

Sử dụng DNA barcode trong phân tích đa dạng di truyền và nhận diện một số loài Kiwi (*Actinidia* spp.)

Nguyễn Thị Mỹ Hạnh^{1,2,3}, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đắc Khải¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Huỳnh Hữu Đức⁴, Nguyễn Trường Giang⁴, Hoàng Thị Như Phương⁵, Bùi Văn Lệ⁶, Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Cao đẳng nghề Đà Lạt, 9 Yersin, phường 10, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

⁴Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, 2374 quốc lộ 1A, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁵Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phù Đổng Thiên Vương, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

⁶Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 10/3/2022; ngày chuyển phân biện 12/3/2022; ngày nhận phân biện 5/4/2022; ngày chấp nhận đăng 9/4/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện trên 20 mẫu Kiwi thuộc chi *Actinidia*, trong đó có 18 mẫu được thu thập từ các nguồn nhập nội và 2 mẫu từ tự nhiên của Việt Nam. Nguồn gốc cũng như mối liên hệ di truyền giữa các mẫu thu thập được phân tích, đánh giá dựa trên các trình tự DNA trong lục lạp và nhân. Kết quả khuếch đại các trình tự này ở 20 mẫu đạt 75-95%, trong đó, các mẫu khuếch đại thành công đều có thể giải trình tự. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu thu thập và mẫu tham chiếu trên GenBank cho từng trình tự riêng rẽ *rbcL*, *matK* và ITS (Internal Transcript Spacer) cho thấy có sự phân nhóm di truyền giữa các mẫu thu thập và nguồn gốc di truyền của các mẫu nghiên cứu có thể từ 2 đến 3 nguồn khác nhau. Ngoài ra, khi tiến hành phân tích di truyền của 14 mẫu giống Kiwi thu thập dựa trên sự kết hợp của gen *rbcL*, gen *matK* và vùng ITS cho thấy có sự phân biệt rõ ràng thành 3 nhóm riêng biệt. Kết quả bước đầu về sử dụng chỉ thị phân tử DNA barcode với các trình tự *rbcL*, *matK* và ITS cho thấy hiệu quả nhất định trong việc xác định nguồn gốc ở mức độ loài, từ đó mở ra khả năng bảo tồn và khai thác bền vững nguồn gen các loài này.

Từ khóa: DNA barcode, Internal Transcript Spacer, Kiwi, *matK*, *rbcL*.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Using DNA barcodes for genetic relationship and identification of some *Actinidia* spp. species

Thi My Hanh Nguyen^{1,2,3}, Thanh Tung Hoang¹, Dac Khai Hoang¹, Thi Nhu Mai Nguyen¹, Quoc Luan Vu¹, Manh Cuong Do¹, Huu Duc Huynh⁴, Truong Giang Nguyen⁴, Thi Nhu Phuong Hoang⁵, Van Le Bui⁶, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology, 116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Dalat Vocational Training College, 9 Yersin Street, Ward 10, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

⁴Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, 2374 Highway 1A, Quarter 2, Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵Dalat University, 1 Phu Dong Thien Vuong Street, Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

⁶University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 10 March 2022; revised 5 April 2022; accepted 9 April 2022

Abstract:

The study was conducted on 20 Kiwi samples belonging to the genus *Actinidia*, including 18 imported samples and 2 samples collected from the natural environment in Vietnam. The origins and genetic relationships among the collected samples were analysed and evaluated based on chloroplast and nuclear DNA sequences. The amplification rates of interested sequences of all 20 samples ranged from 75 to 95%, and the amplicons were successfully sequenced. Results from analysing genetic relationships among collected samples and reference ones on GenBank for each sequence of *rbcL* gene, *matK* gene, and Internal Transcript Spacer (ITS) region showed that there is genetic classification among collected samples; genetic origins of these genus samples might be from 2-3 different sources. Additionally, the combination of *rbcL* gene, *matK* gene, and ITS region showed the phylogenetic and genetic diversity among 14 tested samples with three clear distinction clusters. The initial results of using markers of chloroplast and nuclear DNA barcode markers (*rbcL*, *matK*, and ITS) showed a certain effect in the identification of origins at the species level, thenceforth led to the potentiality of gene resources conserve and sustainably exploit towards these genera.

Keywords: *Actinidia*, DNA barcode, Internal Transcript Spacer, *matK*, *rbcL*.

Classification numbers: 1.6, 4.6

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

1. Đặt vấn đề

Kiwi (*Actinidia*) là một chi được tìm thấy chủ yếu ở miền nam Trung Quốc. Sau này, phân bố rộng rãi ở châu Á, từ các vùng nhiệt đới (vĩ độ 0°) tới các vùng ôn đới lạnh (50°N). Các loài *Actinidia* được tìm thấy từ Siberia đến Indonesia, từ Ấn Độ sang Nhật Bản [1]. Vào đầu thế kỷ XX, chi *Actinidia* du nhập vào châu Âu và châu Úc, phát triển mạnh thành ngành công nghiệp xuất khẩu trái cây này ở New Zealand. 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. Ngày nay, loài *A. chinensis* var.

chinensis và *A. chinensis* var. *deliciosa* có giá trị kinh tế cao và được dùng trong thương mại [2]. Hai loài này có những đặc điểm nổi bật như kích thước trái lớn, giàu vitamin A, vitamin C, acid amin, đặc biệt là hàm lượng vitamin C (ascorbate) trong quả Kiwi rất cao. Quả Kiwi của loài *A. chinensis* var. *deliciosa* Hayward chứa khoảng 85 mg ascorbate/100 g trọng lượng tươi, trong khi quả của loài *A. chinensis* var. *chinensis* “Hort16A” chứa đến 105-110 mg ascorbate/100 g trọng lượng tươi [3, 4]. So với trọng lượng trung bình của trái cây tươi, hàm lượng vitamin C của trái Kiwi cao gấp 1-2 lần so với cam, 10 lần so với chuối và 15 lần so với táo [5].

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

Ký hiệu	Đặc điểm lá		Mép lá	Cuống lá	Mặt phẳng
	Đỉnh lá	Hình dạng			
<i>Actinidia</i> 1	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		Màu đỏ sẫm, nhiều lông Dài: 2 cm Đường kính: 3 mm	
<i>Actinidia</i> 2		Lá: Mỏng, mặt trên màu xanh sáng 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, bề mặt có ít lông		Màu đỏ sẫm, nhiều lông Dài: 2 cm Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tim
<i>Actinidia</i> 3	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	Không có răng cưa, có ít lông	Màu đỏ nhạt, nhiều lông Dài: 2,5 cm Đường kính: 3 mm	
<i>Actinidia</i> 4	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 ít lông, mép lá có lông ngắn		Màu xanh nhạt, không có lông Dài: 2,5 cm Đường kính: 3 mm	
<i>Actinidia</i> 5	Nhọn bằng	Lá: Mỏng, mặt trên màu xanh hơi tối và mặt dưới có 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		Màu xanh nhạt, không có lông Dài: 4 cm, Đường kính: 2,5 mm	Hình tròn rộng
<i>Actinidia</i> 6	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: 1 cm, Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tim
<i>Actinidia</i> 7	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, 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</i> 8	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.		Màu xanh đậm, không có lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 2 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tròn
<i>Actinidia</i> 9	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, không có lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tim
<i>Actinidia</i> 10	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</i> 11	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</i> 12	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	
<i>Actinidia</i> 13	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	Không có răng cưa, có ít lông	Màu xanh, không có lông Dài: 2 cm Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tim
<i>Actinidia</i> 14	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
<i>Actinidia</i> 15	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</i> 16	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</i> 17	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</i> 18	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	
<i>Actinidia</i> 19	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 lông	Không có răng cưa, có ít lông	Màu đỏ đậm, nhiều lông. Dài: 3 cm Đường kính: 2,6 mm	Hình oval dài, có dạng hình tròn
<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	

Chi *Actinidia* có 54 loài [6] và hầu hết các loài này có thể giao phần với nhau rất dễ dàng [7, 8]. 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 [9]. Trong những năm gần đây, các đoạn gen lục lạp và nhân được sử dụng như là các chỉ thị phân tử có hiệu quả cao trong các nghiên cứu về sự tiến hóa của loài, bảo tồn nguồn gen và lai tạo giống [10, 11]. Năm 2013, các nhà khoa học đã xác định được toàn bộ hệ gen của *Actinidia*. Đến năm 2015, các nhà nghiên cứu đã cải tiến trình tự toàn bộ hệ gen hiện có của *A. chinensis*. Số lượng nhiễm sắc thể cơ bản là $x=29$. Trong tế bào DNA tồn tại ở 3 bào quan là: nhân (genomic DNA), ti thể (mitochondrial DNA) và lục lạp (chloroplast DNA). Bộ gen lục lạp của *Actinidia* chứa 113 gen đặc hiệu gồm: 79 gen mã hóa, 30 gen mã hóa tRNA và 4 gen mã hóa rRNA.

Ở Việt Nam, Kiwi chưa được trồng phổ biến mà chủ yếu được nhập khẩu từ New Zealand, Trung Quốc và sắp tới là từ Pháp. Trong khi đó, Lâm Đồng là nơi có khí hậu nhiệt đới phù hợp cho sự phát triển của cây Kiwi, nếu nghiên cứu trồng thử nghiệm thành công cây Kiwi sẽ góp phần đa dạng hoá cây trồng, nâng cao thu nhập cho người nông dân, giảm giá thành sản phẩm, giúp người tiêu dùng dễ dàng tiếp cận với loại trái cây này so với việc nhập khẩu trái Kiwi với giá cao như hiện nay. Tuy nhiên, các nghiên cứu về đa dạng di truyền của cây Kiwi tại Việt Nam vẫn còn hạn chế. Chỉ có một số nghiên cứu về nhân giống vô tính cây Kiwi như khảo sát 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 Kiwi [12]. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này để đánh giá đa dạng di truyền và mối quan hệ phát sinh loài giữa các mẫu Kiwi nhập nội và tự nhiên để ứng dụng trong việc lai tạo giống mới thích nghi với điều kiện Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu lá của 20 cây Kiwi (1 năm tuổi) có nguồn gốc thương mại, tự nhiên được thu thập để đánh giá mối quan hệ di truyền và nhận diện loài (bảng 1 và hình 1).

2.2. Ly trích DNA tổng số

DNA tổng số từ mẫu lá được ly trích bằng quy trình CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromid) cơ bản [13] với một số điều chỉnh. Mẫu lá (100 mg) được nghiền trong nitor lỏng và trộn với 500 μ l CTAB 2% + PVP 2%, sau đó ủ ở 65°C trong 60 phút. Hỗn hợp được ly tâm ở 14.000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi, rồi xử lý bằng 4 μ l RNAase ở 37°C trong 5 phút. Tiếp theo, dịch nổi được trộn với 500 μ l chloroform:isoamyl alcohol (24:1), lắc đều, ly tâm 14.000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi (450-500 μ l). DNA được tủa bằng ethanol tuyệt đối (tỷ lệ 1:1) và 1/2 thể tích NaCl 5 M, sau đó ủ trên đá 1 giờ và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Tủa DNA được rửa hai lần với ethanol 70%, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, để khô và cuối cùng hòa tan trong 200 μ l nước cất vô trùng.

2.3. Khuếch đại Polymerase Chain Reaction

Phản ứng PCR được thực hiện để khuếch đại các vùng *rbcL*, *matK*, ITS sử dụng các cặp primer tương ứng: *rbcL1-F/rbcL 724-R*, *matK-KIM3-F/matK-KIM1-R*, ITS1-5F/ITS4-R (bảng 2). Mỗi phản ứng PCR (20 μ l) bao gồm: 0,2 mM dNTP mix, 1U enzyme DreamTaq polymerase, buffer DreamTaq 10X, 0,4 μ M mỗi primer, nước cất vô trùng và 1 μ l DNA (100-500 ng/ μ l). Chu trình PCR: tiền biến tính 95°C (1 phút), 30 chu kỳ (biến tính 95°C, 30 giây; bắt cặp tại nhiệt độ tương ứng từng primer trong 30 giây; kéo dài 72°C, 40 giây), hoàn thiện 72°C (10 phút). Kết quả được phân tích trên gel agarose 1,2%, nhuộm ethidium bromide, chạy điện thế 100V (30-45 phút) và ghi hình bằng máy GelDoc-It@2315.

Bảng 2. Các primer được sử dụng trong nghiên cứu.

Primer	Trình tự (5' → 3')	Tài liệu tham khảo
<i>rbcL1-F</i>	ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC	[14]
<i>rbcL 724-R</i>	TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC	
<i>matK-KIM3-F</i>	CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G	[15]
<i>matK-KIM1-R</i>	ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC	
ITS1-5F	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	[16]
ITS4-R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

2.4. Giải trình tự và phân tích mối quan hệ di truyền

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, Seoul 08511, Hàn Quốc).

Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.0 (The Molecular Evolution Genetics Analysis) với hệ số bootstrap 1000.

3. Kết quả và bàn luận

DNA tổng số của các mẫu phân tích được định lượng và kiểm tra độ tinh sạch. Kết quả cho thấy các mẫu có độ tinh sạch cao với OD260/OD280 nằm trong khoảng 1,24-1,98. Nồng độ DNA tổng số ở các mẫu nằm trong khoảng 111,2-280 ng/ μ l đảm bảo tiêu chuẩn và chất lượng cho các bước tiếp theo.

3.1. Polymerase Chain Reaction và giải trình tự DNA

Kết quả PCR trên 20 mẫu Kiwi cho thấy, các vùng *rbcL*, *matK*, và ITS2 được khuếch đại rõ ràng với các cặp primer *rbcL1-F/rbcL 724-R*, *matK-KIM3-F/matK-KIM1-R* và ITS1-5F/ITS4-R. Tỷ lệ khuếch đại DNA barcode giữa các vùng này khác nhau, lần lượt đạt 95% (*rbcL*), 80% (*matK*), và 75% (ITS2). Sản phẩm PCR thành công được giải trình tự tại Công ty Macrogen (Seoul, Hàn Quốc). Sau khi hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC, kích thước các trình tự thu được lần lượt là 701-720 bp (*rbcL*), 773-858 bp (*matK*) và 706-715 bp (ITS2) (bảng 3). Tỷ lệ giải trình tự đạt 100% trên các mẫu khuếch đại thành công, trong khi nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ khuếch đại đạt 100% nhưng tỷ lệ giải trình tự chỉ đạt 72-99,3% [17]. Loài *Actinidia*

có sự biến đổi sinh học lớn khi được trồng ở các vùng địa lý và khí hậu khác nhau, dễ dàng lai tự nhiên, tạo ra các giống lai. Điều này thể hiện sự biến đổi di truyền đáng kể ở một số loài thuộc chi *Actinidia* [18].

Bảng 3. Tỷ lệ khuếch đại các vùng DNA barcode *rbcL*, *matK*, ITS2 của các mẫu Kiwi.

Thứ tự	Mẫu	<i>rbcL</i>		<i>matK</i>		ITS	
		Sản phẩm PCR	Kích thước (bp)	Sản phẩm PCR	Kích thước (bp)	Sản phẩm PCR	Kích thước (bp)
1	<i>Actinidia</i> 1	x	712	x	855	x	706
2	<i>Actinidia</i> 2	x	710	x	853	x	707
3	<i>Actinidia</i> 3	x	710	x	773	x	717
4	<i>Actinidia</i> 4	x	718	-	-	-	-
5	<i>Actinidia</i> 5	x	707	x	850	x	722
6	<i>Actinidia</i> 6	x	708	x	858	x	708
7	<i>Actinidia</i> 7	x	706	x	850	x	711
8	<i>Actinidia</i> 8	x	706	x	779	x	711
9	<i>Actinidia</i> 9	x	701	x	773	x	712
10	<i>Actinidia</i> 10	x	720	x	800	x	715
11	<i>Actinidia</i> -11	x	701	-	-	-	-
12	<i>Actinidia</i> 12	x	708	x	775	x	706
13	<i>Actinidia</i> 13	x	711	x	774	x	710
14	<i>Actinidia</i> 14	x	710	x	776	-	-
15	<i>Actinidia</i> 15	x	701	x	773	x	709
16	<i>Actinidia</i> 16	x	701	-	-	-	-
17	<i>Actinidia</i> 17	-	-	-	-	x	708
18	<i>Actinidia</i> 18	x	712	x	773	-	-
19	<i>Actinidia</i> 19	x	715	x	773	x	706
20	<i>Actinidia</i> 20	x	701	x	775	x	706
Tỷ lệ khuếch đại và giải trình tự DNA (%)	19/20 (95%)	19/19 (100%)	16/20 (80%)	16/16 (100%)	15/20 (75%)	15/15 (100%)	

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

Kết quả cho thấy mức độ tương đồng và độ bao phủ của các DNA barcode từ các mẫu Kiwi so với trình tự trên NCBI như sau: *rbcL* (99-100% tương đồng, 97,7-100% bao phủ), *matK* (99,7-100% tương đồng, 99-100% bao phủ), ITS (87-100% tương đồng, 95,6-100% bao phủ). Điều này chứng tỏ các vùng gen *rbcL*, *matK*, ITS khuếch đại từ các mẫu nghiên cứu có độ tương đồng cao với dữ liệu đã công bố trên NCBI.

Phân tích trình tự DNA xác định các vùng bảo tồn, vùng biến đổi và chỉ số Pi của từng gen như sau: *rbcL* (694/701 vùng bảo tồn, 7/701 vùng biến đổi, Pi=6/701), *matK* (766/773 vùng bảo tồn, 7/773 vùng biến đổi, Pi=3/773), ITS (675/706 vùng bảo tồn, 68/706 vùng biến đổi, Pi=22/706). Từ kết quả này, cây phát sinh loài đã được xây dựng dựa trên trình tự DNA các vùng *rbcL*, *matK*, ITS để phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu Kiwi.

3.2.1. So sánh các trình tự *rbcL* của 19 mẫu Kiwi được thu thập

Trình tự DNA gen *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) và 675 (T/C).

Dựa trên kết quả khuếch đại và giải trình tự gen *rbcL* của 19/20 mẫu Kiwi thu thập, mối quan hệ di truyền giữa các mẫu này và 9 mẫu tham chiếu trên GenBank đã được xây dựng (không trình bày). Kết quả thiết lập cây phát sinh chủng loài chia các mẫu Kiwi phân tích thành bốn nhóm chính. Trong đó, 10 mẫu Kiwi thu thập thuộc nhóm I, cùng nhóm với các mẫu tham chiếu thuộc các loài như *A. eriantha*, *A. venosa*, *A. latifolia*, *A. rufa*; và 9 mẫu Kiwi còn lại thuộc nhóm III, cùng nhóm với các mẫu tham chiếu thuộc các loài như *A. deliciosa*, *A. chinensis*. Đối với nhóm II chỉ gồm các mẫu tham chiếu thuộc các loài *A. arguta*, *A. kolomika* và nhóm IV chỉ gồm một mẫu tham chiếu thuộc loài *A. valvata*. Kết quả phân tích dựa trên trình tự vùng *rbcL* của 19 mẫu Kiwi cho thấy rằng, nguồn gốc di truyền của các mẫu Kiwi thu thập chỉ tập trung ở một số loài nhất định và có sự phân nhóm thành 2 nguồn rõ rệt (bảng 4).

Bảng 4. Vị trí sai khác của các mẫu Kiwi dựa trên trình tự gen *rbcL*.

Thứ tự	Mẫu	Vị trí biến đổi						
		47	272	388	640	661	673	675
1	<i>Actinidia</i> 2	T	G	A	G	T	T	A
2	<i>Actinidia</i> 3	T	G	A	G	T	T	A
3	<i>Actinidia</i> 4	T	G	A	G	T	T	A
4	<i>Actinidia</i> 5	T	G	A	G	T	T	A
5	<i>Actinidia</i> 10	T	A	G	A	A	T	A
6	<i>Actinidia</i> 13	T	A	G	A	A	T	A
7	<i>Actinidia</i> 14	T	A	A	A	A	T	A
8	<i>Actinidia</i> 15	T	A	A	G	A	T	C
9	<i>Actinidia</i> 16	T	G	A	G	A	T	A
10	<i>Actinidia</i> 20	T	A	A	G	A	T	A
11	<i>Actinidia</i> 1	A	G	A	G	A	T	A
12	<i>Actinidia</i> 6	A	G	A	G	A	C	A
13	<i>Actinidia</i> 7	A	G	A	G	A	C	A
14	<i>Actinidia</i> 8	A	G	A	G	A	A	A
15	<i>Actinidia</i> 9	A	G	A	G	A	A	A
16	<i>Actinidia</i> 11	A	G	A	G	A	T	A
17	<i>Actinidia</i> 12	A	G	A	G	A	T	A
18	<i>Actinidia</i> 18	A	G	A	G	A	T	A
19	<i>Actinidia</i> 19	A	G	A	G	A	T	A

3.2.2. So sánh các trình tự *matK* của 16 mẫu Kiwi được thu thập

Dựa trên kết quả khuếch đại và giải trình tự gen *matK* của 16/20 mẫu Kiwi được thu thập, mối quan hệ di truyền giữa các mẫu này và 9 mẫu tham chiếu trên GenBank đã được xây dựng (không trình bày). 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. kolomikta*, *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 gen *matK* của 16

mẫu Kiwi cho thấy rằng, nguồn gốc di truyền của 15/16 mẫu Kiwi thu thập có mối quan hệ gần với 2 loài *A. deliciosa* và *A. chinensis*, trong khi đó mẫu Kiwi-2 còn lại có thể có mối quan hệ gần với loài *A. eriantha* hoặc *A. latifolia*.

Trình tự DNA gen *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 (bảng 5). Kết quả phân tích tỷ lệ phân nhóm di truyền của các mẫu Kiwi được thu thập dựa trên gen *matK* cho thấy chỉ có mẫu Kiwi được thu thập từ nguồn tự nhiên Việt Nam thuộc một nhóm, tách riêng với các mẫu còn lại. Trong đó, mẫu cây Kiwi cái thu thập từ nguồn tự nhiên Việt Nam có mối quan hệ di truyền gần với 12 mẫu Kiwi thương mại.

Bảng 5. Vị trí sai khác của các mẫu Kiwi dựa trên trình tự gen *matK*.

Thứ tự	Mẫu	Vị trí sai khác						
		73	304	334	457	492	535	555
1	<i>Actinidia 2</i>	G	G	C	G	T	A	G
2	<i>Actinidia 3</i>	T	C	A	G	T	A	A
3	<i>Actinidia 5</i>	T	C	A	G	T	A	A
4	<i>Actinidia 1</i>	T	C	A	A	A	G	A
5	<i>Actinidia 6</i>	T	C	A	A	A	G	A
6	<i>Actinidia 7</i>	T	C	A	A	A	G	A
7	<i>Actinidia 8</i>	T	C	A	A	A	G	A
8	<i>Actinidia 9</i>	T	C	A	-	A	G	A
9	<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

3.2.3. So sánh các trình tự ITS của 16 mẫu Kiwi được 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.

Dựa trên kết quả khuếch đại và giải trình tự thành công vùng ITS của 15/20 mẫu Kiwi được thu thập, mối quan hệ di truyền giữa các mẫu này và 10 mẫu tham chiếu trên GenBank đã được

xây dựng (không trình bày). 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. kolomikta*, *A. valvata*, *A. lasioclada*. 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 Kiwi-2 và tương đối tách biệt với 2 nhóm kia.

Tóm lại, trình tự gen *rcbL* và *matK* trong lục lạp có 7 vị trí sai khác trong khi đó vùng ITS trong nhân có tới 68 vị trí sai khác. Kết quả 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 (bảng 6).

Dựa trên kết quả phân tích mối quan hệ di truyền của 20 mẫu Kiwi thu thập dựa trên từng vùng trình tự như *rcbL*, *matK*, ITS riêng rẽ cho thấy đa số các mẫu thu thập có quan hệ di truyền gần với hai loài *A. deliciosa* và *A. chinensis*. Trong đó mẫu *Actinidia 2* có nguồn gốc gần với loài *A. 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 [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 ti thể di truyền từ mẹ [19]; (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 [9, 20]. 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.

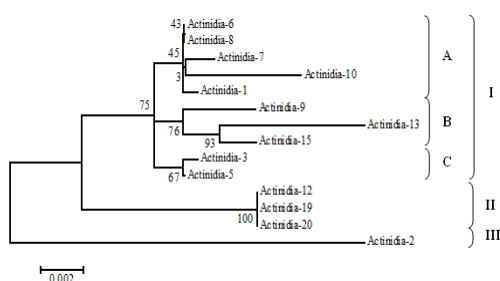
3.2.4. So sánh các trình tự *matK* và ITS của 14 mẫu Kiwi được thu thập

Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA kết hợp gen *matK* và vùng ITS chia làm 3 nhóm chính (hình 1). Nhóm I chia làm 2 nhóm nhỏ gồm nhóm IA gồm các mẫu *Actinidia 1*, 6, 7, 8 và nhóm IB gồm các mẫu Kiwi 10, 18, 21, nhóm IC gồm các mẫu *Actinidia 3*, 5. Nhóm II gồm 3 mẫu *Actinidia 12*, 19, 20. Nhóm II gồm các mẫu *Actinidia 2*.

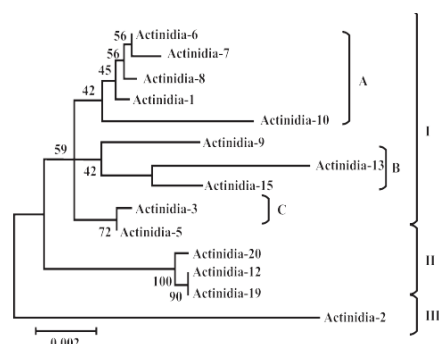
Bảng 6. Vị trí sai khác của các loài Kiwi dựa trên trình tự DNA vùng Internal Transcript Spacer.

Mẫu	Vị trí sai khác														
	37	40	48	49	50	57	73	74	79	80	81	83	86	92	93
Actinidia 2	T	A	A	C	T	C	C	T	C	T	C	C	A	A	A
Actinidia 3	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 5	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 9	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	T	G
Actinidia 17	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 1	T	A	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 6	T	A	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 7	T	A	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 8	T	A	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 12	T	A	C	T	A	T	C	T	T	T	C	T	G	-	A
Actinidia 13	T	A	C	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 15	T	A	C	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	A
Actinidia 19	T	A	C	T	A	T	C	T	T	T	C	T	G	-	A
Actinidia 20	T	A	C	T	A	T	C	T	T	T	C	T	G	-	A
Actinidia 10	G	G	A	T	A	T	A	C	C	C	A	C	G	A	A
Mẫu	Vị trí sai khác														
	97	109	110	114	117	153	164	177	179	182	189	198	210	220	221
Actinidia 2	G	G	G	C	T	C	G	C	A	C	C	G	G	C	A
Actinidia 3	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	A
Actinidia 5	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	A
Actinidia 9	T	A	G	A	C	A	T	T	G	C	C	G	T	C	A
Actinidia 17	T	A	G	A	C	A	T	T	G	C	C	G	G	C	T
Actinidia 1	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	T
Actinidia 6	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	T
Actinidia 7	T	A	G	A	T	C	T	T	A	C	C	G	G	C	T
Actinidia 8	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	T
Actinidia 12	T	A	A	A	C	C	T	T	A	C	T	A	G	C	A
Actinidia 13	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	A
Actinidia 15	T	A	G	A	T	A	T	T	G	C	C	G	G	C	A
Actinidia 19	T	A	A	A	C	C	T	T	A	C	T	A	G	C	A
Actinidia 20	T	A	A	A	C	C	T	T	A	C	T	A	G	C	A
Actinidia 10	T	A	G	A	C	A	T	T	G	T	C	G	G	A	T
Mẫu	Vị trí sai khác														
	236	279	280	295	322	502	529	538	546	479	487	518	519	532	542
Actinidia 2	T	C	A	A	G	C	C	G	C	G	C	C	C	G	G
Actinidia 3	A	A	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Actinidia 5	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Actinidia 9	A	A	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Actinidia 17	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Actinidia 1	A	A	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Actinidia 6	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Actinidia 7	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G

Mẫu	Vị trí sai khác														
	37	40	48	49	50	57	73	74	79	80	81	83	86	92	93
Actinidia 8	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Actinidia 12	A	C	G	A	G	C	T	A	T	A	T	T	T	G	A
Actinidia 13	A	A	G	A	G	T	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Actinidia 15	A	A	G	A	G	C	C	A	C	A	T	T	T	A	G
Actinidia 19	A	C	G	A	G	C	T	A	T	A	T	T	T	G	A
Actinidia 20	A	C	G	A	G	C	T	A	T	A	T	T	T	G	A
Actinidia 10	A	C	G	T	T	C	C	A	C	A	T	T	T	G	G
Mẫu	Vị trí sai khác														
	551	579	606	609	614	617	621	630	631	632	637	641	646	650	651
Actinidia 2	G	T	C	T	T	C	C	T	T	G	C	C	C	G	C
Actinidia 3	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 5	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 9	G	T	T	C	T	G	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 17	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 1	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 6	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 7	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 8	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 12	A	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	T	A	T
Actinidia 13	G	T	T	C	A	A	T	A	A	T	A	T	C	A	T
Actinidia 15	G	A	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Actinidia 19	A	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	T	A	T
Actinidia 20	A	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	T	A	T
Actinidia 10	G	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T
Mẫu	Vị trí sai khác														
	653	654	661	662	664	671	673	679							
Actinidia 2	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 3	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 5	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 9	T	C	G	A	C	T	A	G							
Actinidia 17	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 1	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 6	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 7	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 8	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 12	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 13	A	T	C	G	G	T	C	G							
Actinidia 15	A	T	G	A	T	T	A	G							
Actinidia 19	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 20	A	C	G	A	C	C	A	G							
Actinidia 10	A	C	G	A	C	C	A	C							



Hình 1. Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự gen *matK* và vùng Internal Transcript Spacer.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA của các gen *rbcL*, *matK* và vùng Internal Transcript Spacer.

3.2.5. So sánh kết hợp các trình tự gen *rbcL*, gen *matK* và vùng ITS *matK* và ITS của 14 mẫu Kiwi được thu thập

Cây phát sinh chủng loài của 14 mẫu Kiwi dựa trên trình tự DNA kết hợp các gen *rbcL*, *matK* và vùng ITS chia làm 3 nhóm chính (hình 2). Nhóm I chia làm 2 nhóm nhỏ gồm nhóm IA gồm các mẫu *Actinidia* 1, 6, 7, 8, nhóm IB gồm các mẫu Kiwi 10, 18, 21, nhóm IC gồm các mẫu *Actinidia* 3, 5. Nhóm II gồm 3 mẫu *Actinidia* 12, 19, 20. Nhóm III gồm các mẫu *Actinidia* 2.

Kết quả trên cho thấy, các vùng gen khác nhau có hiệu quả đánh giá mối quan hệ di truyền và xác định giống khác nhau. Nghiên cứu này cho thấy 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 lại 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.

4. Kết luận

Nghiên cứu cho thấy, dựa trên gen *rbcL*, gen *matK* và vùng ITS có thể xác định mối quan hệ di truyền một cách tương đối giữa 20 mẫu Kiwi thu thập. Bước đầu có thể xác định được nguồn gốc của các mẫu giống Kiwi này từ các loài *A. deliciosa* và *A. chinensis* chiếm đa số; nguồn thứ 2 từ loài *A. callosa* và nguồn thứ ba từ loài *A. latifolia*. 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. Từ kết quả trên cho thấy, việc ứng dụng các chỉ thị phân tử DNA barcode trong việc nghiên cứu và đánh giá di truyền trên các cây thuộc chi *Actinidia* là khả thi. Tuy nhiên, việc xác định chính xác từng mẫu ở mức độ dưới loài cần những nghiên cứu, phân tích thêm bằng các kỹ thuật và chỉ thị phân tử khác nhằm đảm bảo tính chính xác và độ tin cậy của phương pháp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với mã số đề tài NCXS01.03/22-24. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Z.X. Cui (1993), *Zhongguo Mihoutao Actinidia in China*, Jinan: Shandong Science and Technology Publisher, 700pp.
- [2] H.W. Huang, A.R. Ferguson (2006), "Actinidia in China: Natural diversity, phylogeographical evolution, interspecific gene flow and kiwifruit cultivar improvement", *VI International Symposium on Kiwifruit*, **753**, pp.31-40, DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.753.1.
- [3] A.R. Ferguson, E.A. MacRae (1991), "Vitamin C in Actinidia", *II International Symposium on Kiwifruit*, **297**, pp.481-488, DOI: 10.17660/ActaHortic.1992.297.63.
- [4] A.R. Ferguson (2003), "Actinidia cultivars, 2003 - A perspective from New Zealand. Actinidia, the fruit novelty of the 20th century", *National Conference of the Italian Horticultural Society*, **21**, pp.51-67.
- [5] M.C.M. Vissers, A.C. Carr, J.M. Pullar, et al. (2013) "The bioavailability of vitamin C from kiwifruit", *Advances in Food and Nutrition Research*, **68**, pp.125-147, DOI: 10.1016/B978-0-12-394294-4.00007-9.
- [6] J.Q. Li, X.W. Li, D.D. Soejarto (2007), *Actinidiaceae, Science Press and Missouri Botanical Garden*, pp.334-360.
- [7] A.M. Hirsch, R. Testolin, S. Brown, et al. (2001), "Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit)", *Plant Cell Reports*, **20**(6), pp.508-516, DOI: 10.1007/s002990100340.
- [8] R. He, P. Liu, B. Jia, et al. (2019), "Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae strains from different geographic regions in China", *Phytopathology*, **109**(3), pp.347-357, DOI: 10.1094/PHYTO-06-18-0188-R.
- [9] A.R. Ferguson, H. Huang (2007), "Genetic resources of kiwifruit: Domestication and breeding", *Horticultural Reviews*, **33**, DOI: 10.1002/9780470168011.ch1.
- [10] J. Chat, B. Jäuregui, R.J. Petit, et al. (2004), "Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies", *American Journal of Botany*, **91**(5), pp.736-747, DOI: 10.3732/ajb.91.5.736.
- [11] J.Q. Li, X.W. Li, D.D. Soejarto (2007), "Revision of the genus *Actinidia* from China", *Acta Horticulturae*, **753**(1), pp.41-44, DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.753.2.
- [12] D.T. Nhut, T.T.T. Ha, T.T. Huong, et al. (2012), "Study the formation of callus and single cell of Kiwi (*Actinidia deliciosa*)", *Academia Journal of Biology*, **34**(4), pp.505-514.
- [13] J.J. Doyle, J.L. Doyle (1987), "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue", *Phytochemical Bulletin*, **19**, pp.11-15.
- [14] T. Takamiya, P. Wongsawad, A. Sathapattayanon, et al. (2014), "Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse groups, *Dendrobium* section *Dendrobium* and allies", *Aob Plants*, **6**, DOI: 10.1093/aobpla/plu045.
- [15] H. Topik, T. Yukawa, I. Motomi (2005), "Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): Insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences", *Journal of Plant Research*, **118**(4), pp.271-284, DOI: 10.1007/s10265-005-0217-3.
- [16] T. Takamiya, P. Wongsawad, A. Tajima, et al. (2011), "Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **34**(5), pp.779-782, DOI: 10.1248/bpb.34.779.
- [17] B. Weihong, D. Li, X. Li (2018), "DNA barcoding of *Actinidia* (Actinidiaceae) using internal transcribed spacer, *matK*, *rbcL* and *trnH-psbA*, and its taxonomic implication", *New Zealand Journal of Botany*, **56**(4), pp.360-371, DOI: 10.1080/0028825X.2018.1491009.
- [18] H. Huang (2016), *Kiwifruit: The Genus Actinidia*, Academic Press, 350pp.
- [19] J. Chat, L. Chalal, R.J. Petit (1999), "Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit", *Theoretical and Applied Genetics*, **99**(1), pp.314-322, DOI: 10.1007/s001220051238.
- [20] L. Li, C.H. Zhong, D.W. Li (2013), "Diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit in China", *Proceedings of 1st International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit (Psa)*, Mt Maunganui, New Zealand.