Ký hiệu	Cấu trúc lá	Đặc điểm lá		Mép lá	Cuống lá	Mặt phẳng
			Đỉnh lá	Hình dạng			
<i>A. deliciosa</i>	AD1		Nhọn dài	Lá: dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 10-11 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên và bề mặt nhám không có lông		Màu xanh và nhiều lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tim
<i>A. latifolia</i>	AL2		Nhọn dài	Lá: mỏng, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên; bề mặt có ít lông		Màu đỏ sẫm và nhiều lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 3 mm	
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC3		Tù, 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 11-12 cm, rộng 9-10 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên và bề mặt nhám không có lông		Màu đỏ sẫm và không có lông Dài: 3 cm Đường kính: 1,5 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tròn
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC4		Nhọn tròn hơi dài, 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 13-14 cm, rộng 10-12 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên và bề mặt nhám không có lông	Không có răng cưa, có ít lông	Màu xanh và không có lông Dài: 2,7 cm Đường kính: 1,5 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tù
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC5		Nhọn tròn, đối xứng	Lá: dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới có màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp không đối xứng hai bên, bề mặt nhám không có lông.		Màu xanh đậm và không có lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 2 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tròn
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC6		Tù, tròn dài, đối xứng	Lá: mỏng, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, 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 quạt
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC7		Nhọn dài	Lá: dày, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới có màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, đối xứng hai bên, bề mặt có ít lông	Có răng cưa	Màu xanh và không có lông Dài: 2 cm Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tim
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC8		Lõm 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, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên, bề mặt ít lông	Không có răng cưa và có ít lông	Màu xanh và không có lông Dài: 2 cm, Đường kính: 3 mm	

phá vỡ tế bào và giải phóng DNA. Sau đó, DNA được tinh sạch 2 lần bằng cách cho 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 RNase, ủ ở 37°C trong thời gian 5 phút, bổ sung 500 µl hỗn hợp chloroform:isoamyl alcohol (tỷ lệ 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 1/2 thể tích NaCl 5M so với thể tích thu được. Hỗn hợp được ủ trên đá trong 1 giờ, ly tâm ở 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 ở 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 2 lần. DNA này được sử dụng trực tiếp cho phản ứng PCR.

- Kiểm tra độ tinh sạch DNA: DNA bộ 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 và 280 nm trên máy quang phổ BioDrop™ µLITE (Anh).

- 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') [14] khếch đại vùng gen nằm trên nhiễm sắc thể Y có kích thước 770 bp. Thành phần của một phản ứng PCR với tổng thể tích 25 µl bao gồm: 12,5 µl MyTaq Mix (Bioline), 0,5 µl mỗi primer (nồng độ 10 µM), 9,5 µl nước

khử ion và 2 µl DNA bộ 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 100 V 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).

Tạo nguồn mẫu in vitro:

- Khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi: mẫu lá được thu nhận từ những cây khỏe mạnh ngoài tự nhiên và rửa dưới vòi nước chảy trong 30 phút. Sau đó, mẫu lá được ngâm trong dung dịch Sunlight (Unilever, TP Hồ Chí Minh) 20% trong 10 phút và rửa lại bằng nước máy nhiều lần, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng trước khi đưa 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 HgCl₂, 10 g/l NaOCl và AgNPs ở các nồng độ khác nhau (100, 200, 300 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 khử trùng được cắt thành hình chữ nhật (0,5×1 cm) có chứa gân chính và được cấy lên môi trường cảm ứng mô sẹo. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu nhiễm (%), hoại tử/chết, mẫu sống và cảm ứng mô sẹo (%) được ghi nhận. Những mẫu cấy này tiếp tục được theo dõi đến tuần thứ 8 và thu nhận số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (g) và khối lượng khô (g).

- 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 tăng sinh cụm chồi bổ sung các dịch chiết hữu cơ (nước dừa, chuối xanh và khoai tây) với các nồng độ khác nhau (5, 10, 15 và 20%). Sau 8 tuần nuôi cấy, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, khối lượng tươi (g) và hình thái chồi được ghi nhận.

Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại cấy 15 bình/nghiệm thức với 1 bình chứa 1 mẫu cấy. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel® 2010 và SPSS 20.0 với phép thử Duncan ở mức p<0,05 [15].

Kết quả và bàn luận

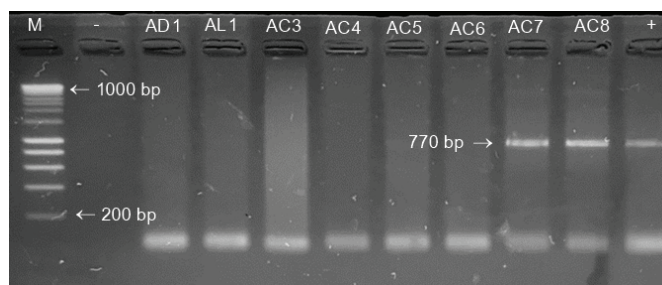
Xác định giới tính các giống Kiwi

Kết quả kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA bộ gen sau khi ly trích được cho thấy DNA của 8 mẫu Kiwi đều được ly trích thành công (bảng 2). DNA thu được có độ tinh sạch cao (A260/280 nằm trong khoảng 1,8-2,0).

Bảng 2. Kết quả ly trích DNA tổng số.

Mẫu	AD1	AL2	AC3	AC4	AC5	AC6	AC7	AC8
Nồng độ (ng/µl)	99,76	51,57	127,8	38,74	36,38	31,20	53,19	41,44
A260/280	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 (AD1, AL1, AC3, AC4, AC5 và AC6) đều không cho băng. Trong khi đó, kết quả khuếch đại đã thành công trên đoạn gen có kích thước 770 bp trên nhiễm sắc thể Y giúp nhận diện 2 mẫu đực là AC7 và AC8 (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di và kiểm tra sản phẩm PCR. M: marker; -: đối chứng âm mẫu nước cất; +: đối chứng dương cây đực chứa nhiễm sắc thể Y.

Nghiên cứu của Akagi và cs (2019) [7] đã chỉ ra rằng, nhiễm sắc thể Y ngăn chặn sự phát triển của các cơ quan hoa cái, thúc đẩy sự phát triển hoa đực và biểu hiện của nó ở cây Kiwi dẫn đến sự phát triển cây đơn tính. 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. Việc sử dụng cặp môi SmY1 để xác định giới tính của cây *A. deliciosa* [16, 17] cho kết quả đáng tin cậy. Do đó, kết quả nghiên cứu này một lần nữa chứng minh hiệu quả của phương pháp này trong việc xác định giới tính đực cây Kiwi vàng. 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 [9]. Vì vậy, chỉ thị phân tử rất hữu ích để xác định giới tính ở giai đoạn phát triển ban đầu.

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

đối với mẫu lá được khử trùng bề mặt với 200 ppm AgNPs (bảng 3). 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 4, hình 2A và 2B).

Bảng 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.

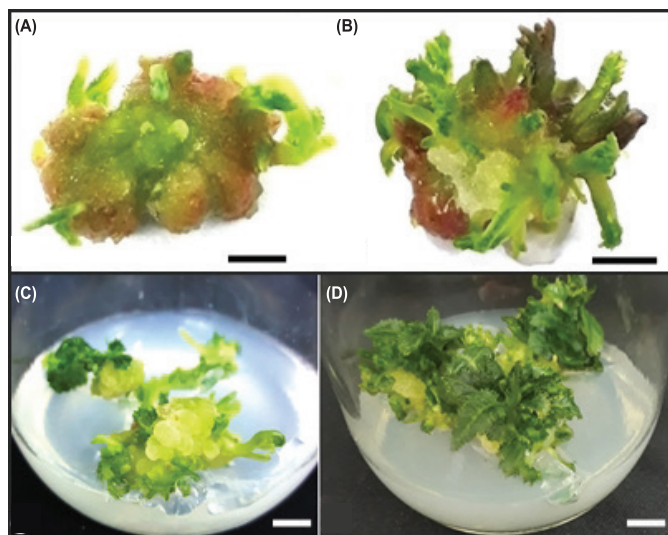
Chất khử trùng	Nồng độ	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu hoại tử (%)	Tỷ lệ mẫu sống và cảm ứng mô sẹo (%)	Hình thái mẫu
AgNPs	100 ppm	53,33 ^a	6,67 ^d	40,00 ^b	Mẫu cây hầu hết bị nhiễm
	200 ppm	35,56 ^b	13,33 ^{cd}	51,11 ^a	Mẫu cây xanh và ít tổn thương
	300 ppm	33,33 ^b	31,11 ^b	35,56 ^b	Mẫu cây chuyển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

Ghi chú: 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 4. Sự tái sinh chồi từ mẫu cây lá cây Kiwi vàng được khử trùng bằng AgNPs, HgCl₂ và NaOCl sau 8 tuần nuôi cấy.

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

Ghi chú: 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.



Hình 2. Tạo nguồn mẫu in vitro cây Kiwi vàng. (A, B) Tái sinh chồi từ mẫu lá khử trùng bằng HgCl₂ 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).

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, HgCl₂ và NaOCl để khử trùng các loại mẫu cây khác nhau (lá, đốt thân, chồi ngủ...) [18, 19]. Tuy nhiên, những chất khử trùng này thường gây độc, dễ làm tổn thương và ảnh hưởng tới hiệu quả tái sinh của mẫu cây [20]. 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... [21, 22]. Gần đây, AgNPs được sử dụng như là tác nhân khử trùng mẫu cây cây Dầu tây [23], sâm Ngọc Linh [24]. Trong nghiên cứu này, 200 ppm AgNPs không những có vai trò trong khử trùng mẫu cây mà còn có tác dụng ít làm tổn thương mẫu cây như chất khử trùng HgCl₂ 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.

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 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của dịch chiết hữu cơ lên khả năng tăng sinh cụm chồi cây Kiwi sau 8 tuần nuôi cấy.

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

Ghi chú: 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.

Môi trường nuôi cấy bổ sung 20% nước dừa cho hiệu quả tăng sinh cụm chồi tối ưu hơn các nồng độ nước dừa khác và dịch chiết khoai tây cũng như chuối xanh (bảng 5, hình 2C và 2D). Nguyễn Thị Cúc và cs (2014) [25] đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ như chuối, khoai tây, nước dừa lên *Paphiopedilum delenatii*, kết quả cho thấy, cả 3 nhóm hợp chất hữu cơ trên 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 (3,8 chồi/mẫu cây). Chen (1998) [26] 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 khô cao hơn đáng kể so với đối chứng. Islam và cs (2000) [27] báo cáo rằng, 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 [28].

Kết luận

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử trên nhiễm sắc thể Y được khuếch đại bằng cặp primer *SmY1_F/R* đã thành công trong nhận diện các mẫu Kiwi đực của giống *A. chinensis*. Ngoài ra, những mẫu lá của giống Kiwi đực sau khi xác định giới tính được sử dụng làm vật liệu cho quá trình vi nhân giống. Kết quả ghi nhận được cho thấy, mẫu lá được khử trùng với 200 ppm AgNPs cho hiệu quả khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi cao hơn các nồng độ khác của AgNPs, HgCl₂ và NaOCl. Chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 20% nước dừa cho hiệu quả tăng sinh chồi là tối ưu nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D.P. Richardson, et al. (2018), "The nutritional and health attributes of kiwifruit: a review", *European Journal of Nutrition*, **57**(8), pp.2659-2676.

[2] H. Huang (2016), *Kiwifruit: the Genus Actinidia*, Academic Press.

[3] L.G. Fraser, et al. (2009), "A gene-rich linkage map in a dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex determining chromosomes", *BMC Genomics*, **10**, DOI: 10.1186/1471-2164-10-102.

[4] R. Testolin, et al. (1999), *Sex Control in Actinidia is Monofactorial and Remains so in Polyploids (Sex Determination in Plants)*, BIOS Scientific, pp.173-181.

[5] R. Testolin, et al. (2016), *The Kiwifruit Genome*, Springer.

[6] Q. Zhang, et al. (2015), "High density interspecific genetic maps of kiwifruit and the identification of sex-specific markers", *DNA Research*, **22**, pp.367-375.

[7] T. Akagi, et al. (2019), "Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit", *Nature Plants*, **5**, pp.801-809.

[8] S. Murakami, et al. (2015), "The validity of marker-assisted selection using sex linked SCAR markers in kiwifruit (*Actinidia chinensis* cv 'Rainbow Red') seedlings", *Journal of Science and High Technology in Agriculture*, **27**(2), pp.68-74.

[9] H. Gustafson (2016), *Marker Assisted Selection of Sex Determination in Kiwiberry (Actinidia Arguta and Actinidia Kolomikta)*, Master's thesis, University of New Hampshire.

[10] H. Chau, et al. (2008), "Some results in manufacturing of nano silver and investigation of its application for disinfection", *Advances in Natural Sciences*, **9**, pp.241-248.

[11] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures", *Physiologia Plantarum*, **15**(3), pp.473-497.

[12] F.A. Akbaş, et al. (2007), "Micropropagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)", *International Journal of Agriculture and Biology*, **9**(3), pp.489-493.

[13] Dương Tấn Nhựt và cs (2013), "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*, **11**(3), tr.496-503.

[14] A. Atak, et al. (2012), "Sex determination of kiwifruit seedlings with molecular markers", *International Symposium on Biotechnology of Fruit Species*, **1048**, pp.197-203.

[15] D.B. Duncan (1955), "Multiple range and multiple F test", *Biometrics*, **11**, pp.1-42.

[16] A. Atak, et al. (2014), "Sex determination of kiwifruit seedlings with molecular markers", *Acta. Hort.*, **1048**, pp.197-203.

[17] M.A. Sakellariou, et al. (2015), "Agronomic, cytogenetic and molecular studies on hermaphroditism and self-compatibility in the Greek kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cultivar 'Tsechelidis'", *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **91**(1), pp.2-13.

[18] I. Mihaljević, et al. (2013), "In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'Oblačinska' sour cherry", *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, **58**(2), pp.117-126.

[19] H.T. Tung, et al. (2021a), "Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum", *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **57**(6), pp.897-906.

[20] Y. He, et al. (2017), "Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Alpinia katsumadai*, and their antioxidant, cytotoxicity and antibacterial activities", *RSC Advances*, **7**(63), pp.39842-39851.

[21] D. Kim, et al. (2017), "Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed", *RSC Advances*, **7**(58), pp.36492-36505.

[22] R. Sreelekshmi, et al. (2022), "Role of biogenic silver nanoparticles on hyperhydricity reversion in *Dianthus chinensis* L. an *in vitro* model culture", *Journal of Plant Growth Regulation*, **41**(1), pp.23-39.

[23] H.T. Tung, et al. (2021b), "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*, **145**(2), pp.393-403.

[24] D.M. Cuong, et al. (2021), "Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis* valuable medicinal plant", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **146**(3), pp.577-588.

[25] Nguyễn Thị Cúc và cs (2014), "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*, **36**, tr.250-256.

[26] F. Chen (1998), "Effects of salt strength and organic additives on the *in vitro* growth of protocorm like bodies and plantlets of *Oncidium Gower Ramsey*", *Journal Chinese Society for Horticultural Science*, **44**(4), pp.403-412.

[27] M. Islam, et al. (2000), "Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings", *Lindleyana*, **15**(2), pp.81-88.

[28] J. Arditti, C. Harrison (1977), *Vitamin Requirements and Metabolism in Orchids*, Cornell University Press, pp.157-175.