

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**ĐÁNH GIÁ SƠ BỘ MỨC ĐỘ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA
QUẦN THỂ ĐIỀU (*Acanardium occidentale L.*) HIỆN
ĐƯỢC TRỒNG TẠI TỈNH BÌNH ĐỊNH BẰNG
KỸ THUẬT RAPD**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2002 – 2006

Giáo viên hướng dẫn:

TS. BÙI MINH TRÍ

Sinh viên thực hiện:

PHAN HỮU XUÂN

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 8/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**ĐÁNH GIÁ SƠ BỘ MỨC ĐỘ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA
QUẦN THỂ ĐIỀU (*Acanardium occidentale* L.) HIỆN
ĐƯỢC TRỒNG TẠI TỈNH BÌNH ĐỊNH
BẰNG KỸ THUẬT RAPD VÀ AFLP**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2002 – 2006

Giáo viên hướng dẫn:

TS. BÙI MINH TRÍ

Sinh viên thực hiện:

PHAN HỮU XUÂN

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 3/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**ĐÁNH GIÁ SƠ BỘ MỨC ĐỘ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA
QUẦN THỂ ĐIỀU (*Acanardium occidentale* L.)
HIỆN ĐƯỢC TRỒNG TẠI TỈNH BÌNH ĐỊNH
BẰNG KỸ THUẬT RAPD VÀ AFLP**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2002 – 2006

Giáo viên hướng dẫn:

TS. BÙI MINH TRÍ

Sinh viên thực hiện:

PHAN HỮU XUÂN

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 8/2006

LỜI CẢM ƠN

Tất cả những gì con có được ngày hôm nay và sẽ có được trong tương lai đều bắt nguồn từ công lao sinh thành, dưỡng dục của cha mẹ. Con khắc ghi trọn đời công ơn cha mẹ đã hy sinh để cho con bao điều tốt đẹp như ngày hôm nay.

Em xin chân thành gửi lòng biết ơn đến:

- Ban Giám Hiệu Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM.
- Ban Giám Đốc Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hoá – Sinh, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
- Ban Chủ nhiệm và các Thầy – Cô thuộc Bộ môn Công Nghệ Sinh Học.
- Đã chăm lo và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho em trong quá trình học tập và trong thời gian hoàn thành đề tài.

Em xin trân trọng biết ơn đến:

- Thầy TS. Bùi Minh Trí – giáo viên hướng dẫn đề tài.
- Chị: Phan Đặng Thái Phương, chị Liên, chị Huệ, chị Hưng, anh Thế, và anh chị ở TT Phân tích Thí nghiệm Hoá Sinh – Trường ĐH Nông Lâm Tp.HCM.

Đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ em trong suốt quá trình thực hiện khoá luận tốt nghiệp.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến những người nông dân tại tỉnh Bình Định đã tận tình giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện điều tra và thu thập mẫu lá điều.

Cuối cùng tôi xin chân thành cảm ơn những người bạn cùng lớp với tôi đã giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập tại Trường và thời gian làm đề tài tốt nghiệp.

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 8/2006

Phan Hữu Xuân

TÓM TẮT

PHAN HỮU XUÂN, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, tháng 8/2005, “BUỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA QUẦN THỂ ĐIỀU (*Anacardium occidentale* L.) TẠI TỈNH BÌNH ĐỊNH BẰNG KỸ THUẬT RAPD”.

Giảng viên hướng dẫn: TS. BÙI MINH TRÍ.

Thời gian thực hiện từ tháng 3/2006 đến tháng 6/2006 tại tỉnh Bình Định và tại Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hoá Sinh, trường Đại Học Nông Lâm Tp. HCM.

Đề tài được thực hiện trên đối tượng là cây điều hiện đang được trồng tại tỉnh Bình Định. Cây điều là một loại cây công nghiệp quan trọng của Việt Nam. Để có thể đề ra một chiến lược phát triển cây điều lâu dài đem lại lợi ích kinh tế cao, phải có những chương trình bảo tồn, phổ biến những giống điều tốt, thích nghi trên diện rộng và lai tạo những giống điều có chất lượng ưu việt so với các giống hiện có. Muốn vậy trước hết phải đánh giá được mức độ đa dạng di truyền của quần thể cây điều hiện có. Do đó, chúng tôi sử dụng kỹ thuật RAPD

Các kết quả đạt được:

- Thu thập được 50 mẫu lá của những cây điều có những đặc điểm nổi bật (về năng suất, đặc điểm thực vật học,...) trên địa 3 huyện của tỉnh.
- Thực hiện tách chiết DNA 50 mẫu lá, kết quả thu được 50 mẫu DNA có chất lượng đạt yêu cầu để thực hiện kỹ thuật RAPD.
- Thực hiện phản ứng PCR – RAPD sử dụng primer 11 với 50 mẫu DNA, kết quả có 50 mẫu thực hiện thành công. Nhận diện được 8 band, trong đó có 6 band đồng hình và 2 band đa hình. Những band đa hình có độ dài khoảng 650 base pairs, 850 base pairs có thể là những band đặc trưng của cây điều khi thực hiện phản ứng PCR – RAPD sử dụng primer 11. Những band đồng hình có độ dài khoảng 200 base pairs, 400 base pairs, 600 base pairs, 700 base pairs, 750 base pairs, 800 base pairs, 900 base pairs, có thể là những band đặc trưng của cây điều khi thực hiện phản ứng PCR – RAPD Những band đa

hình có độ dài khoảng 650 base pairs, 850 base pairs có thể khá đặc biệt, có thể được nghiên cứu thêm và sử dụng như là chỉ thị phân tử của những tính trạng đáng quan tâm. Qua kỹ thuật RAPD đánh giá tính đa dạng di truyền của quần thể điều tại tỉnh Bình Định ở mức trung bình.

MỤC LỤC

Đề mục.....	Trang
Trang tựa	i
Lời cảm ơn	ii
Tóm tắt	iii
Mục lục.....	V
Chương I: Giới thiệu	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích và yêu cầu.....	2
1.2.1. Mục đích	2
1.2.2 Yêu cầu	2
1.3. Hạn chế của đề tài.	2
1.4. Giới hạn khóa luận.....	3
Chương II: Tổng quan tài liệu	4
2.1. Giới thiệu về cây điều.....	4
2.1.1. Nguồn gốc.....	4
2.1.2. Đặc điểm hình thái.	5
2.1.2.1. Thân và cành	5
2.1.2.2. Rễ.	5
2.1.2.3. Lá và tán lá.....	5
2.1.2.4. Hoa.....	5
2.1.2.5. Hạt và quả điều.	7
2.1.3. Đặc điểm sinh thái.....	7
2.1.3.1. Điều kiện khí hậu.	7
2.1.3.2. Điều kiện đất đai	9
2.1.4. Sự phân bố.....	9
2.1.4.1. Vùng trồng điều ưu tiên I	10
2.1.4.2. Vùng trồng điều ưu tiên II	10
2.1.4.3. Vùng trồng điều ưu tiên III	10
2.1.5. Đa dạng sinh học cây điều	10

2.1.5.1. Xét về hình dạng cây	10
2.1.5.2. Xét về màu sắc lá	11
2.1.5.3. Xét về hoa	11
2.1.5.4. Xét về trái	11
2.1.5.5. Xét về hạt và năng suất hạt.....	11
2.1.5.6. Xét về di truyền	12
2.2 Công dụng	12
2.2.1 Sản phẩm chính.....	12
2.2.2 Sản phẩm phụ	13
2.3 Tình hình sản xuất điều trên thế giới.....	13
2.4 Tình hình sản xuất điều ở Việt Nam.	14
2.5 Đa dạng sinh học.....	19
2.5.1 Định nghĩa đa dạng sinh học.	19
2.5.2 Tầm quan trọng của đa dạng sinh học.....	19
2.5.3 Phân loại đa dạng sinh học.	19
2.5.4 Hiện trạng về đa dạng sinh học ở Việt Nam	20
2.6. Thông tin di truyền và phương pháp nghiên cứu tính đa dạng di truyền.	20
2.6.1. Thông tin di truyền.	20
2.6.2. Phương pháp chiết tách DNA.....	21
2.6.3. Các chỉ thị dùng trong nghiên cứu đa dạng di truyền.....	22
2.6.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	23
2.6.3.2. SSCP (Single - Strand Conformation Polymorphism)	23
2.6.3.3. Microsatellite (SSR: Simple Sequence Repeat).....	24
2.6.3.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).	25
2.6.3.5. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).	29
Chương III: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu.....	36
3.1. Thời gian và địa điểm	36
3.1.1. Thời gian.....	36
3.1.2. Địa điểm.....	36
3.2. Phương pháp chọn mẫu.....	36

3.3. Vật liệu	37
3.3.1. Các mẫu điều thí nghiệm	37
3.3.2 Phương pháp nghiên cứu.....	37
3.3.2.1. Hóa chất thí nghiệm và kiểm tra DNA.....	37
3.3.2.2. Hóa chất dùng trong kiểm tra định lượng DNA.....	38
3.3.3. Phương pháp ly trích DN.....	38
3.3.3.1. Quy trình ly trích mẫu tươi (Doyle và Doyle (1988)).....	38
3.3.3.2. Định tính DNA bằng phương pháp điện di.....	39
3.3.3.3. Định lượng DNA bằng quang phổ kế.....	40
3.3.3.4 Hóa chất và quy trình chạy RAPD – PCR.....	40
3.3.3.5. Phân tích kết quả bằng phần mềm NTSYS.....	41
3.3.4. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm.....	42
3.3.4.1. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm cần cho tách chiết và kiểm tra DNA.....	42
3.3.4.2. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm cần cho kỹ thuật PCR – RAPD.....	42
Chương IV: Kết quả và thảo luận.....	44
4.1. Thu thập mẫu tại các vùng trồng điều thuộc tỉnh Bình Định.....	44
4.2. Một số vấn đề tách chiết DNA ở lá điều.....	45
4.3 Kết quả thực hiện RAPD – PCR và đánh giá đa dạng di truyền.....	48
4.3.1. Đánh giá mức độ đa dạng di truyền của một số cá thể điều được trồng tại Bình Định với primer11.....	48
4.3.2 Đánh giá quy trình phản ứng RAPD-PCR	50
4.3.3 Phân tích kết quả phản ứng RAPD-PCR bằng phần mềm NTSYS.....	51
4.3.4 Đánh giá đa dạng di truyền	51
4.3.5. Hạn chế của kết quả đánh giá đa dạng di truyền bằng kỹ thuật RAPD-PCR.....	56
4.3.6. Một vài điểm lưu ý khi thực hiện phản ứng RAPD-PCR.....	56
Chương V: Kết luận và đề nghị	57
5.1 Kết luận	57

5.2Đề nghị.....	57
5.2.1Đề nghị phương pháp nghiên cứu	57
5.2.2 Về phương hướng phát triển canh tác điều ở Bình Định.....	57
Tài liệu tham khảo	59
Một vài hình ảnh cây điều	61
Phụ lục I	
Phục lục II	
Phục lục III	

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Sản xuất nhân hạt điều của thế giới niên vụ 2000 – 2001.....	14
Bảng 2.2. Tình hình sản xuất, xuất nhập khẩu nhân điều của Việt Nam.....	16
Bảng 2.3. Thị phần xuất khẩu nhân điều của Việt Nam giai đoạn 2000-2002.....	17
Bảng 2.4. Tình hình phát triển sản xuất điều tại Việt Nam dự kiến đến năm 2010.....	18
Bảng 3.1. Thành phần và cách pha EB	38
Bảng 3.2. Thành phần và cách pha TE 1 X.....	38
.Baûng 3.3: Hóa chất cho phản ứng RAPD – PCR.....	40
Bảng 3.4 Thành phần hóa chất cho một phản ứng RAPD – PCR.....	41
Bảng 3.5: Chương trình nhiệt cho phản ứng RAPD – PCR	41
Bảng 4.1Thành phần cho một phản ứng RAPD-PCR.....	49
Bảng 4.2Chu trình nhiệt cho phản ứng RAPD-PCR.....	49

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1: Cơ chế cắt của enzyme <i>MseI</i> và <i>EcoRI</i>	25
Hình 2.2: Cơ chế gắn của adapter <i>MseI</i> và adapter <i>EcoRI</i>	26
Hình 2.3: Cơ chế khuếch đại tiền chọn lọc trong phản ứng AFLP.....	27
Hình 2.4: Cơ chế khuếch đại chọn lọc trong phản ứng AFLP.....	28
Hình 2.5: Cơ chế phản ứng trong kỹ thuật AFLP.....	29
Hình 2.6: Sự bắt cặp và khuếch đại trong phản ứng RAPD – PCR.....	30
Hình 2.7: Cơ chế của phản ứng PCR.....	33
Hình 2.8 Sơ đồ tóm tắt quy trình RAPD-PCR.....	35
Hình 4.1 Quy trình ly trích DNA	47
Hình 4.2 Kết quả ly trích DNA được điện di trên gel agarose nồng độ 0,8%.....	48
Hình 4.3: Kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR trên gel khi thực hiện với primer11	50
Hình 4.4 Cây di truyền một số cây điều tiêu biểu ở huyện An Lão.....	52
Hình 4.5 Kết quả đánh giá đa dạng di truyền dạng số liệu NTSYS đối với các mẫu điều tại huyện An Lão	52
Hình 4.6 Cây di truyền một số cây điều tiêu biểu ở huyện Hoài Ân.....	53
Hình 4.7 Cây di truyền một số cây điều tiêu biểu ở huyện Hoài Nhơn .	54
Hình 4.8 Cây di truyền một số cây điều tiêu biểu tại Bình Định.....	55
MỘT SỐ HÌNH ẢNH VỀ CÂY ĐIỀU	61

CHƯƠNG I

GIỚI THIỆU

1.1. Đặt vấn đề.

Cây điều (*A canardium occidentale* L.) hay còn gọi là đào lộn hột, là cây cho sản phẩm rất đa dạng như nhân hạt điều, nước ép từ quả điều, dầu từ vỏ hạt, gỗ. Ở Việt Nam, nhân hạt điều là sản phẩm quan trọng nhất, hàng năm xuất khẩu mang lại hàng trăm triệu USD cho nền kinh tế nước nhà. Cùng với lúa và cao su, cây điều được xem là một cây nông - công nghiệp chiến lược của nước ta.

Ngoài ưu thế là cây cho sản phẩm xuất khẩu, cây điều còn dùng để cải tạo, bảo vệ môi trường, phủ xanh đất trống, đồi núi trọc, đất nghèo kiệt dinh dưỡng... cho nên canh tác điều đang được phát triển nhanh và mạnh ở Việt Nam.

Tuy nhiên do việc phát triển diện tích tự phát, tính tạp giao tự nhiên phức tạp và việc thiếu chiến lược chọn tạo giống hợp lý, nên năng suất cây điều còn thấp và chưa ổn định. Để có chiến lược phát triển lâu dài đem lại hiệu quả kinh tế - kỹ thuật cao, vấn đề đánh giá tổng quát quỹ gen và mức độ đa dạng của các giống điều hiện có được xem là một việc làm cấp thiết. Song song với quá trình xác định đa dạng di truyền của quần thể để từ đó có chiến lược cụ thể cho việc bảo vệ nguồn gen đối với cây điều, chúng ta cũng có thể tìm ra các chỉ thị phân tử (molecular marker) và phát triển chúng thành những công cụ hữu hiệu cho phép rút ngắn thời gian của quá trình chọn, tạo giống.

Hiện nay, có rất nhiều kỹ thuật phân tử được sử dụng để đánh giá tính đa dạng di truyền của quần thể. Nhưng với những đối tượng chưa có nhiều thông tin về bộ gene, người ta thường có xu hướng sử dụng kỹ thuật RAPD hoặc AFLP. Hai kỹ thuật này đều dựa trên cơ sở khuếch đại bằng PCR và đều có những thế mạnh riêng, tuy nhiên không có kỹ thuật nào là hoàn toàn chiếm ưu thế. Trong đề tài này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật RAPD để đánh giá sơ bộ mức độ đa dạng di truyền của quần thể điều hiện được trồng tại tỉnh Bình Định nhằm phục vụ cho công cuộc nghiên cứu sâu hơn về cây điều tại tỉnh nhà và trong nước.

1.2. Mục đích và yêu cầu.

1.2.1. Mục đích.

➤ Hoàn thiện phương pháp nghiên cứu đa dạng di truyền bằng kỹ thuật RAPD-PCR.

➤ Đánh giá sơ bộ đa dạng di truyền của những giống điều hiện đang trồng tại tỉnh Bình Định.

1.2.2 Yêu cầu.

➤ Thu thập được mẫu lá của những cây điều có những đặc điểm nổi bật và điển hình dựa trên kiểu hình như: khả năng chịu hạn tốt hay không tốt, năng suất và chất lượng hạt cao hay thấp, có tính đề kháng với sâu bệnh cao hay thấp, ra hoa sớm hay muộn,...

➤ Trích DNA có chất lượng tốt từ các mẫu lá thu được (được bảo quản lạnh) làm nguyên liệu cho kỹ thuật RAPD.

➤ Thực hiện thành công kỹ thuật RAPD từ đó đánh giá sơ bộ mức độ đa dạng di truyền quần thể điều tại tỉnh Bình Định

➤ Làm tiền đề phục vụ cho công tác chọn, tạo giống cây điều.

➤ Ly trích được DNA của các mẫu điều đủ tiêu chuẩn cho các bước phân tích tiếp.

➤ Thực hiện kỹ thuật RAPD và phân tích kết quả bằng phần mềm NTSYS.

1.3. Hạn chế của đề tài.

➤ Nghiên cứu phân loại giống điều tại Việt Nam chưa được thiết lập, đồng thời khó có khả năng nhận diện giống trong thực tế tại vườn nông hộ nên chỉ thực hiện lấy mẫu những cây điều có đặc điểm nổi bật và điển hình, không dựa trên đặc điểm phân loại giống.

➤ Không có đủ điều kiện để thu thập lượng mẫu lớn.

➤ Không có đủ điều kiện để thực hiện phản ứng RAPD-PCR với nhiều primer và tìm ra quy trình RAPD-PCR tối ưu.

1.4. Giới hạn khóa luận

➤ Khóa luận được thực hiện từ tháng 2-2006 đến tháng 6-2006 là một khoảng thời gian tương đối ngắn nên kết quả chưa phản ánh đầy đủ và chính xác đối với tất cả các giống điều hiện có.

➤ Các nghiên cứu về phân loại giống điều vẫn chưa được thiết lập nên việc lấy mẫu nghiên cứu dựa trên cơ sở điều tra các cá thể nổi bật, không thu thập nghiên cứu trên các dòng, giống cụ thể đã được xác lập.

CHƯƠNG II

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Giới thiệu về cây điều.

2.1.1. Nguồn gốc.

Cây điều hay còn gọi là đào lộn hột, có tên khoa học là *Anacardium occidentale* L., thuộc họ *Anacardiaceae*, tên tiếng Anh là Cashew tree.

Khoảng vài thế kỉ trước đây, cây điều vốn dĩ chỉ là một loài cây mọc tự nhiên hoang dại ở miền Đông Bắc Brazil thuộc Nam Mỹ.

Vào thế kỉ 16, khi Bồ Đào Nha và Tây Ban Nha xâm chiếm Nam Mỹ, các thủy thủ của họ đã mang hạt điều ra khỏi quê hương lãnh thổ của nó, đem đến trồng thử tại một số nước thuộc địa ở Trung Mỹ, Đông Phi và Ấn Độ. Vì vậy, có thể thời điểm này là mốc thời gian cây điều được chuyển từ hoang dã sang trồng trọt.

Tại các nước Đông Phi, chủ yếu là Mozambique, Tanzania và một phần Kenia, người Bồ Đào Nha đã tìm thấy ở những nơi đó các điều kiện sinh thái rất thích hợp cho cây điều phát triển.

Ở Châu Á, điều được đưa tới Goa (Ấn Độ) vào năm (1550), Cochin (1578), rồi từ đây phát tán nhanh chóng ra toàn bộ các bờ biển phía Tây và phía Đông Nam của tiểu lục địa Ấn Độ cũng như tới đảo Ceylon, Andamane, Nicobar và Indonesia. Điều phát tán tới Đông Dương và những nước khác ở Đông Nam Á và một số đảo nhỏ ở Thái Bình Dương có thể là do tác nhân chim chóc, dơi, khí và con người.

Cây điều có thể được đưa vào trồng ở Miền Nam Việt Nam từ thế kỷ 18. Lúc đầu, điều được trồng lẻ tẻ quanh nhà vừa để lấy bóng mát vừa để lấy quả ăn. Đến năm 1975, khi cuộc chiến tranh chống Mỹ cứu nước thắng lợi, cây điều mới chính thức có tên trong danh mục những cây trồng được chọn để trồng lại rừng bị phá hại bởi bom đạn trong chiến tranh ở các tỉnh phía Nam.

2.1.2. Đặc điểm hình thái.

2.1.2.1. Thân và cành.

Cây điều thuộc loại thân gỗ, thường cao 8 – 12 m. Ở những vùng có điều kiện đất đai và khí hậu thích hợp, cây có thể cao tới 20 m. Đường kính thân cây đoạn gốc có thể đạt 40 – 50 cm.

Cây điều phân cành sớm, thường ngay từ gốc với cả cành sơ cấp và cành thứ cấp. Theo Kumaran và cộng sự (1976), cây 4 tuổi có số cành sơ cấp thay đổi từ 9-30 và số cành thứ cấp từ 246 - 412. Gỗ điều tương đối mềm, nhẹ, tỷ trọng là 0,5. Vỏ cây cả thân cũng như cành khi bị tổn thương thường tiết ra nhiều mủ trắng trong.

2.1.2.2. Rễ.

Cây điều là loại cây vừa có hệ rễ cọc vừa có hệ rễ ngang. Ở những vùng đất khô, mạch nước ngầm thấp rễ cọc có thể đâm xuống rất sâu để hút nước. Hệ rễ ngang phát triển rất rộng, có thể lan rộng tới 2 – 3 m ở tầng 50 – 60 cm lớp trên của đất trồng. Đặc biệt hệ rễ có sự phát triển khác nhau tùy thuộc vào điều kiện sống. Nhờ vậy cây điều vẫn ra hoa kết quả trong suốt cả mùa khô kéo dài 5 - 6 tháng.

2.1.2.3. Lá và tán lá.

Lá điều thường tập trung ở đầu cành, loại lá đơn, nguyên, mọc so le, gân hình mạng. Lá có hình thuôn hay hình trứng ngược, đuôi lá thường hơi tròn hay hơi lõm, mặt trên nhẵn bóng. Khi non lá có màu xanh nhạt hoặc đỏ, khi già có màu xanh đậm. Lá điều dài từ 6 – 24 cm, rộng 4 – 15 cm, cuống lá dài 1 – 2 cm.

Cây điều có khả năng phát triển bộ tán rất rộng. Trong điều kiện đầy đủ ánh sáng, và đất đai phù hợp, tán lá cây điều có thể rộng đến 5 m tính từ gốc, chiếm diện tích 50– 60 m² từ khi cây mới 6 - 7 tuổi.

2.1.2.4. Hoa.

Bình thường khi kết thúc mùa mưa bước sang mùa khô là lúc cây điều bắt đầu trở hoa, cùng lúc ra cả hoa đực và hoa lưỡng tính.

Hoa trở ở đầu cành thành chùm hình chùy, dài trung bình từ 14 – 21 cm và có từ 200 đến 1600 hoa

Theo tác giả Bigger (1960) tỷ lệ giữa hoa lưỡng tính và hoa đực là 1 : 6 và số hoa lưỡng tính sẽ đậu quả tới chín cho thu hoạch chỉ có 10,2% .

Về hình thái học, hoa điều có những đặc trưng sau:

- Bao hoa có 5 cánh hoàn toàn tương tự nhau
- Đài hoa gồm các lá đài dài 3 – 4 mm, mặt ngoài có màu xanh lá mạ sáng, mặt trong có màu xanh lá cây vàng và có lông tơ dày .

➤ Tràng hoa có các lá tràng hình mũi mác phủ đầy lông tơ ở cả 2 mặt, dài 1 - 1,5 cm, rộng 0,1 – 0,15 cm màu trắng hơi vàng với các sọc xếp thành hàng từ màu hồng tới tím.

➤ Các nhị đực thẳng đứng, các bao phấn hình cầu màu đỏ và nức dọc. Số nhị đực từ 8 - 11 xếp thành 2 vòng và phân làm 2 loại theo chiều dài

➤ Nhị lớn có từ 1 - 2, chiều dài trung bình là 6 mm ở hoa đực và 8 mm ở hoa lưỡng tính.

➤ Nhị nhỏ có từ 7 – 10, chiều dài trung bình là 3 mm ở hoa đực và 5 mm ở hoa lưỡng tính.

➤ Nhụy gồm bầu đơn 1 ô, vòi nhụy có chiều dài 1 cm, tận cùng là núm nhụy.

Ở hoa đực, nhụy thui lép đi, còn ở hoa lưỡng tính phát triển mạnh hơn. Vòi nhụy dài hơn nhị lớn, rất hiếm có trường hợp ngắn hơn hoặc bằng, nếu có thì sự thụ phấn sẽ cao hơn.

➤ Sự thụ phấn và đậu quả.

Hoa điều nở từ sáng sớm tới trưa thì bắt đầu héo dần. Trước khi hoa nở 24 giờ, núm nhụy đã ở trạng thái tiếp nhận được phấn hoa và tiếp tục như vậy trong 48 giờ nữa sau khi hoa nở. Hạt phấn có sức sống kéo dài 48 giờ. Nhờ có cấu tạo nốt sần ở mặt ngoài, hạt phấn bám chắc vào các lỗ hồng trong bao phấn khiến gió không thể thổi bật được nó ra. Ở thời kỳ hoa nở, hoa tỏa ra mùi thơm hấp dẫn các loại côn trùng như kiến, ruồi, ong... do vậy ở cây điều việc thụ phấn được thực hiện chủ yếu nhờ tác nhân là côn trùng và gió. Tuy nhiên theo Rao (1974) việc thụ phấn tự nhiên là chưa đủ, qua thụ phấn bằng tay, đã thu được kết quả là 55% đậu quả. Theo Kumaran và cộng sự (1976) thụ phấn chéo thu được 61,3% đậu quả .

Ngay sau khi thụ phấn hoa điều có những biến đổi: Noãn biến đổi thành hạt (nhân), bầu chuyển thành vỏ bao bọc chung quanh để bảo vệ hạt. Nhân và vỏ tạo ra quả thật của cây điều đã quen gọi không đúng là hạt điều. Cuống và đế hoa phồng lên phát triển thành quả giả quen gọi là trái điều .

Hạt điều phát triển đạt đến kích thước cực đại trong 30 ngày, cứng lại trong 10 ngày tiếp theo và giảm bớt 10% kích thước lúc thu hoạch.

2.1.2.5. Hạt và quả điều.

Hạt điều (thực chất là quả thật) có hình thận màu lục sẫm khi hạt tươi và chuyển sang màu nâu hơi xám khi hạt khô. Ở các giống thông thường hạt có chiều dài trung bình 2,5 - 3,5 cm, rộng 2 cm và dày 1–1,5cm, trọng lượng trung bình 5–6g.

Về cấu tạo, hạt điều gồm có vỏ và nhân. Vỏ hạt điều gồm 3 lớp. Lớp ngoài cùng nhẵn, dai màu xám hoặc nâu xám, lớp vỏ giữa dày nhất, xếp cấu trúc tổ ong có chứa một chất lỏng có tính nhựa, nhớt, màu nâu đỏ. Khi tiếp xúc với không khí bị sậm màu đi rất nhanh, chất lỏng này có tên gọi là dầu vỏ hạt điều, tên thương mại tiếng anh là Cashew nut shell liquid - viết tắt là “C.N.S.L”. Dầu vỏ có vai trò là chất bảo vệ tự nhiên cho hạt chống lại côn trùng. Lớp trong cùng cứng như đá. Nhân do 2 lá mầm tạo thành được bao bọc bởi một lớp vỏ lụa màu nâu hơi đỏ. Nhân là phần ăn được có dạng hình thận và có hàm lượng lipid (trên 40% theo trọng lượng) và protein (khoảng 20%) cao. Tỷ lệ thành phần của hạt điều như sau :

Nhân: 20 - 25%

Vỏ lụa: 2 - 5%

Dầu vỏ: 18 - 23%

Vỏ: 45 - 50% .

Trái điều chứa nhiều vitamin C, gấp 5 - 7 lần trái cam, chanh và được xem là những loại trái cây giàu vitamin C.

2.1.3. Đặc điểm sinh thái

2.1.3.1. Điều kiện khí hậu.

Cây điều chịu được những điều kiện khí hậu khắc nghiệt. Khí hậu nhiệt đới với một lượng mưa hằng năm đầy đủ và một mùa khô rõ rệt là những điều kiện tối thích để cây điều phát triển tốt. Cây ưa nhiệt độ cao và rất nhạy cảm với giá lạnh nên vùng Duyên hải của các vùng nhiệt đới nằm ở độ cao từ 0 - 600 m so với mặt biển là môi trường thiên nhiên phù hợp cho cây điều sinh trưởng và phát triển. Tuy vậy, cũng có thấy ngoại lệ là cây điều tồn tại được ở những độ cao khoảng 1000 m so với mặt biển như ở Châu Mỹ (Mexico, Brazil, Venezuela) hoặc ở Châu Phi (Tanzania). Như vậy 1000 m có lẽ là độ cao giới hạn cây điều có thể tồn tại được.

Nhìn chung độ cao nơi trồng điều so với mặt biển càng lớn thì cây sinh trưởng càng chậm, năng suất càng giảm.

Có 5 yếu tố khí hậu chủ đạo quyết định sự sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây điều:

➤ Chế độ mưa

Lượng mưa của các vùng trồng điều trên thế giới thay đổi từ 500 - 4000 mm/năm. Song theo nhiều tài liệu tổng kết của các nước thì các vùng có lượng mưa nằm trong giới hạn 1000 - 2000 mm/năm là thích hợp nhất. Tuy nhiên người ta lại còn nhận thấy rằng những vùng có lượng mưa thấp hơn hoặc cao hơn giới hạn thích hợp đó điều vẫn sinh trưởng tốt và hàng năm đều sai quả tùy thuộc vào tính chất đất.

➤ Chế độ nhiệt

Chế độ nhiệt thích hợp nhất để cây điều mọc mạnh, trái nhiều là ở những nơi nhiệt độ bình quân hàng năm không dưới 20°C , trong năm không có tháng nào nhiệt độ bình quân dưới 15°C , với nhiệt độ tối thấp không lúc nào dưới 7°C .

➤ Chế độ ánh sáng

Cây điều là cây ưa sáng hoàn toàn. Mặc dù ta có thể thấy cây điều vẫn sống được ở nơi rậm, rợp, song ở những nơi đó điều mọc còi cọc, khẳng khiu và không bao giờ có trái, có hạt. Vì quá trình ra hoa, đậu trái của điều luôn đòi hỏi một lượng ánh sáng đầy đủ nên khi trồng dày điều chẳng những không phát triển bộ tán lá được mà hầu như không có hoa và trái hoặc chỉ những cành ở đỉnh tán có thưa thưa vài hoa, vài trái. Do đó cây điều trồng có hiệu quả kinh tế cao ở những vùng có ánh sáng chiếu nhiều, không có tháng nào lượng mây che phủ bầu trời vượt quá chỉ số 7,2.

➤ Độ ẩm tương đối của không khí

Tác động của độ ẩm tương đối của không khí đối với cây điều chủ yếu là vào thời kỳ ra hoa, kết hạt của nó. Độ ẩm tương đối của không khí không vượt quá mức 75% là thích hợp cho sự nở của bao phấn và sự truyền phấn hoa cũng như sự thụ tinh. Độ ẩm tương đối của không khí quá cao cùng với chất mật của hoa điều tiết ra sẽ là môi trường thuận lợi cho nhiều loại nấm bệnh phát triển gây thối, rụng hoa và quả non. Song, nếu độ ẩm tương đối của không khí vào thời kỳ này quá thấp, dưới

ngưỡng 50% lại kèm theo gió khô nóng thì tuy quá trình truyền phần và thụ phần ít ảnh hưởng nhưng lại trở ngại rất lớn cho quá trình thụ tinh bởi phần hoa khó nảy mầm nên núp nhụy bị khô, làm ảnh hưởng đến sản lượng hạt điều. Ngoài ra, người ta còn nhận thấy rằng trái điều non mới hình thành gặp thời tiết quá khô, cây thiếu nước cũng rất dễ bị khô rụng trước khi chín.

➤ **Gió**

Tốc độ gió tối thích cho vùng trồng điều là 2 - 25 km/giờ. Tuy nhiên gió mạnh lại có thể làm rụng hoa, quả và làm cho việc trồng điều thất bại như đã thấy ở đảo Fiji, Antilles, hoặc gió khô như ở Tây Phi lại làm tăng sự bốc hơi nước gây ra sự mất cân bằng sinh lý ở giai đoạn ra hoa kết quả, hoặc gió mặn (có chứa muối) lại dẫn đến các mầm và lá non bị cháy nắng.

2.1.3.2. Điều kiện đất đai

Cây điều được xem là một loại cây trồng của các vùng đất hoang hoá, mọc được trên nhiều loại đất như đất cát rời, đất núi lửa, đất bồi, đất có chứa sắt, đất Feralit. Tuy vậy cây điều chỉ sinh trưởng tốt trên đất xốp, sâu, thoát nước tốt (cây điều không ưa đất ngập nước) và độ pH từ 4,5 - 6,5. Cây điều nhạy cảm với các điều kiện lý tính hơn các điều kiện hóa tính của đất. Việc trong đất thiếu một số chất dinh dưỡng nào đó thì có thể khắc phục bằng các biện pháp bón phân thích hợp và đúng lúc.

Ở Miền Nam Việt Nam những loại đất có thể quy hoạch cho việc trồng điều, mà không bị các loại cây kinh tế quan trọng khác cạnh tranh còn rất nhiều và đều nằm vào vùng sinh thái của cây điều (Duyên hải Nam Trung Bộ, Đông Nam Bộ) như đất cát đỏ ở ven biển Bình Thuận, đất cát trắng bờ biển Duyên hải Nam Trung Bộ, đất xám phù sa cổ (loại đất chính chiếm một diện tích lớn ở các tỉnh thuộc miền Đông Nam Bộ), đất bazan (có 3 dạng chính là đất bazan lẫn đá bọt, đất đỏ bazan và đất bazan thoái hóa, phân bố chủ yếu ở các tỉnh Tây Nguyên). Những loại đất này phần lớn là đất trống đồi núi trọc cần phải phủ xanh nên rất thuận lợi cho các kế hoạch mở rộng diện tích trồng điều.

2.1.4. Sự phân bố.

Cây điều chủ yếu được phân bố từ phần Nam đèo Hải Vân trở vào và chia thành 3 vùng chính. Vùng trồng điều ưu tiên I đạt hiệu quả cao, vùng ưu tiên II đạt hiệu quả khá và vùng ưu tiên III đạt hiệu quả trung bình bởi có những nhân tố tự nhiên hạn chế cần khắc phục.

2.1.4.1. Vùng trồng điều ưu tiên I

Có thể xếp vào vùng này phần phía Nam của tỉnh Bình Thuận, tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu và tỉnh Bình Phước. Ở đây điều được trồng trên đất cát trắng, đất xám phù sa cổ và một phần đất đỏ bazan. Nếu áp dụng kỹ thuật chọn giống tốt, trồng và chăm sóc thích hợp thì vườn điều chắc chắn sẽ cho năng suất cao và khá ổn định với sản lượng hạt đạt phẩm chất cao theo tiêu chuẩn thị trường quốc tế.

2.1.4.2. Vùng trồng điều ưu tiên II

Bao gồm miền Duyên hải từ Đà Nẵng vào đến phần phía Bắc của tỉnh Bình Thuận, tỉnh Đắk Lắk và các tỉnh Đồng Nai, Bình Dương và Tây Ninh của miền Đông Nam Bộ. Trong các vùng này, điều được trồng trên đất cát trắng đã cố định, đất xám phù sa cổ và đất bazan thoái hóa. Các nhân tố sinh thái của vùng này khá phù hợp với yêu cầu của cây điều. Song có một số mặt hạn chế như: mưa bão sớm ở miền Trung tổng lượng nhiệt thấp ở Đắk Lắk, cỏ dại phát triển mãnh liệt và đất xám bị bạc màu ở các tỉnh Đông Nam Bộ khiến năng suất hạt điều không cao và không ổn định như vùng I.

2.1.4.3. Vùng trồng điều ưu tiên III

Thuộc vùng này là loại đất phèn của miền Tây Nam Bộ bởi cần có những biện pháp chống úng và rửa phèn để trồng điều. Do vậy chỉ có thể tận dụng các diện tích hạn hẹp của các công trình thủy nông và đất thổ cư để trồng. Ngoài ra, đất vùng này thường có thành phần cơ giới nặng, thoát nước kém nên năng suất cây điều khó có thể đạt cao.

2.1.5. Đa dạng sinh học cây điều

Cây điều cũng giống như các loại cây trồng từ hạt khác, khả năng xảy ra thụ phấn chéo cao và phát tán rộng, do đó trong một quần thể điều có những tính đa dạng về hình thái.

2.1.5.1. Xét về hình dạng cây

Ta có thể thấy có các giống chủ yếu sau đây:

Giống điều thân cao thường kèm theo đặc điểm là thân phân cành cao, ít cành nhánh, tán thưa và hẹp.

Giống điều thân lùn với các đặc trưng thường gặp là tán cây xòe rộng, cành nhánh rậm rạp, thân phân cành thấp nhiều khi sát gần mặt đất.

Giữa 2 dạng cây này lại còn có nhiều dạng trung gian khác nhau

2.1.5.2. Xét về màu sắc lá

Có giống có lá non màu xanh nõn lá chuối và lá già màu xanh nhạt, có giống có lá non từ màu hồng đến đỏ tía và lá già màu xanh đậm.

2.1.5.3. Xét về hoa

Hoa điều mọc tập trung thành chùm ở đầu nhánh gồm hai loại là hoa đực và hoa lưỡng tính. Tuy cùng mọc chung trong một vườn nhưng có giống hoa nở sớm có giống hoa nở muộn chênh lệch nhau đến cả 10 –15 ngày. Số lượng hoa trong mỗi chùm cũng như tỷ lệ hoa đực và hoa lưỡng tính bình quân trong một chùm cũng thay đổi lớn từ giống này đến giống khác, có giống chùm hoa thưa thớt chỉ chừng vài chục cái, có giống chùm hoa dày đặc tới vài trăm hoa, có giống tỷ lệ hoa lưỡng tính thấp không quá 5% lại có giống tỷ lệ hoa lưỡng tính rất cao lên đến gần 30%. Tỷ lệ hoa lưỡng tính sau khi nở đậu thành trái cũng rất khác nhau giữa các giống, có giống tỷ lệ đậu trái bình quân ở mỗi chùm rất cao có thể đạt tới 6 –10 trái mỗi chùm ta thường gọi là điều chùm, có giống tỷ lệ đậu trái rất thấp bình quân chỉ có 1–3 trái mỗi chùm.

2.1.5.4. Xét về trái

Màu sắc, hình dạng, kích cỡ và mùi vị của trái điều (trái giả) thay đổi rất đa dạng giữa giống này với giống khác ngay trong một vườn. Có những giống như: trái màu đỏ, trái màu hồng hay màu vàng hoặc màu đỏ sọc xanh, trái tròn, trái dài, trái rất to, trái nhỏ .v.v. Có giống trái khi chín rất ngọt, có giống trái rất nhạt, khi ăn rất khé cổ do hàm lượng Tananh trong nước trái cao. Có giống nước trái chứa hàm lượng vitamin C rất cao, có giống rất thấp. Các đặc điểm của trái điều kể trên có liên hệ quan trọng đến công nghệ chế biến trái điều thành nước giải khát và điều chế vitamin C trong ngành dược.

2.1.5.5. Xét về hạt và năng suất hạt

Hạt điều cũng có sự khác biệt rất lớn về hình dạng, kích thước, trọng lượng, tỷ lệ nhân bên trong hạt giữa các giống khác nhau. Hình dạng giống như quả thận là đặc trưng của tất cả các loại hạt điều, song có giống hạt tròn no tròn, phồng mẩy, có giống hạt lép dẹp. Có giống hạt rất to và nặng, khi chín trọng lượng khô đạt đến xấp xỉ 8 gam/hạt (khoảng 127 – 132 hạt/kg); có giống hạt lại bé chỉ đạt 3,5 gam/hạt (bình quân mỗi kg có tới gần 300 hạt). Về tỷ lệ nhân bên trong hạt cũng rất khác nhau có giống tỷ lệ nhân chiếm trên dưới 20% so với trọng lượng hạt nhưng cũng có giống đặc biệt với tỷ lệ nhân đạt đến hơn 30% trọng lượng hạt.

2.1.5.6. Xét về di truyền

Tất cả các đặc điểm kể trên tuy rất phong phú và đa dạng song về ý nghĩa khoa học không thể gọi là giống được. Những khác biệt về hình dạng cây, tán lá, hoa, trái và hạt đó thực sự chỉ là những biến dị cá thể nghĩa là những biến đổi từ cây này qua cây khác. Nguyên nhân dẫn đến những khác biệt đó là do cây điều là cây thụ phấn chéo, do đó khi lấy hạt từ một cây đem gieo trồng ta sẽ được nhiều cây con có thể tốt, có thể xấu, có thể thuộc dạng này hay dạng khác, không hoàn toàn giống nhau.

Ngoài ra, phần lớn các vườn điều ở ta được trồng từ các giống không rõ nguồn gốc, thậm chí là các giống buôn bán ngoài chợ nên cây trong vườn lai hỗn tạp là hiển nhiên. Bên cạnh đó sự khác biệt về đất đai, về thời tiết mỗi vùng, mỗi năm, về kỹ thuật gây trồng và chăm sóc vườn điều cũng làm tăng sự khác biệt giữa các giống. Chỉ khi nào có một công cuộc cải thiện giống điều thật sự khoa học thì mới có thể có được một vườn điều cung cấp hạt giống tốt và ổn định được.

2.2 Công dụng

2.2.1 Sản phẩm chính

Điều có hai loại sản phẩm chính là nhân điều và dầu vỏ hạt điều:

Nhân điều: chiếm khoảng 20-25% trọng lượng hạt điều. Là thực phẩm cao cấp gồm nhiều chất dinh dưỡng và cân đối trong thành phần dinh dưỡng, hàm lượng calo cao hơn ngũ cốc, thịt và các loại hoa quả tươi. Hạt điều dùng để ăn: Hạt điều rang, làm gia vị, nhân bánh trung thu, nhân kẹo sôcôla và một số loại bánh kẹo khác. Ngoài ra hạt điều còn dùng để ép lấy dầu chế margarin (bơ thực vật), thức ăn

lành hạn chế và chữa được nhiều loại bệnh hiểm nghèo: Chảy máu não, xơ cứng động mạch, huyết áp, thần kinh.

Dầu vỏ hạt điều: Chiết xuất từ vỏ hạt điều, chủ yếu là acid anacardic ($C_{22}H_{32}O_3$) và một lượng ít cardol ($C_{24}H_{32}O_2$). Dầu vỏ hạt điều dùng để điều chế verni, sơn chống thấm, chịu nhiệt, bảo vệ kim loại, dung môi chống nóng, cháy, vật liệu cách điện, chất bôi trơn, má phanh ô tô, xe lửa, keo dán gỗ, chất phòng lão cho cao su, xi măng đặc biệt, thuốc nhuộm, thuốc trừ sâu, diệt mối, chống nấm, mực in, mực dầu, thuốc trừ bệnh phong, mụn cóc, nứt gót chân, hương liệu, mỹ phẩm...

Trong kỹ thuật nhiệt đới hóa các máy móc thiết bị, nhất là các thiết bị điện tử tinh vi, dầu vỏ hạt điều làm tăng tuổi thọ các linh kiện điện tử và tăng độ an toàn trong máy móc. Đặc biệt dầu vỏ hạt điều còn được dùng làm tranh sơn mài. Vỏ lụa chứa một ít đạm, đường và muối khoáng có thể dùng để nuôi gà vịt.

2.2.2 Sản phẩm phụ

Quả điều chứa nhiều vitamine B₁, B₂ và đặc biệt là vitamine C và các loại khoáng. Trái điều vàng chứa nhiều vitamine C và ít vitamine B₂ hơn trái điều đỏ. Trái điều có thể ăn sống, nấu canh chua hay chế biến thành tinh dầu chuối, nước giải khát, rượu, giấm, mứt, ép lấy nước làm sirô nguyên chất hay đem cô đặc, đóng hộp. Rượu từ trái điều có tính giải nhiệt, trị nhức mỏi, làm lợi tiểu, chữa viêm họng. Nước trái điều pha với sunfat sắt có thể dùng để nhuộm đen tóc.

Gỗ điều khá cứng và sau 30-40 năm đường kính có thể 60-70cm, gỗ điều dùng đóng thuyền, làm gỗ dân dụng như làm bàn ghế, làm nguyên liệu giấy. Thân và cành cây cung cấp củi.

➤ Vỏ cây điều: Chứa nhiều tanin(4-9%) dùng để thuộc da, làm mực không phai, thuốc nhuộm vải. Vỏ cây điều ngâm lấy nước chữa bệnh đau cổ, trừ bệnh ỉa chảy nhẹ và táo bón.

Rễ cây điều dùng làm thuốc chống nôn, thuốc xổ.

Nhựa cây điều dùng làm thuốc sát trùng, điều chế verni, làm keo dán sách, thuốc trừ bệnh phong hay các bệnh ngoài da.

Lá điều người Indônêxia ăn lá non, người Bồ Đào Nha nấu lá điều để làm thuốc ngủ, người Ấn Độ dùng lá già để chữa bệnh da bị phỏng lở hay phỏng lửa.

2.3 Tình hình sản xuất điều trên thế giới

Từ cây hoang dại, cây điều dần dần được trồng trên diện tích lớn và trở thành cây có giá trị kinh tế nhờ tính đa dạng về sản phẩm. Theo các chuyên gia, nhu cầu sử dụng điều của thế giới sẽ tăng khoảng 5% mỗi năm cộng với giá hạt điều tăng liên tục trong những năm gần đây. Chính vì vậy việc sản xuất và chế biến hạt điều trên thế giới ngày càng tăng thể hiện rõ trong bảng 2.1.

Bảng 2.1. Sản xuất nhân hạt điều của thế giới niên vụ 2000 – 2001.

ĐVT: tấn

Nước/khu vực	2000 – 2001
Ấn Độ	425.000
Brazil	200.000
Việt Nam	140.000
Tanzania	150.000
Nigeria	30.000
Mozambique	20.000
Indonesia	30.000
Guinea-Bissau	45.000
Benin	20.000
Các nước châu Phi nói tiếng Pháp	70.000
Các nước khác	70.000
Cộng	1.200.000

2.4 Tình hình sản xuất điều ở Việt Nam.

Nước ta, cây điều được xếp thứ tư trong số các cây công nghiệp xuất khẩu quan trọng. Cây điều có khả năng chịu đựng điều kiện khắc nghiệt, dễ thâm canh tăng năng suất đem lại lợi nhuận cho nhân dân nên được chú trọng phát triển.

Hiện nay Việt Nam có trên 350 ngàn ha điều, tăng 40% so với năm 1999, trong đó diện tích cây trồng đã cho thu hoạch là 3180 ngàn ha diện tích trồng giống cao sản là 130 ngàn ha. Cây điều được trồng nhiều, tập trung ở các tỉnh miền Đông Nam Bộ. Riêng các tỉnh như Bình Phước, Bình Dương, Đồng Nai loại cây này phát triển khá mạnh và chiếm khoảng 2/3 diện tích điều của cả nước.

Năm 2004 sản lượng điều của Việt Nam đạt 350 ngàn tấn và đứng thứ 3 thế giới. Cũng trong năm 2004, cả nước đã xuất khẩu hơn 105 ngàn tấn điều nhân, kim ngạch đạt 436 triệu USD và 6 tháng đầu năm 2005 đã xuất khẩu được 43 ngàn tấn, đạt kim ngạch 210 triệu USD.

Từ chỗ chủ yếu chỉ xuất khẩu sang Trung Quốc, đến nay sản phẩm điều của Việt Nam đã có mặt tại thị trường Mỹ, Tây Âu, Đông Nam Á.

Thị trường xuất khẩu của Việt Nam ngày càng mở rộng, và đã xâm nhập vào những thị trường được coi là khó tính về những yêu cầu về an toàn thực phẩm, chất lượng

Từ chỗ chỉ xuất khẩu hạt điều thô trong những năm đầu, thì ngành chế biến hạt điều trong nước dần phát triển thể hiện ở bảng 2.2.

Bảng 2.2. Tình hình sản xuất, xuất nhập khẩu nhân điều của Việt Nam

Năm	Hạt điều thô (tấn)		Xuất khẩu (tấn)		Giá trị kim ngạch (triệu USD)
	Sản xuất trong nước	Nhập khẩu	Hạt điều thô	Nhân điều	
1986	1530		-	-	
1987	1449		-	-	
1988	468		300	33,6	
1989	12.000		11.000	261	
1990	28.000		27.000	286	14
1991	31.000		30.000	360	23
1992	47.000		40.000	1.400	29
1993	60.000		30.000	6.000	49
1994	90.000		50.000	9.526	75
1995	100.000			18.257	90
1996	110.000			23.791	110
1997	140.000			33.000	133
1998	100.000	10.000		26.000	117
1999	70.000	20.000		16.000	100
2000	135.000	25.000		30.000	150
2001	140.000	40.000		38.000	135
2002	-	-		63.000	214

Bảng 2.3. Thị phần xuất khẩu nhân điều của Việt Nam giai đoạn 2000-2002.

STT	Quốc gia và khu vực	2000 (%)	2001 (%)	2002 (%)
1	Hoa Kỳ	18	24	33,7
2	Trung Quốc	32	28	20,3
3	Úc	17	18	10,8
4	Anh	8	7	5,3
5	Hà Lan	8	10	10,9
6	Nhật	3	2,5	2,2
7	Canada	3	2,5	2,3
8	Hồng Kông	3	4	4,8
9	Đức	2	1	1
10	New Zealand	1	1	1
11	Đài Loan	1	1	1,1
12	Các nước khác	1	5	6,6

Trước tình hình ngày càng phát triển của thị trường, thì nước ta có tạo ra một chiến lược lâu dài cho việc cung cấp nguyên liệu bằng cách quy hoạch các vùng trồng điều chuyên canh, có sự đầu tư lớn vào việc tạo ra giống điều có năng suất, chất lượng cao ... để có thể đáp ứng nhu cầu càng cao của thị trường. Dưới đây là bảng dự kiến cho các vùng trồng điều trong cả nước được hoạch định đến năm 2010 bảng 2.4.

Bảng 2.4. Tình hình phát triển sản xuất điều tại Việt Nam dự kiến đến năm 2010. DVT: ha

Vùng/Tỉnh \ Năm	1997	2005	2010
Toàn quốc	250.000	340.000	500.000
Duyên hải Nam Trung Bộ	61.000	100.000	180.000
Quảng Nam	4.000	10.000	25.000
Quảng Ngãi	3.000	10.000	25.000
Bình Định	15.000	15.000	25.000
Phú Yên	8.000	15.000	20.000
Khánh Hòa	7.000	15.000	25.000
Ninh Thuận	3.000	10.000	20.000
Bình Thuận	21.000	25.000	40.000
Tây Nguyên	27.000	60.000	120.000
Kon tum	500	16.000	25.000
Gia Lai	10.500	17.000	35.000
Đắk Lắk	10.000	15.000	30.000
Lâm Đồng	6.000	12.000	30.000
Đông Nam Bộ	149.000	170.000	190.000
Đồng Nai	35.000	40.000	40.000
Bà Rịa-Vũng Tàu	20.000	25.000	30.000
Bình Dương	32.000	28.000	28.000
Bình Phước	50.000	65.000	65.000
Tây Ninh	10.000	10.000	25.000
Tp. Hồ Chí Minh	2.000	2.000	2.000
Đồng bằng sông Cửu Long	13.000	10.000	10.000

2.5 Đa dạng sinh học.

2.5.1 Định nghĩa đa dạng sinh học.

Đa dạng sinh học là sự phong phú của sự sống trên trái đất, là hàng triệu loài động vật, thực vật và vi sinh vật, là những gen chứa đựng trong các loài và là những hệ sinh thái vô cùng phức tạp cùng tồn tại trong tự nhiên.

2.5.2 Tầm quan trọng của đa dạng sinh học.

Cuộc sống của chúng ta liên quan mật thiết đến nguồn tài nguyên mà trái đất cung cấp (nước, không khí, khoáng sản, cây cối và động vật). Nền văn minh của chúng ta ngày nay đang bị đe dọa do con người lạm dụng nguồn tài nguyên thiên nhiên để làm lợi ích riêng làm rối loạn các hệ sinh thái tự nhiên. Sự tăng dân số và tăng phát triển xã hội như việc công nghiệp hóa, mở rộng hệ thống giao thông, đô thị hóa, đã và đang gây ra những tác động lớn lên môi trường, tính đa dạng về sự sống trên trái đất đang bị suy giảm. Việc nghiên cứu và bảo tồn tính đa dạng sinh học hiện nay là một vấn đề cấp bách.

Nếu chúng ta duy trì được tính đa dạng sinh học thì sẽ bảo vệ và điều hòa được lượng nước trên trái đất và chống được xói mòn, điều hòa không khí, tạo nguồn thức ăn cho các sinh vật khác nhau, hạn chế được sự tăng nhiệt độ của không khí và chống hạn hán lũ lụt..

2.5.3 Phân loại đa dạng sinh học.

Đa dạng sinh học được xem xét theo 3 mức độ:

- Đa dạng hệ sinh thái: Là sự khác biệt giữa các quần xã mà trong đó các loài sinh sống và các hệ sinh thái nơi mà các loài cũng như các quần xã sinh vật tồn tại và cả sự khác biệt của mối tương tác giữa chúng với nhau.

- Đa dạng loài: Gồm toàn bộ các sinh vật sống trên trái đất, từ vi khuẩn đến các loài thực vật, động vật và các loài nấm.

- Đa dạng di truyền: Sự khác biệt về gen giữa các loài, giữa các quần thể sống cách li nhau về địa lí cũng như giữa các cá thể cùng chung sống trong một quần thể.



2.5.4 Hiện trạng về đa dạng sinh học ở Việt Nam

Việt Nam là một trong mười nước có hệ sinh thái phong phú nhất trên thế giới. Việt Nam có khoảng 10% số loài sinh vật của thế giới. Song sự đa dạng này đang bị đe dọa vì môi trường sống bị hủy hoại bởi tình hình tăng dân số, việc xây dựng đập nước và đường xá cũng như việc mở rộng các hoạt động công nghiệp. Tình trạng tăng dân số và đô thị hoá đang gây sức ép đối với năng lực bảo vệ môi trường. Mặc dù diện tích che phủ của rừng đã tăng lên, song mối quan tâm thực sự là vấn đề chất lượng. Một nửa số rừng nguyên sinh đã bị mất. Hiện có 700 loài sinh vật nằm trong danh sách các loài có nguy cơ tuyệt chủng. Mức độ ô nhiễm thường xuyên vượt quá mức độ cho phép, và riêng mức độ bụi ở các khu đô thị ít nhất cũng cao gấp đôi so với tiêu chuẩn tối đa. Vì vậy mà các loài sinh vật bị tiêu diệt dần và một số loài có nguy cơ tuyệt chủng, làm ảnh hưởng đến đa dạng sinh học.

2.6. Thông tin di truyền và phương pháp nghiên cứu tính đa dạng di truyền.

2.6.1. Thông tin di truyền.

Nucleic acid, vật liệu mang thông tin di truyền của các hệ thống sống, là một polymer hình thành từ các monomer là nucleotide. Mỗi nucleotide gồm ba thành phần: nhóm phosphate, đường pentose (đường 5C) và một base hữu cơ (vì các nucleotide chỉ khác nhau ở base nên người ta thường dùng từ “base” thay cho “nucleotide”).

Các base hữu cơ thuộc hai nhóm: các purine gồm Adenine (A) và Guanine (G), các pyrimidine gồm Thymine (T), Cytosine (C) và Uracine (U). Các nucleotide được nối với nhau bằng liên kết phosphodiester tạo thành chuỗi polynucleotide.

Nucleic acid gồm hai loại phân tử có cấu tạo rất giống nhau là deoxyribonucleic acid (DNA) và ribonucleic acid (RNA). Ở sinh vật *Eucaryote*, thông tin di truyền là phân tử DNA, là một chuỗi xoắn kép gồm hai mạch đơn, mỗi mạch đơn là một chuỗi nucleotide. Mỗi nucleotide gồm nhóm phosphate, đường deoxyribose và một trong bốn loại base (A, C, G, T). Hai mạch đơn liên kết với nhau nhờ liên kết hydro hình thành giữa base bổ sung nằm trên hai mạch: A bổ sung cho T, G bổ sung cho C. Mỗi mạch đơn là một trình tự có định hướng với một đầu là 5' phosphate tự do và một đầu là 3' hydroxyl tự do (hướng quy ước là 5' → 3'). Hướng của hai mạch đơn trong chuỗi xoắn kép ngược nhau, người ta gọi chúng là hai mạch đối song song. Mỗi mạch đơn là một trình tự những base khác nhau, do đó mỗi mạch đơn mang thông tin khác với mạch kia. Hai mạch đơn liên kết với nhau bởi tính chất bổ sung. Chính tính chất này giải thích được cấu trúc chặt chẽ của phân tử DNA, đặc biệt là cách thức tự sao chép để tạo ra hai phân tử con từ một phân tử mẹ.

2.6.2. Phương pháp chiết tách DNA.

Phương pháp chiết tách DNA cơ bản gồm ba bước

- Bước 1: Phá màng tế bào và màng nhân. Thông thường người ta nghiền tế bào, mô trong một hỗn hợp chất tẩy (như SDS, Sarcosyl) và proteinase (Proteinase K). Hỗn hợp này sẽ phá vỡ màng tế bào và màng nhân, giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA.

- Bước 2: Loại bỏ các thành phần không mong muốn trong mẫu, chủ yếu là các protein. Mẫu được lắc thật mạnh trong một dung dịch chloroform và phenol, dung dịch phenol chloroform có tác dụng làm biến tính protein đồng thời không hòa tan nucleic acid. Protein sau khi bị biến tính sẽ không còn hòa tan trong pha nước có chứa nucleic acid và sau khi ly tâm sẽ tủa thành một lớp nằm giữa pha nước và pha phenol chloroform. Pha nước có chứa nucleic acid được thu nhận lại.

- Bước 3: Tủa nucleic acid. Có thể tủa bằng ethanol hoặc isopropanol, nhưng thông thường người ta dùng isopropanol. Nucleic acid sẽ được thu nhận lại bằng ly tâm. Sau đó, cặn tủa được rửa trong ethanol 70% để loại bỏ các muối hoặc các dấu vết của isopropanol còn dính lại trên mẫu.

Mục đích của việc tủa là nhằm thu nhận nucleic acid dưới dạng cô đặc, nhằm bảo vệ chúng khỏi sự phân hủy của các enzyme, đồng thời có thể hòa tan chúng lại trong dung dịch theo nồng độ mong muốn.

2.6.3. Các chỉ thị dùng trong nghiên cứu đa dạng di truyền.

Nguồn gốc tính đa dạng sinh học ở thực vật nói riêng và ở sinh vật nói chung nằm ở thứ tự các bộ ba trên phân tử DNA làm nên bộ máy di truyền của chúng. Hiếm có các cá thể trong cùng một loài hoặc cùng một giống có thứ tự các bộ ba trên DNA trong bộ gene giống hệt nhau. Việc xác định tính đa dạng sinh học cực kì quan trọng trong chọn giống vì các vật liệu di truyền dùng để lai tạo thường được đòi hỏi có tính đa dạng càng lớn càng tốt.

Công nghệ Sinh học thực vật đã phát triển nhiều phương pháp mới, nhạy và chính xác để xác định và sử dụng tính đa dạng ở sinh vật.

Để nghiên cứu tính đa dạng di truyền của các cá thể, quần thể về căn bản người ta thường dựa trên các DNA marker. DNA marker có thể được chia làm ba loại chỉ thị thường sử dụng:

- Chỉ thị hình thái: Gene thể hiện bản chất di truyền sẽ được liên kết với một tính trạng hình thái nào đó mà người ta có thể phát hiện được. Tuy nhiên nếu dựa vào những chỉ thị loại này để lập bản đồ gene và chọn lọc sẽ mất thời gian, số lượng chỉ thị ít do không phải tất cả những tính trạng kiểu hình nào ta cũng có thể nhận diện được, đồng thời độ chính xác và độ tin cậy thấp.

- Chỉ thị allozyme. Là những chỉ thị protein. Mỗi protein là sản phẩm biểu hiện của một hay một vài gene, do vậy người ta dựa vào điều này để tìm ra những chỉ thị. Dựa vào hàng loạt những enzyme giống nhau được mã hóa bởi những allele khác nhau nằm cùng trên một locus. Do sự khác nhau về điện tích của aminoacid, allozyme có thể được phân tách bằng điện di. Nhiều enzyme bất biến trong quần thể và hầu hết sự đa hình của những enzyme này chỉ do một vài biến đổi nhỏ. Kết quả mà chỉ thị allozyme đem lại khả quan hơn so với chỉ thị hình thái do có số lượng chỉ

thì có thể phát hiện được nhiều hơn, tuy nhiên số lượng chỉ thị cũng vẫn ít, không đáp ứng cho những nghiên cứu sâu rộng.

-Chỉ thị phân tử :phân tích sự khác nhau các cá thể ở mức độ phân tử (DNA, protein) SSCP, SSR, RAPD, AFLP...

Các phương pháp nghiên cứu tính đa dạng di truyền ở mức độ phân tử này đều sử dụng sản phẩm DNA đã được chiết tách và tinh sạch.

2.6.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Là phương pháp dùng để so sánh DNA của các cá thể khác nhau sau khi cắt mẫu DNA bằng một enzyme giới hạn. Nếu trình tự DNA của hai cá thể cùng loài giống nhau hoàn toàn thì sau khi cắt DNA bằng enzyme giới hạn cùng loại sẽ thấy các band DNA hoàn toàn giống nhau về số lượng và kích thước. Ngược lại nếu có sự khác nhau về trình tự DNA (khác giống hoặc do đột biến) thì sẽ có sự khác nhau về các band DNA.

Phương pháp tiến hành: DNA sau khi tách chiết được phân cắt bằng một enzyme nhất định, rồi chạy điện di, lúc này các đoạn DNA tách riêng ra với nhau tùy theo kích thước của nó chạy trên gel agarose, và tình trạng mở dây đơn (denature). Những đoạn DNA này được chuyển từ gel sang một thể rắn (tấm lọc nitrocellulose hoặc màng lọc bằng nylon), nơi nó bị cố định. Sau giai đoạn trước khi lai DNA, người ta cố định các vị trí trên màng nơi quá trình lai DNA sẽ xảy ra, các DNA (gene liên kết với marker) sẽ gắn với nucleic acid thăm dò (probe, hay RFLP marker) được đánh dấu bằng phóng xạ. Quá trình lai giữa DNA (gene) và probe như vậy được gọi là lai DNA. Sau khi lai, tấm lọc hay màng lọc được rửa để loại bỏ các probe không gắn, hoặc gắn yếu với DNA đang nghiên cứu. Tiếp sau đó, DNA lai với probe tự ghi trên biểu đồ phát xạ. Sau khi điện di, gel được chụp dưới tia cực tím. Các đoạn DNA xuất hiện thành các đốm liên tục. DNA lai với probe sẽ cho tín hiệu khi thể hiện ra trên phim X-quang. Các sọc có tính đa hình (polymorphism) có thể được quan sát để đánh giá.

RFLP marker có khả năng sử dụng rất phong phú, nhưng quy trình thực hiện phức tạp, nguy hiểm đến sức khỏe người thực hiện, đắt tiền, yêu cầu DNA có số lượng và chất lượng rất cao. Do đó, người ta có xu hướng áp dụng những marker đơn giản hơn, an toàn hơn, trên cơ sở phản ứng chuỗi polymerase.

2.6.3.2. SSCP (Single - Strand Conformation Polymorphism).

Người ta đã tìm thấy có sự chuyển dịch của đoạn DNA dạng dây đơn, ngắn, trong điều kiện chưa qua quá trình biến tính DNA thành dây đơn (denaturation). Người ta giả định rằng sự thay đổi chuỗi mã di truyền DNA là do sự thay đổi ngoại hình của dây đơn (single-strand conformation). Sự thay đổi này làm cho DNA chuyển dịch trên gel, tạo ra thể đa hình.

Trong phân tích SSCP, phản ứng chuẩn PCR đã hoàn thành. Sản phẩm của PCR này lại bị mở dây đơn lần nữa và ngâm vào trong nước đá. Khi đó hiện tượng snap-back sẽ xảy ra trên cấu trúc thứ cấp. Để tránh hiện tượng đứt gãy cấu trúc thứ cấp, các mẫu phải được xử lý trong điều kiện lạnh. Nếu P^{32} được dùng trong PCR, thì phim chụp X-quang sẽ thể hiện vị trí của DNA trên gel. Nếu không, người ta sẽ dùng bạc để nhuộm gel. DNA khi nhuộm bằng bạc sẽ nhạy cảm gấp trăm lần nhuộm ethidium bromide.

SSCP marker là công cụ rất mạnh và nhanh, nhưng nó chỉ áp dụng cho việc tìm kiếm thể đa hình của những đoạn phân tử DNA tương đối ngắn. SSCP có thể xác định tính chất dị hợp tử của những đoạn phân tử DNA (có cùng trọng lượng phân tử), và nó có thể phân biệt được sự thay đổi của một vài nucleotide nào đó. Người ta cho nó là công cụ hữu dụng trong xét nghiệm bệnh di truyền ở người. Trong thực vật, SSCP chưa được phát triển nhiều. Người ta hi vọng, SSCP marker sẽ giúp cho việc phân nhóm di truyền ở con lai trở nên dễ dàng hơn, khi chúng ta có primer thích hợp đối với tính trạng quan trọng nào đó.

2.6.3.3. Microsatellite (SSR: Simple Sequence Repeat).

SSR là các trình tự hai nucleotide ((AC)_n, (AG)_n, (AT)_n) hoặc ba nucleotide ((TAT)_n, (TCT)_n, (CAG)_n) lặp lại. Do vậy nguyên tắc của phương pháp này là dựa trên sự khuếch đại các trình tự lặp lại trên bộ gene bằng các primer đặc hiệu có khả năng bổ sung vào hai đầu của locus microsatellite. Sản phẩm PCR là các đoạn DNA có chiều dài khác nhau do sự biến thiên về độ dài được tách ra trên gel polyacrylamid hoặc trong mao quản của máy giải trình tự DNA. Do số lần lặp lại cao của microsatellite ở các cá thể nên sự đa hình cao hơn ở các trường hợp khác như RFLP, RAPD và sự đa hình ở các cá thể khác nhau tất nhiên là khác nhau. Chiều dài các đoạn DNA qua điện di thường có kích thước 100 – 200 bp. Tuy

nhiên, SSR thường được phân tích trên DNA hệ gene nhỏ mang trình tự lặp lại và kích thước của chúng được nhận biết sau khi điện di trên gel.

SSR được thực hiện theo bốn bước:

- ✓ Tách chiết và tinh sạch DNA của các mẫu nghiên cứu.
- ✓ Thực hiện phản ứng khuếch đại qua PCR với các primer đặc trưng cho các đoạn lặp đơn giản.
- ✓ Điện di kết quả trên gel polyacrylamid và tính toán số liệu, xác định mức độ giống và khác nhau giữa các đoạn lặp DNA.
- ✓ Xử lý số liệu bằng các phần mềm Map Marker Program, SYSTAT, NTSYSpc .v.v. lập bản đồ di truyền và dựng cây phát sinh chủng loại.

2.6.3.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

AFLP – đa hình chiều dài các đoạn DNA được khuếch đại chọn lọc, do Vos và cộng sự phát minh 1975. Là kỹ thuật được áp dụng để phân tích tính đa dạng của sinh vật từ hàng trăm đoạn DNA giới hạn đã được khuếch đại đồng thời nhờ phản ứng PCR. Trên nguyên tắc, AFLP gồm hai nội dung cơ bản:

- Cắt DNA bằng enzyme cắt giới hạn có bổ sung các adapter đặc hiệu tạo nên các đoạn có đầu mút giống nhau, đặc trưng cho các primer đã chọn trước.

Adapter là một đoạn oligonucleotide đôi, được tổng hợp nhân tạo và có trình tự tương ứng với trình tự ở đầu đoạn DNA được phân cắt bởi một loại enzyme nhất định

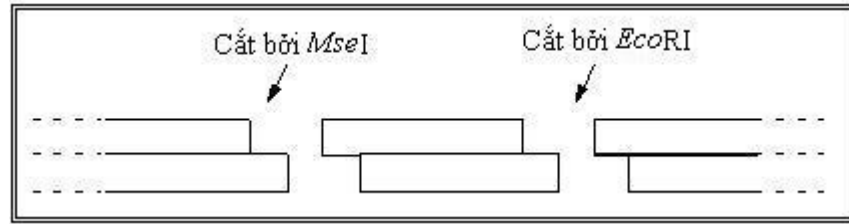
- Nhân đoạn DNA bằng kỹ thuật PCR qua hai giai đoạn với hai loại primer khác nhau.

❖ Enzyme được sử dụng

Để cắt DNA của bộ gene, hai enzyme cắt hạn chế được sử dụng:

- *MseI*: Là enzyme cắt ở vị trí xác định là 4 base
- *EcoRI*: Là enzyme cắt ở vị trí xác định là 6 base

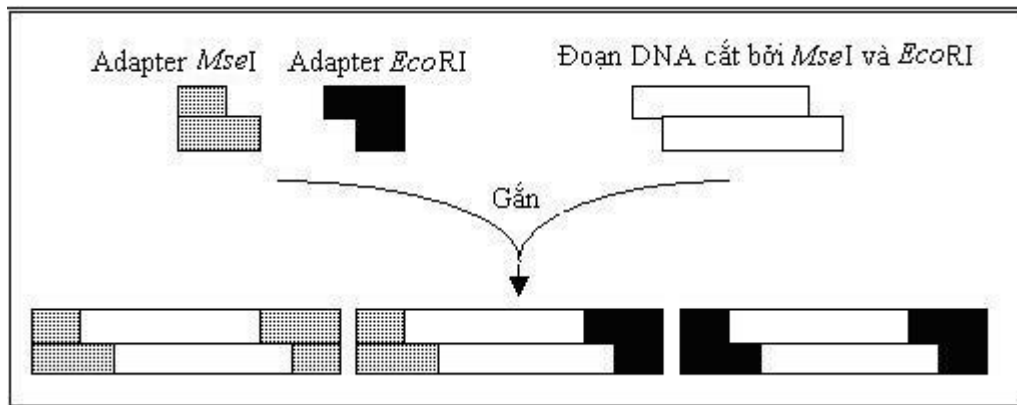
Ba loại đoạn DNA thu nhận được là: Một loại đoạn DNA được cắt bởi *EcoRI* ở cả hai đầu kết thúc, một loại đoạn DNA được cắt bởi *EcoRI* ở một đầu kết thúc này và *MseI* ở đầu kết thúc khác, và một loại đoạn DNA được cắt bởi *MseI* ở cả hai đầu kết thúc.



Hình 2.1: Cơ chế cắt của enzyme MseI và EcoRI

❖ Adapter

Adapters sợi đôi chuyên biệt cho cả vị trí của EcoRI và vị trí của MseI. Sự gắn kết của adapter đối với DNA đã được cắt thay đổi vị trí cắt để ngăn chặn sự phân cắt thứ hai xảy ra sau khi đã gắn kết.



Hình 2.2: Cơ chế gắn của adapter MseI và adapter EcoRI

❖ Primer

Có hai loại primer được sử dụng:

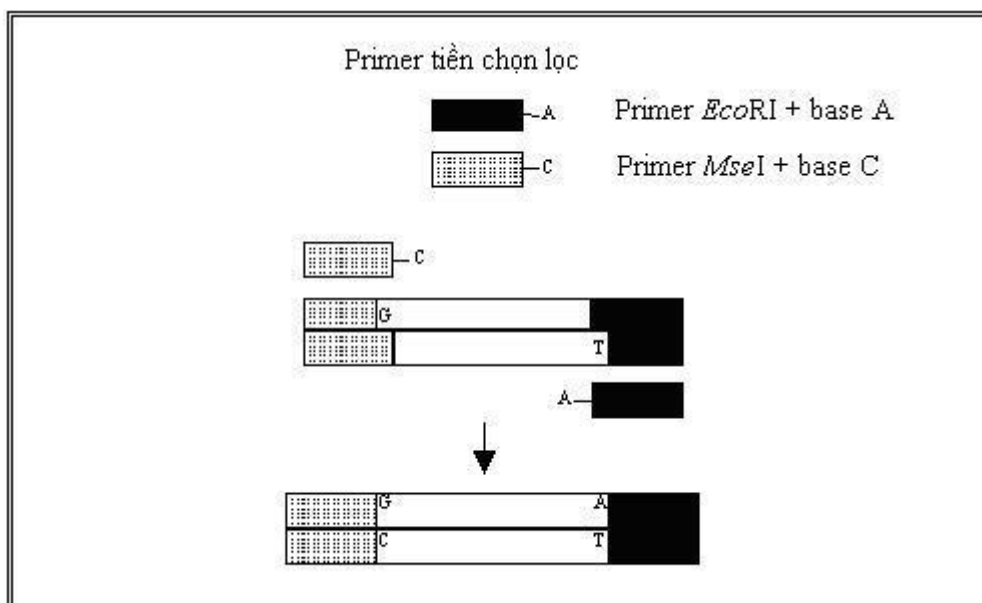
- Primer dùng trong khuếch đại tiền chọn lọc:

EcoRI A 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'

MseI C 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'

Primer này được thiết kế tương ứng với adapter đã sử dụng, đồng thời có gắn thêm một nucleotide ở đầu 3' để chọn lọc những đoạn DNA cần khuếch đại, cụ thể là EcoRI gắn thêm nucleotide A và MseI gắn thêm nucleotide C ở đầu 3'.

Kết quả chủ yếu của việc chọn trước PCR là các đoạn DNA đó có một vị trí cắt của MseI và EcoRI, và cũng có nucleotide quan tâm. Bước khuếch đại tiền chọn lọc sẽ làm giảm đi sự phức tạp trong việc thu nhận những đoạn DNA.



Hình 2.3: Cơ chế khuếch đại tiền chọn lọc trong phản ứng AFLP

- Primer dùng trong khuếch đại chọn lọc:

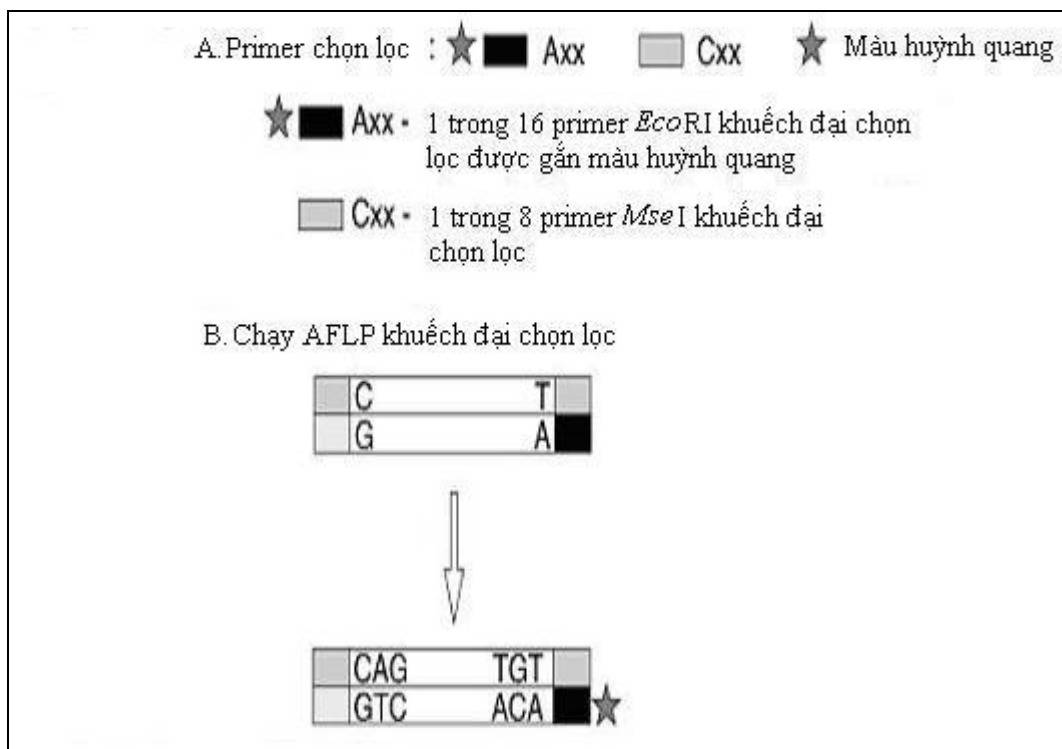
Là các primer khuếch đại tiền chọn lọc được thêm vào từ 1 đến 2 nucleotide ở đầu 3'. Ví dụ: *EcoRI* A gắn thêm CT và *MseI* C gắn thêm AG vào đầu 3'.



Kết quả là so với primer được thiết kế tương ứng với adapter thì primer khuếch đại chọn lọc có thêm ba nucleotide ở đầu 3'. Điều này giúp cho việc lựa chọn các đoạn DNA chặt chẽ hơn, giảm sự phức tạp khi đọc kết quả các đoạn DNA trên gel.

Sau khi được khuếch đại PCR với các primer này, kết quả của mỗi mẫu được phân tích trên máy giải trình tự DNA.

Việc chọn lựa sự khuếch đại với hai primer *EcoRI* và *MseI* là khuếch đại chủ yếu các đoạn DNA được gắn hai primer *EcoRI-MseI*. Các đoạn DNA *EcoRI-EcoRI* không được khuếch đại. Các đoạn DNA *MseI-MseI* không được nhận biết trong quá trình khuếch đại do không chứa chất phát huỳnh quang. Chỉ có những sợi chứa *EcoRI* được nhận biết.

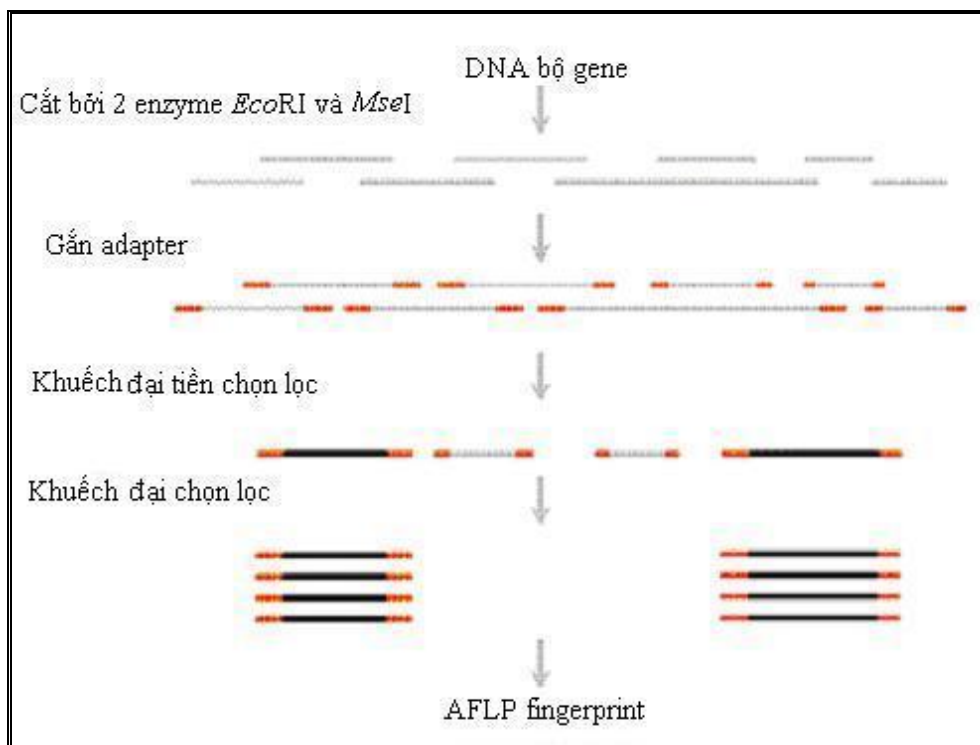


Hình 2.4: Cơ chế khuếch đại chọn lọc trong phản ứng AFLP

Trên cơ sở đó quy trình thực hiện AFLP có thể gồm bốn bước cơ bản:

- Tách chiết và tinh sạch DNA.
- Cắt các mẫu DNA nghiên cứu bằng các cặp enzyme giới hạn chọn lọc có bổ sung adapter tương ứng.
 - Tiến hành PCR hai giai đoạn với hai loại primer đặc hiệu, primer 1 + 1 nucleotide và primer 2 + 2 nucleotide.
 - Phân tích kết quả bằng các phần mềm thông dụng, lập cây phát sinh chủng loại để xác định sự khác biệt di truyền và đa dạng sinh học của các mẫu nghiên cứu.

Ta có thể tóm tắt kỹ thuật AFLP như sau:



Hình 2.5: Cơ chế phản ứng trong kỹ thuật AFLP

Kỹ thuật AFLP có các ưu điểm:

- Lượng DNA cần cho phản ứng rất ít
- Cho kết quả nhanh, ổn định và các lần lặp lại có độ tin cậy cao do kỹ thuật

AFLP có các điều kiện nghiêm ngặt của phản ứng PCR.

- Kỹ thuật AFLP thực hiện trên nhiều đối tượng sinh vật khác nhau.
- Không cần biết trật tự nucleotide của hệ gene.

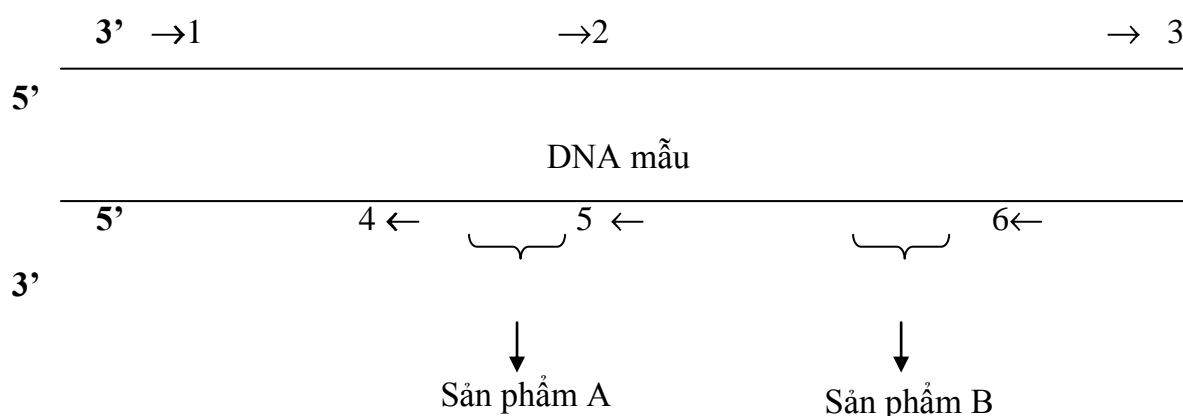
AFLP được ứng dụng trong việc xây dựng bản đồ gene thực vật bao gồm:

- Thiết lập nhóm gene liên kết nhau trong một thể nhiễm sắc trong quá trình cho tạp giao
- Làm bão hòa các vùng có gene lạ đưa vào
- Ước lượng mức độ có quan hệ giữa các giống.

2.6.3.5. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Là phương pháp xác định sự đa hình về kích thước các đoạn DNA sau khi thực hiện PCR mẫu DNA thí nghiệm. Kỹ thuật cho phép phát hiện thể đa hình

mà không cần biết trước thứ tự các nucleotide bằng cách dùng các primer tổng hợp, đơn, ngắn, dãy mã được thiết kế ngẫu nhiên để thực hiện PCR. Sau khi bắt cặp tại các vị trí chuyên biệt trên sợi DNA, primer tiến hành sự khuếch đại để tạo ra các đoạn có kích thước khác nhau, có khi lên tới 2 kb. Các đoạn với kích thước khác nhau này được nhận biết bằng điện di. Một primer có thể tạo nên sự đa hình DNA giữa các cá thể và các đoạn đa hình này có thể được dùng như những marker để xác định sự đa dạng di truyền. RAPD được xem như một phương pháp tạo sự đa hình DNA nhanh và hữu hiệu. Các bộ kit primer dùng cho RAPD đã được thương mại hóa trên thị trường và các primer cũng rất dễ được tổng hợp. Về trang thiết bị chỉ cần có máy PCR và hệ thống điện di. Cần quan tâm đến yếu tố nồng độ DNA, điều kiện thí nghiệm, chương trình chạy PCR và cần lựa chọn primer thích hợp cho sự đa hình cao.



Hình 2.6: Sự bắt cặp và khuếch đại trong phản ứng RAPD – PCR

Ghi chú: - Các mũi tên biểu thị cho các primer (các primer có trình tự giống nhau, khoảng 10 nucleotide); các số 1, 2, 3, 4, 5, 6 tượng trưng cho các vị trí trên DNA mẫu mà primer gắn vào; các primer bắt cặp vào các vị trí 1, 2, 3 trên mạch đơn DNA mẫu 3'- 5', các primer bắt cặp vào các vị trí 4, 5, 6 trên mạch đơn DNA mẫu 5' - 3'. Trong trường hợp này, có 2 sản phẩm PCR được tạo thành:

- Sản phẩm A: Là sản phẩm PCR khuếch đại một đoạn DNA nằm giữa hai vị trí 2 và 5.

- Sản phẩm B: Là sản phẩm PCR khuếch đại một đoạn DNA nằm giữa hai vị trí 3 và 6.

- Không có sản phẩm PCR hình thành bởi các primer nằm ở vị trí 1 và 4 do hai vị trí này quá xa nhau để cho phép hoàn thành sự khuếch đại.

- Không có sản phẩm hình thành bởi các primer nằm ở vị trí 2 và 4, 3 và 5, do các primer không có chiều hướng vào nhau.

Kỹ thuật RAPD được thực hiện theo ba bước cơ bản:

- Tách chiết DNA tổng số, nhân DNA bằng máy PCR
- Điện di trên gel agarose hoặc gel polyacrylamid
- Xác định tính đa dạng di truyền bằng các phần mềm thông dụng (NTSYSpc, UPGMA cluster, Gelcompar, lập dendrogram) các số liệu thu được cho thấy sự gần gũi hoặc cách biệt di truyền của các mẫu nghiên cứu.

PCR (Polymerase Chain Reaction).

Kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase do K. B. Mullis phát minh ra năm 1985. Đây là phương pháp invitro để nhân bản nhanh một đoạn DNA nào đó mà chỉ cần một khối lượng mẫu ban đầu rất nhỏ. Kỹ thuật này có độ nhạy rất cao và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như sinh học phân tử, chẩn đoán, di truyền quần thể và phân tích pháp y.

Kỹ thuật PCR dựa trên sự xúc tác của enzyme để nhân bản một đoạn DNA nhờ 1 cặp primer (oligonucleotide) tương hợp với hai đầu 3' ở cả hai mạch của đoạn DNA đích (target sequence). Các oligonucleotide được dùng làm primer này cho phép DNA mẫu được nhân bản nhờ sự xúc tác của DNA - polymerase. Quá trình này gồm 3 giai đoạn:

- **Biến tính:** Hai mạch của chuỗi xoắn kép được tách ra nhờ nhiệt độ cao (94 - 96⁰ C)
- **Bắt cặp:** Nhiệt độ phản ứng giảm xuống để primer liên kết vào các mạch của DNA đích theo nguyên tắc bổ sung (nhiệt độ này phụ thuộc vào primer nhưng thường là 50 - 56⁰ C)
- **Kéo dài:** Kéo dài dây mới nhờ primer dưới sự thực hiện của DNA - polymerase (72⁰ C).

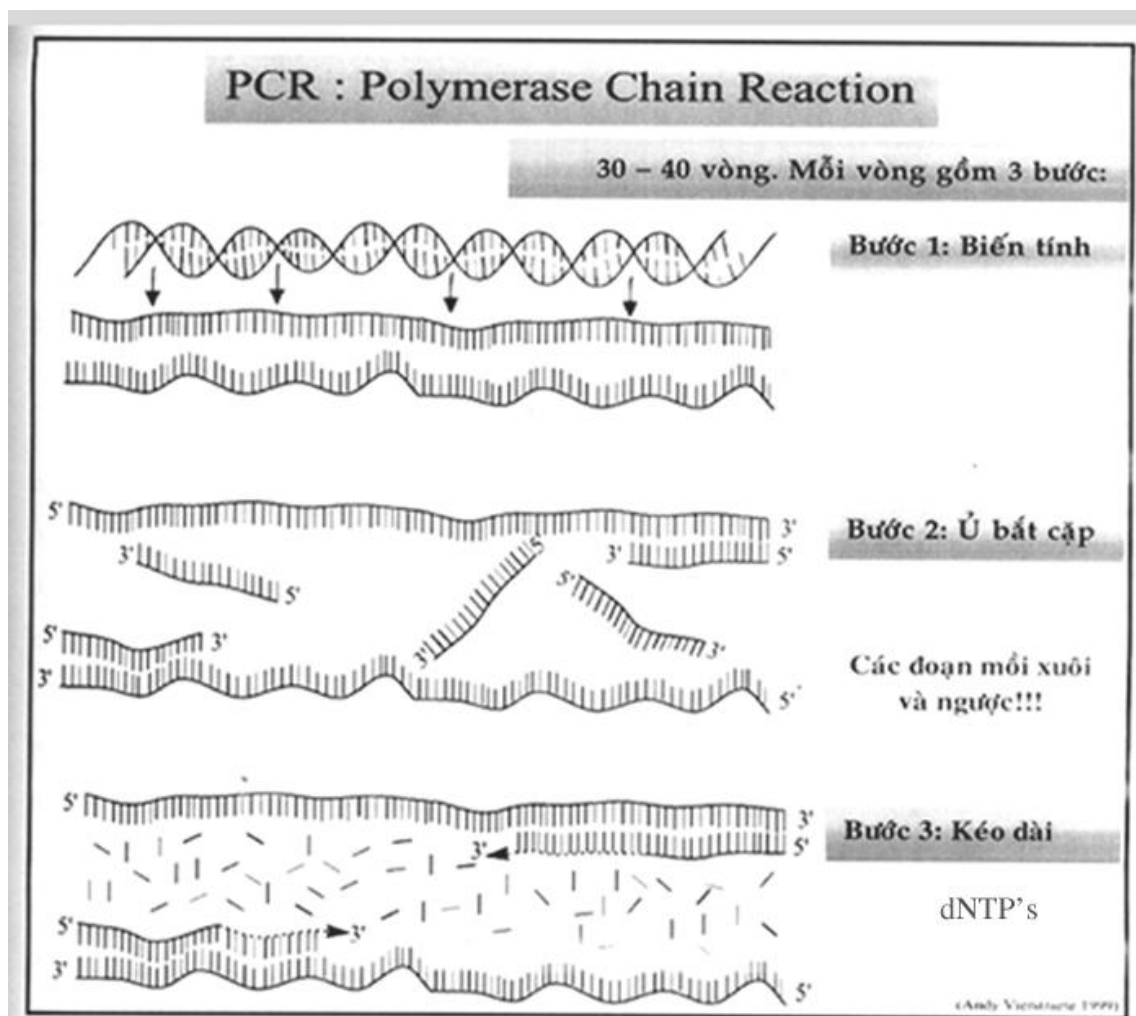
Đó là một chu trình PCR. Do các sản phẩm mới được tổng hợp ra lại được dùng làm khuôn cho một primer khác, nên sau mỗi chu kỳ số bản sao của DNA đích lại được tăng lên gấp đôi so với chu kỳ ngay trước đó. Chu kỳ gồm ba giai đoạn như trên được lặp lại nhiều lần (thường là 30 - 40 chu kỳ) sẽ dẫn đến việc nhân bản đoạn DNA đích đến hàng triệu phiên bản trong vài giờ đồng hồ.

Ban đầu, khi chưa sử dụng loại enzyme Taq - polymerase người ta phải thêm DNA - polymerase trong từng chu kỳ nhân bản, vì DNA - polymerase cần cho quá trình tổng hợp DNA không chịu được nhiệt độ lớn hơn 90°C ở giai đoạn tách hai sợi của phân tử DNA. Sau này khi tìm được loại Taq - polymerase từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* - loại vi khuẩn sống ở suối nước nóng - một loại enzyme chịu nhiệt, thì chỉ cần cho một lần Taq - polymerase là đủ.

Để cho các primer dễ dàng liên kết vào đoạn tương hợp trên DNA đích người ta thường tạo ra một số thay đổi ở primer. Chẳng hạn như gắn thêm điểm tiếp nhận enzyme giới hạn vào đầu 5' của mỗi primer, hay việc làm thay đổi vùng xung quanh codon khởi đầu có thể làm tăng hiệu quả dịch mã ở sinh vật *Eukaryote* được chuyển gen...

Một phản ứng PCR có sự tham gia của các thành phần: Taq buffer, MgCl_2 , dNTP, Primer, Taq DNA polymerase, DNA khuôn mẫu và H_2O . Để phản ứng PCR thành công thì các thành phần này phải có một sự kết hợp hài hòa với nhau về nồng độ.

Có thể tóm tắt quá trình PCR như sau:



Hình 2.7: Cơ chế của phản ứng PCR

Tuy nhiên trong thực tế khi thực hiện phản ứng RAPD – PCR thường gặp phải một số vấn đề:

- Nồng độ DNA mẫu khác nhau có thể làm thay đổi số band trên bảng gel điện di. Vì vậy nồng độ DNA mẫu thích hợp cho mỗi phản ứng là 20 – 50 ng.
- PCR buffer thường được cung cấp theo Taq - polymerase và có thể có hoặc không có Mg^{2+} . Kỹ thuật RAPD phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ Mg^{2+} , nếu nồng độ Mg^{2+} khác nhau thì sản phẩm RAPD sẽ khác nhau.
- Taq - polymerase của các nhà sản xuất khác nhau cho kết quả sản phẩm khác nhau rất lớn. Vì vậy, loại Taq - polymerase và nồng độ của Taq đòi hỏi phải chính xác và được xác định qua thực nghiệm.

➤ Chu kỳ nhiệt có thể có sự thay đổi về số chu kỳ và nhiệt độ, điều này phụ thuộc vào máy PCR và độ dày của eppendorf.

Vai trò của các thành phần trong phản ứng PCR.

➤ Nồng độ các chất trong hỗn hợp PCR:

- Nồng độ enzyme: thường sử dụng ở nồng độ 0,1 – 0,5 U/25 μ l dung dịch phản ứng. Nếu như nồng độ enzyme *Taq* polymerase quá cao có thể làm phát sinh những sản phẩm không đặc hiệu, còn nếu nồng độ enzyme *Taq* polymerase quá thấp thì phản ứng không xảy ra hoàn toàn do không có đủ enzyme.

- Các dNTPs: Hàm lượng các dNTPs trong khoảng 20 – 200 μ M cho kết quả ổn định và đặc hiệu. Bốn loại dNTPs (A, T, G, C) phải có nồng độ gần tương đương nhau.

- Hàm lượng $MgCl_2$: Nồng độ tối ưu của $MgCl_2$ cho kết quả PCR tốt. Ion Mg^+ có thể ảnh hưởng đến:

- Nhiệt độ để biến tính mạch đôi thành mạch đơn.

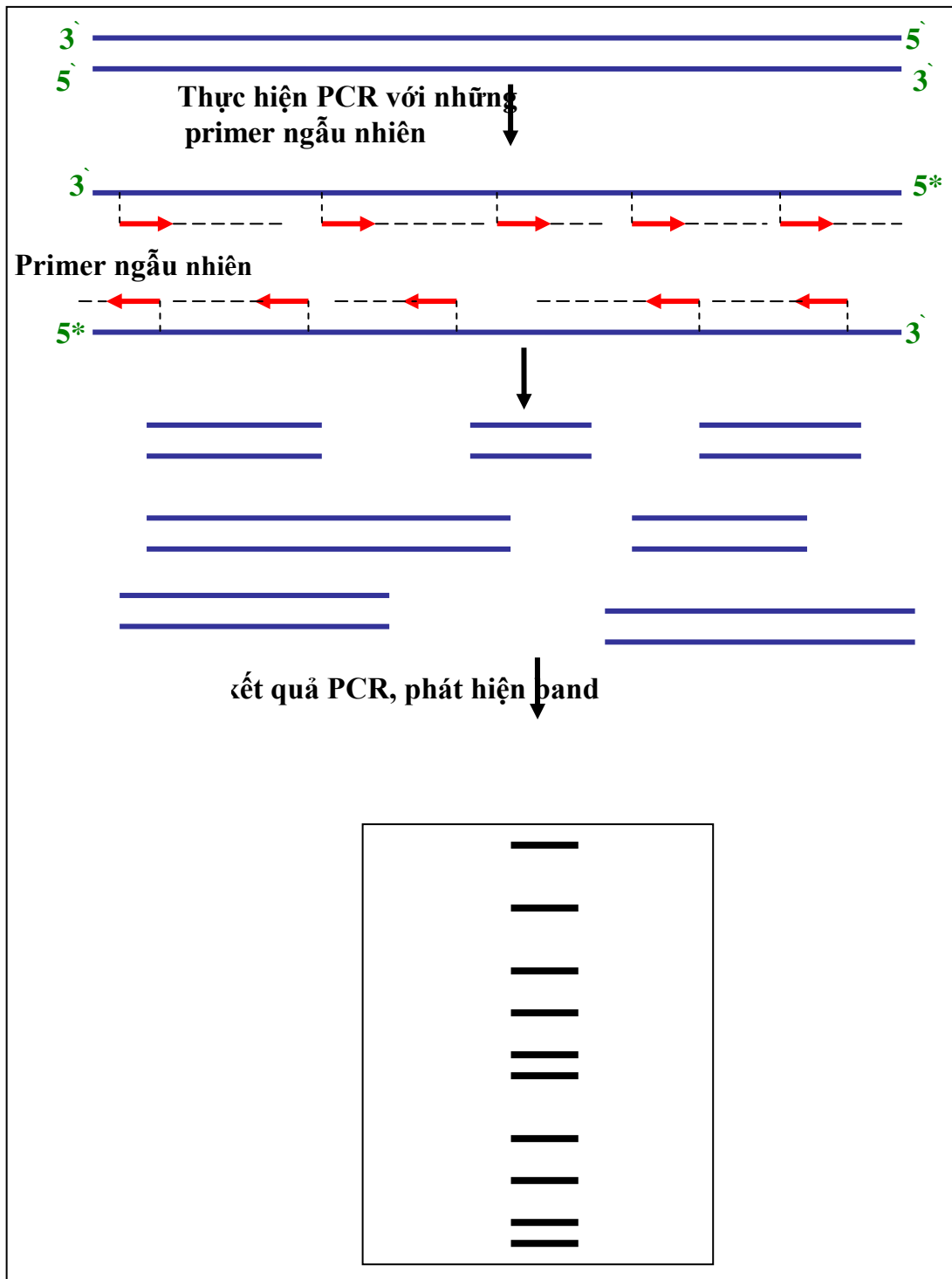
- Quá trình bắt cặp của primer: $MgCl_2$ làm tăng khả năng bắt cặp chính xác của primer với DNA template.

- Sự đặc hiệu của sản phẩm PCR: bao gồm cả sự bắt cặp chính xác của primer với DNA khuôn và sự nối dài chính xác.

- Hoạt động của enzyme và sự trung thực của kết quả.

Thông thường hàm lượng ion Mg^+ cần thiết từ 0,5 – 2.5 mM.

Hiện trong nước đã áp dụng phương pháp RAPD-PCR để nghiên cứu đa dạng di truyền như. Đánh giá đa dạng di truyền xuất xứ lim xanh bằng chỉ thị RAPD và AND lục lạp (*Nông nghiệp và PTNT, 2005, 15, 80-8*) của Nguyễn Hoàng Nghĩa và CS Sử dụng phương pháp RAPD để xác định nguồn gốc giống dứa Cayenne và xây dựng biện pháp phòng trừ một số sâu bệnh hại quan trọng trên cây dứa của TS. Lê Đình Đôn, KS. Huỳnh Văn Quang - Bộ môn Bảo vệ thực vật - ĐH Nông lâm. 2004 Sử dụng chỉ thị phân tử RAPD-PCR để đánh giá tính đa dạng di truyền ở một số loài cây dược liệu bản địa ở Việt Nam”. ThS. Hoàng Thị Hoà, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN.v.v.



Hình 2.8 Sơ đồ tóm tắt quy trình RAPD-PCR

CHƯƠNG III

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thời gian và địa điểm.

3.1.1. Thời gian.

- Đề tài được thực hiện từ tháng 3/2006 đến tháng 6/2006.

3.1.2. Địa điểm.

➤ Thực hiện thu thập mẫu lá điều của những cây điều đặc biệt và điển hình. Các mẫu điều được lấy tại các huyện của tỉnh Bình Định.

➤ Mẫu được ly trích DNA, chạy RAPD tại Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hóa Sinh trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

3.2. Phương pháp chọn mẫu.

Tiến hành thu thập mẫu lá của những cây điều có những đặc điểm nổi bật và điển hình trong vườn của những nông hộ được khảo sát theo mẫu in sẵn (xem phụ lục). Lựa chọn nông hộ để khảo sát một cách ngẫu nhiên. Những đặc điểm nổi bật được chọn chủ yếu gồm:

- Năng suất: cao hay thấp.
- Ra hoa: nhiều hay ít, sớm hay muộn, một đợt hay nhiều đợt, nở đồng loạt hay phân tán.
- Chùm: nhiều hay ít, một chùm có nhiều hay ít hạt.
- Hạt: to hay nhỏ, màu sắc hạt.
- Thân và cành cây: sum suê hay thưa thớt.
- Hiện tượng rụng trái non: nhiều hay ít.
- Quả: to hay nhỏ, màu sắc, ngọt hay chát.
- Khả năng chống chịu sâu hại: cao hay thấp.

3.3.Vật liệu

3.3.1. Các mẫu điều thí nghiệm.

➤ Địa điểm lấy mẫu: Mẫu được lấy tại các nông hộ ở 3 huyện Hoài Nhơn, Hoài Ân, An Lão, của tỉnh Bình Định.

➤ Cách chọn mẫu: Đầu tiên thu thập các thông tin về những cây điều trong vườn, sau đó chọn các mẫu có những tính trạng đặc biệt. Tùy theo thông tin thu được mà số mẫu thu nhận có thể khác nhau. Nếu vườn điều có nhiều cây đặc biệt thì có thể thu thập 3 – 5 mẫu, nếu không có cây nào đặc biệt thì có thể không lấy.

➤ Cách lấy mẫu: Chọn những lá tươi tốt, lấy cả lá non, lá trưởng thành và lá già. Mỗi mẫu lấy khoảng 4 - 6 lá, cho vào bịch nylon và để vào thùng lạnh để bảo quản độ tươi của lá. Đồng thời ghi đầy đủ những thông tin của cây được lấy mẫu theo phiếu điều tra có sẵn (phụ lục I)

➤ Cách bảo quản mẫu đưa về phòng thí nghiệm: Mẫu sau khi lấy được cho vào thùng lạnh để bảo quản tạm thời. Sau đó cho vào tủ lạnh, để âm ở tầng mát và dùng thùng lạnh đựng mẫu vận chuyển về phòng thí nghiệm.

3.3.2 Phương pháp nghiên cứu.

3.3.2.1. Hóa chất thí nghiệm và kiểm tra DNA

Hóa chất dùng cho tách chiết và kiểm tra DNA lá điều

➤ Dung dịch chloroform – isoamyl alcohol (CIA) có tỉ lệ chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1.

➤ RNase (10 mg/ml) – enzyme phân huỷ RNA.

➤ Dung dịch isopropanol lạnh.

➤ Sodiumacetate 3 M.

➤ Ethanol 96 % và ethanol 70 %.

➤ Agarose.

➤ TAE (Tris – Acetate – EDTA).

➤ Dịch tách chiết EB (Extraction buffer), pha 100 ml (bảng 3.1).

- Bước 2: Thêm 500 µl Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1), khuấy bằng vortex 10 phút, li tâm 5 phút 14000 vòng ở 10⁰ C.
- Bước 3: Chuyển lấy dịch trong lặp lại bước 2.
- Bước 4: Chuyển lấy dịch trong, thêm vào 2 ul RNase, ủ ở 37⁰ C trong 1 giờ.
- Bước 5: Thêm vào 250 ul dung dịch isopropanol lạnh. Để tủa ở -20⁰ C khoảng 30 phút (nên để qua đêm).
- Bước 6: Li tâm 5 phút 14000 vòng ở 10⁰ C. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 7: Cho vào 300 µl TE 1X, ủ ở 37⁰ C trong 1 giờ.
- Bước 8: Thêm 20 µl muối Sodium acetate 3 M, và 640 µl Ethanol 100%, trộn đều và để - 20⁰ C trong 30 phút.
- Bước 9: Li tâm 10 phút 14000 vòng ở 10⁰ C, đổ bỏ dịch trong.
- Bước 10: Rửa cặn với 400 µl Ethanol 70% bằng cách ly tâm 2 phút 14000 vòng ở 10⁰ C, đổ bỏ dịch trong.
- Bước 11: Lặp lại bước 10. Để khô cặn, hoà tan cặn trong 100 µl TE 1X, ủ ở 37⁰ C trong 30 phút.
- Bước 12: Bảo quản mẫu ở 4⁰ C.

3.3.3.2. Định tính DNA bằng phương pháp điện di.

Để định tính DNA, ta điện di các mẫu DNA đã ly trích trên gel agarose. Trong điện trường DNA di chuyển từ điện cực âm sang điện cực dương, vì DNA mang điện âm (do tính chất của nhóm phosphate). Khi DNA di chuyển qua các lỗ của agarose, sự cọ sát giữa hạt agarose và phân tử DNA tạo ra lực kháng làm ngăn cản sự chuyển dịch của DNA. DNA có phân tử càng lớn thì lực cản càng mạnh, do đó DNA có phân tử càng nhỏ di chuyển càng nhanh. Nhờ vậy ta có thể phân loại được các đoạn DNA trên gel agarose.

Sau khi điện di trên gel, các đoạn DNA được phân ra tùy theo trọng lượng phân tử. Có thể quan sát chúng bằng mắt nhờ kỹ thuật nhuộm màu với ethidium bromide và chụp gel bằng tia cực tím.

Cách tiến hành:

- Pha gel agarose với nồng độ 0,8%: Cân 0,1 g agarose cho vào 12,5 ml dung dịch TAE 0,5X. Đun sôi bằng lò Viba cho agarose tan thật đều.

- Đổ gel, chờ agarose đông
- Load mẫu vào các giếng với tỷ lệ 2 µl loading dye và 4 µl DNA mẫu.
- Chạy điện di ở điều kiện 100 V, 250 mA, thời gian khoảng 20 phút.
- Nhuộm ethidium bromide khoảng 15 phút, sau đó đưa vào máy Geldoc đọc kết quả.

3.3.3.3. Định lượng DNA bằng quang phổ kế.

Trên nguyên tắc, sự hấp thụ ánh sáng khác nhau của các base nitơ của phân tử DNA mạch kép và mạch đơn, có thể xác định hàm lượng của DNA trong dung dịch. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm (OD_{260}) của các mẫu DNA cho phép xác định nồng độ DNA trong dung dịch. Đồng thời để kiểm tra độ tinh sạch của dung dịch DNA thường đo giá trị OD_{280} . Do protein có phổ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280 nm, đồng thời hấp thụ ở bước sóng 260 nm gây nên sự sai lệch khi tính nồng độ của acid nucleic. Khi giá trị $OD_{260}/OD_{280} = 1,8 - 2,2$ thì dịch trích DNA được coi là tinh sạch.

Hàm lượng DNA được tính theo công thức:

$$\text{DNA (ng/ l)} = [(62.9 * OD_{260\text{nm}}) - (36 * OD_{280\text{nm}})] * \text{Độ pha loãng}$$

Cách tiến hành:

- Xây dựng đường chuẩn: Dùng dung dịch TE 1X để tạo đường chuẩn.
- Pha loãng dung dịch DNA đến nồng độ thích hợp để đo (thường pha loãng 100 lần) với dung dịch TE 1X: Hút 10 µl dung dịch DNA hòa tan với 90 µl TE 1X. Cho vào Curvette. Tiến hành đo OD. Kết quả đo OD. DNA sau khi tách chiết và kiểm tra định tính, định lượng sẽ được bảo quản ở 4⁰ C để dùng cho việc chạy RAPD.

3.3.3.4 Hóa chất và quy trình chạy RAPD – PCR.

Bảng 3.3: Hóa chất cho phản RAPD – PCR.

TÊN	NỒNG ĐỘ
PCR BUFFER	250 μ m
Taq DNA polymerase	0,5u
MgCl ₂	200 μ m
DNTP	120 μ m
Primer 11	6,5 μ m
Nước cất	
DNA	20ng/ μ l

Bảng 3.4 thành phần hóa chất cho một phản ứng RAPD – PCR.

HÓA CHẤT	DUNG DỊCH GỐC	THỂ TÍCH SỬ DỤNG	NỒNG ĐỘ CUỐI
PCR BUFFER	25mM	2,5 μ l	250 M μ l
Taq DNA polymerase	5u	0,1 μ l	0,5u
MgCl ₂	25mM	2 μ l	200 M μ l
dNTP	10MM	0,3 μ l	120 M μ l
Primer 11	10PMOL/L	0,65 μ l	6,5PMOL(260 μ m/ μ l)
Nước		18,45 μ l	

Quy trình nhiệt RAPD - PCR

Bảng 3.5: Chương trình nhiệt cho phản ứng RAPD – PCR

Số chu kỳ	Nhiệt độ (⁰ C)	Thời gian (phút)
1	94	4
	94	1
37	T _a	1
	72	2
1	72	10
Hold 4 ⁰ C		

3.3.3.5. Phân tích kết quả bằng phần mềm NTSYS

Các band thu được từ kết quả điện di RAPD và số liệu từ AFLP được mã hóa thành dạng nhị phân 0 và 1. Band nào có thì chuyển thành 1, band không có chuyển thành 0. Bảng mã hóa được lưu dưới dạng file excel và chuyển sang phần mềm NTSYS phiên bản 2.1 để xử lý.

3.3.4. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm

3.3.4.1. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm cần cho tách chiết và kiểm tra DNA

- Chày cối nghiền mẫu (Đức).
- Cân điện tử (Ohaus, Mỹ).
- Ống eppendorf 1,5 ml (Pháp).
- Các loại pipette 0,5 μ l – 10 μ l, 10 μ l – 100 μ l và 100 μ l – 1000 μ l (Nichiryo, Nhật).
- Các loại đầu tipe 0,5 μ l – 10 μ l, 10 μ l – 100 μ l và 100 μ l – 1000 μ l (Đức).
- Bao tay (Malaysia).
- Máy vi ly tâm 14.000 vòng/phút (Hettich, Đức).
- Tủ sấy (Anh).
- Tủ ủ mẫu (Anh).
- Tủ – 20°C (Sanyo, Nhật).
- Nồi hấp autoclave (Nhật).
- Máy điện di (Biorad, Thụy Điển và Cosmo Bio Co, Nhật).
- Máy vortex (Đức).
- Tủ hút, tủ cấy vô trùng (Việt Nam / Anh).
- Máy chụp hình DNA Geldoc (Biorad, USA).
- Giếng đổ gel.

3.3.4.2. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm cần cho kỹ thuật PCR – RAPD

- Các loại pipette 0,5 μ l – 10 μ l và 10 μ l – 100 μ l.
- Các loại đầu tipe 0,5 μ l – 10 μ l và 10 μ l – 100 μ l.
- Bao tay.
- Tủ hút (Việt Nam / Anh).
- Tủ lạnh các loại (Nhật).
- Ống eppendorf 200 μ l.
- Máy PCR PTC Thermocycle 100.
- Giếng đổ gel.
- Máy điện di (Biorad).

➤ Máy chụp hình DNA Geldoc.

Chỉ tiêu đánh giá: Số lượng và chất lượng các band DNA trên gel điện di.

Sau khi xác định quy trình tối ưu của phản ứng RAPD – PCR, tiến hành chạy RAPD với 50 mẫu và phân tích kết quả bằng phần mềm NTSYS 2.1.

CHƯƠNG IV

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Thu thập mẫu tại các vùng trồng điều thuộc tỉnh Bình Định.

Chúng tôi đã tiến hành thu thập 50 mẫu điều thuộc 3 huyện của tỉnh Bình Định với các đặc điểm cơ bản về: kích thước hạt, quả; năng suất; thời gian ra hoa; số đợt trái trong năm, màu sắc hạt, quả;... Trong đó nhóm điều Việt Nam chiếm 38%, điều Ấn Độ chiếm 62% (cách phân chia nhóm điều do người trồng điều đưa ra); tính trạng hạt to chiếm 54%, hạt nhỏ và trung bình chiếm 46%; tính trạng năng suất cao chiếm 64%, năng suất thấp và trung bình chiếm 36%; các mẫu vừa có tính trạng hạt to vừa cho năng suất cao chiếm 32% và có vài mẫu mang những đặc điểm đặc biệt như: trái màu trắng, màu nâu, màu xanh, màu hồng hoa nhiều nhưng không trái; ra hoa, trái sớm... (các đặc điểm chi tiết được trình bày ở phần phụ lục II).

Do cây điều ở tỉnh Bình Định được trồng theo một cách tự phát trong dân và các chương trình gây rừng, phủ xanh đồi núi trọc đồng thời giúp người dân xóa đói giảm nghèo nên về mặt giống còn nhiều hạn chế. Các giống điều chưa được phân chia rõ rệt. Theo kinh nghiệm người trồng điều chia làm hai loại: Một loại cây phân tán rộng, hoa chùm, lá non màu đỏ gọi là điều Ấn Độ; một loại cây phân tán hẹp hoặc trung bình, lá non màu xanh gọi là điều Việt Nam.

Để đánh giá đa dạng di truyền Tôi đã thu thập mẫu nhiều nơi và lựa chọn những tính trạng đặc biệt vì vậy số lượng mẫu tuy ít nhưng vẫn mang tính đại diện cho việc đánh giá.

Tôi tiến hành quá trình li trích DNA của 50 mẫu và thu được DNA ở cả 50 mẫu đạt tiêu chuẩn dùng cho các kỹ thuật phân tử. Việc kiểm tra kết quả li trích chỉ được thực hiện trên gel điện di. Sau khi điện di được nhuộm ethidium bromide 25 phút. Kết quả được nhân điện trên hình chụp.

Qua hình chụp kết quả li trích. Tôi thấy kết quả li trích DNA của tôi còn nhiều tạp chất và DNA gãy. Từ quá trình thực hiện Tôi đã rút ra một số nhận xét như trình bày ở phần 4.2.

4.2. Một số vấn đề tách chiết DNA ở lá điều

➤ Đặc điểm: Sau khi tách chiết, DNA lá điều thường bị gãy nhiều (hình 4.1), có lẽ do tế bào lá điều có lớp thành tế bào dày và cứng, khó nghiền nên khi nghiền mạnh tay dễ làm gãy DNA. Lượng DNA thu được trong nghiên cứu này không cao, trung bình khoảng 70 – 80 ng/μl, có thể do lá điều có nhiều chất thứ cấp khác như polyphenol, polypeptide,... gây khó khăn cho quá trình tách chiết. Một số mẫu có nồng độ DNA rất thấp (khoảng 30 ng/μl trở xuống) đều là của những mẫu lá non hay những lá đã trưởng thành nhưng còn mềm.

➤ Khó khăn trong việc tách DNA từ lá điều:

- Lá điều già trong quá trình li trích thu được rất ít DNA không đạt yêu cầu cho việc thực hiện phản ứng RAPD- PCR.

- Là điều còn non cho kết quả tách DNA không tốt giá trị đo OD cao nhưng tạp nhiều. Điều này có thể do lá non đang trong thời kỳ sinh trưởng mạnh nên nồng độ các hợp chất thứ cấp nhiều, ảnh hưởng không tốt đến việc tách chiết DNA, ngoài ra trong lá non hàm lượng nước cao làm cho số lượng DNA trong lá non ít hơn lá trưởng thành.

- Vì vậy kết quả li trích chỉ đạt được kết quả tốt đối với lá trưởng thành.

➤ Biện pháp khắc phục:

- Đối với lá điều trưởng thành, chúng tôi cũng đưa ra một số lưu ý khi thực hiện quá trình tách chiết.

-Trước khi nghiền mẫu đem EB ủ ở 65⁰C để tách dịch trích bị kết

➤ Cần phải giữ cho lá không bị khô trước khi nghiền, công đoạn nghiền phải đều tay, không nghiền mạnh, tránh tạo bọt. Sử dụng máy vortex khuấy trộn kỹ ở tốc độ thấp, khoảng 600 –1.000 vòng/phút.

➤ Khi thêm 500 μl chloroform : isoamylalcohol (24:1), sau đó có thể dùng máy vortex khuấy trộn ở tốc độ thấp như bước 1 hay chỉ cần đảo nhẹ trong khoảng 10 phút để hạn chế gãy DNA.

➤ Chỉ nên hút khoảng 500 µl dịch ở bên trên, tránh chạm đầu pipet vào vách ngăn cách giữa 2 pha vì đây là phần chứa nhiều protein bị loại bỏ sẽ làm ảnh hưởng đến kết quả ly trích.

➤ Chỉ nên hút khoảng 250 – 300 µl dịch trích.

➤ Thêm vào 250 µl dung dịch isopropanol lạnh. Để tủa ở -20°C trong khoảng 1 giờ (nên để qua đêm). Nên lấy tỉ lệ DNA : dung dịch isopropanol lạnh tỉ lệ 1 : 1.

➤ Cho vào 300 µl TE 1 X, ủ 37°C trong 1 giờ. Có thể chỉ để khoảng 30 phút vì mục đích của bước này chỉ để cho DNA tan ra.

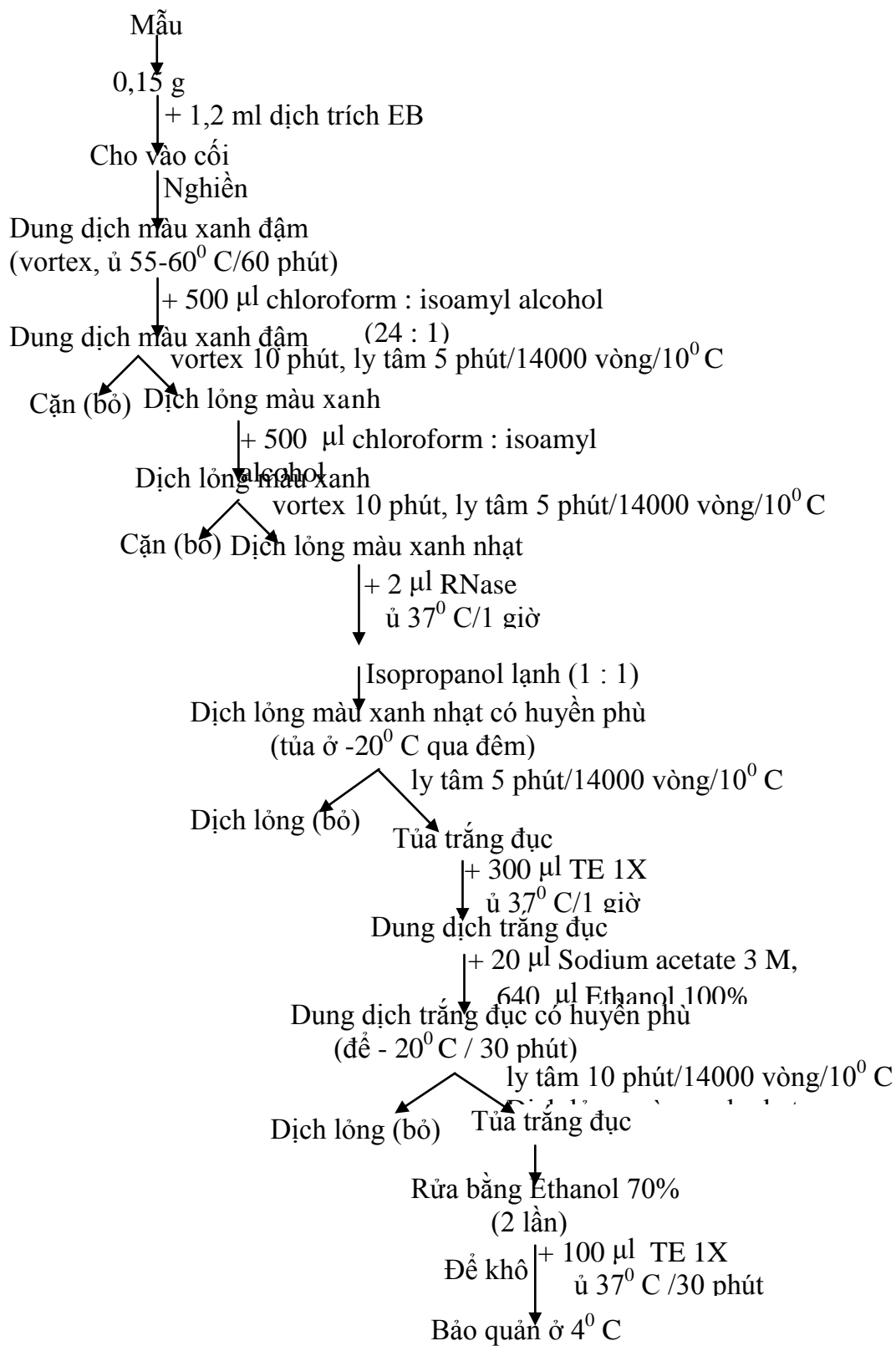
➤ Lặp lại bước trên, để khô cạn, hòa tan cạn trong 100 µl TE 1 X, ủ ở 37°C trong 30 phút, phải để thật khô, không còn ethanol trong kết tủa DNA do ethanol ảnh hưởng xấu tới DNA và phản ứng PCR.

➤ So với một số nghiên cứu trước trong quy trình ly trích tôi có một vài thay đổi.

Tăng thời gian ủ từ 45 phút lên 60 phút giảm nhiệt độ ủ còn 55°C nhằm mục đích tăng sự ổn định của DNA.

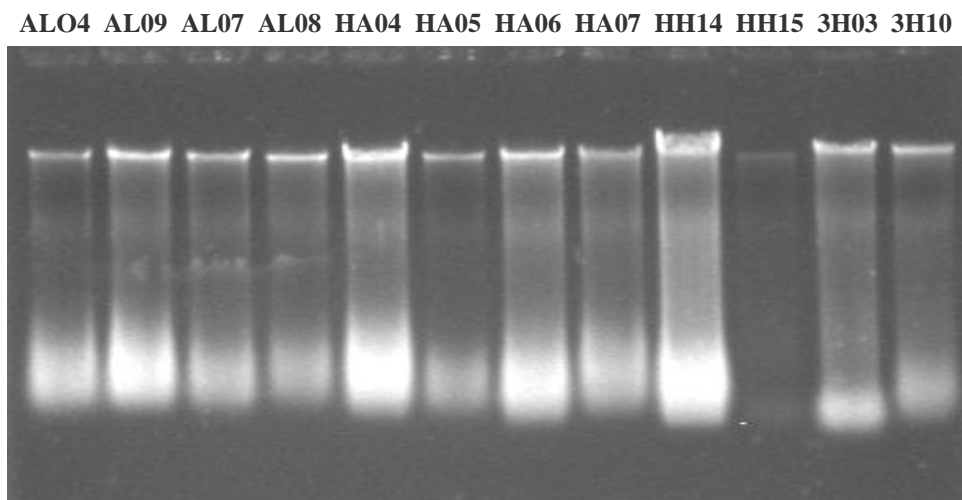
Từ kinh nghiệm thực nghiệm tôi đưa ra quy trình sau.

Tóm tắt quy trình ly trích:



Hình 4.1 : Quy trình ly trích DNA

Quy trình ly trích sử dụng 2-mercaptoethanol có tác dụng phá hủy mạnh thành tế bào giúp cho việc giải phóng DNA hiệu quả hơn, muối sodium acetate làm bất hoạt enzyme phân hủy DNA và cho chloroform isoamyl alcohol 2 lần với việc ly tâm tốc độ cao giúp loại bỏ được tạp chất như protein, polysaccharide...qua đó chất lượng DNA thu được tốt hơn. Nhìn chung quy trình ly trích khá ổn định và hiệu quả, vấn đề là tìm cách hạn chế sự đứt gãy của DNA, điều này phụ thuộc nhiều vào các tác nhân cơ học.



Hình 4.2 Kết quả ly trích DNA được điện di trên gel agarose nồng độ 0,8%

4.3 Kết quả thực hiện RAPD – PCR và đánh giá đa dạng di truyền.

Việc phát triển kỹ thuật RAPD-PCR đã được thực hiện ở một số đề tài trước tại trung tâm trên các mẫu thu thập ở địa phương khác (Nghiên cứu đa dạng di truyền các cá thể điều trồng tại Bình Thuận của Phạm Văn Bình 2005, Nghiên cứu đa dạng di truyền các cá thể điều trồng tại Vũng Tàu của Quỳnh Anh 2005). Nhìn chung các phương pháp trước đây đã tương đối ổn định. Chính vì vậy không nghiên cứu để tìm ra nghiệm thức tốt nhất như ở các đề tài trước. Tôi chỉ chạy RAPD-PCR ở nghiệm thức mà đề tài trước cho là tốt nhất.

4.3.1. Đánh giá mức độ đa dạng di truyền của một số cá thể điều được trồng tại Bình Định với primer 11

Chúng tôi thực hiện chạy RAPD với primer 11 trên 50 mẫu kết quả thu được 8 band trong đó có 3 band đa hình và 5 band đồng hình (kích thước khoảng 580bp và

850bp), kích cỡ các band đa hình có ở mẫu này nhưng không có ở mẫu kia. Các band đa hình là cơ sở phân biệt giữa các mẫu có tính trạng khác nhau từ đó làm nền tảng để phân chia và xác định giống. Các band đa hình chỉ xuất hiện ở một vài mẫu.

Bảng 4.1 Thành phần cho một phản ứng RAPD-PCR:

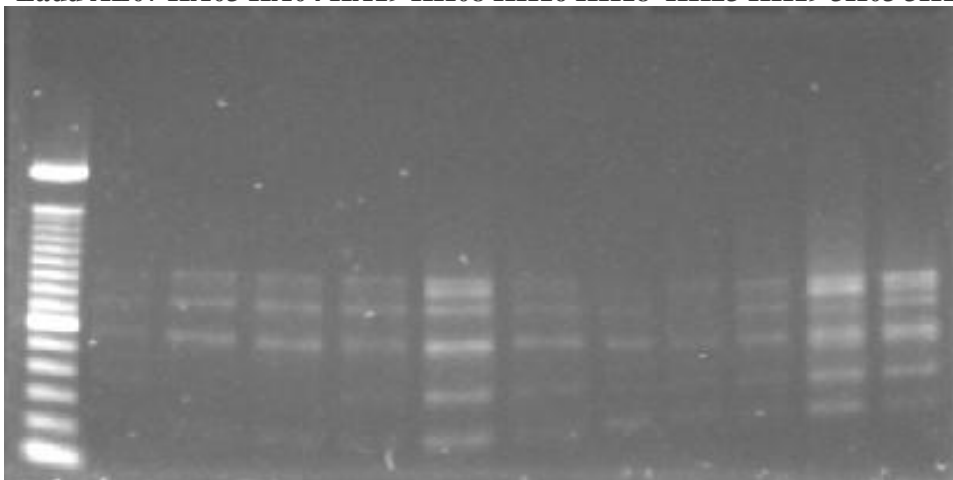
HÓA CHẤT	DUNG DỊCH GỐC	THỂ TÍCH SỬ DỤNG	NỒNG ĐỘ CUỐI
PCR BUFFER	25mM	2,5 µl	250M µl
Taq DNA Polymerase	5u	0,1 µl	0,5u
MgCl ₂	25mM	2 µl	200M µl
dNTP	10MM	0,3 µl	120M µl
Primer	10pmol/l	0,65 µl	6,5pmol(260µm/ µl)
Nước		18,45 µl	

Bảng 4.2 Chu trình nhiệt cho phản ứng RAPD-PCR

Số chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
1	94	4
	94	1
37	33	1
	72	2
1	72	10
Hold 4 ⁰ C		

Sau khi thực hiện phản ứng RAPD-PCR, sản phẩm sau phản ứng được điện di trên gel agarose nồng độ 2% với dung lượng 8 µl mẫu với 3 µl loadindye điện di trên điện cực 50V-100mA thời gian 60 phút, sau đó đem nhuộm trong ethidium bromide trong 30 phút. Kết quả được chụp tại máy chụp gel hình 4.3.

Ladd AL07 HA03 HA04 HA19 HH08 HH16 HH18 HH23 HH19 3H05 3H11



Hình 4.3: Kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR trên gel khi thực hiện với primer11

4.3.2 Đánh giá quy trình phản ứng RAPD-PCR

Quy trình thực hiện phản ứng RAPD-PCR khá ổn định cho nhiều band, có độ phân giải và độ sáng khá tốt, song còn một số vấn đề:

Khả năng nhân bản qua phản ứng RAPD-PCR cao, tuy nhiên khả năng làm phát sinh chỉ thị phân tử lại thấp, thể hiện mức độ giống nhau về số lượng và độ dài các band trong tổng số các mẫu thực hiện RAPD-PCR thành công. Như vậy, hiệu quả phát hiện chỉ thị phân tử bằng kỹ thuật RAPD-PCR có hạn chế.

Một số mẫu không ra kết quả tốt: chúng tôi nhận thấy một điều là những mẫu ra kết quả không tốt là những mẫu lá trưởng thành nhưng còn nền, có nồng độ DNA ly trích được thấp (chỉ khoảng 20-30ng/ μ l) hoặc do hàm lượng tạp chất trong quá trình ly trích. Với những mẫu này có thể thực hiện lại và có thể cho nhiều hơn 1 μ l DNA mẫu vào hỗn hợp phản ứng.

Một số band không rõ: có thể trong quá trình điện di, các band có độ dài gần bằng nhau nên khó tách ra rõ ràng. Chúng tôi sử dụng nồng độ 2% agarose và điện di ở 50V trong 1 giờ cho độ phân tách cao hơn xong vẫn gặp một số khó khăn, điển hình là các band di chuyển không đều, có thể do điện cực bị cong hay do hiệu ứng thành máy điện di ảnh hưởng đến sự di chuyển của các DNA. Những mẫu này nên thực hiện lại phản ứng RAPD-PCR hay chạy điện di lại, cho lượng mẫu nhiều hơn và chỉnh sửa máy điện di có thể cho kết quả tốt hơn.

4.3.3 Phân tích kết quả phản ứng RAPD-PCR bằng phần mềm NTSYS

Từ kết quả điện di chúng tôi mã hóa thành dạng nhị phân 0 và 1 (xem chi tiết ở bảng 4.3 phần phụ lục ii) để phân tích mối tương quan di truyền giữa các mẫu nghiên cứu bằng phần mềm NTSYS2.1.

4.3.4 Đánh giá đa dạng di truyền.

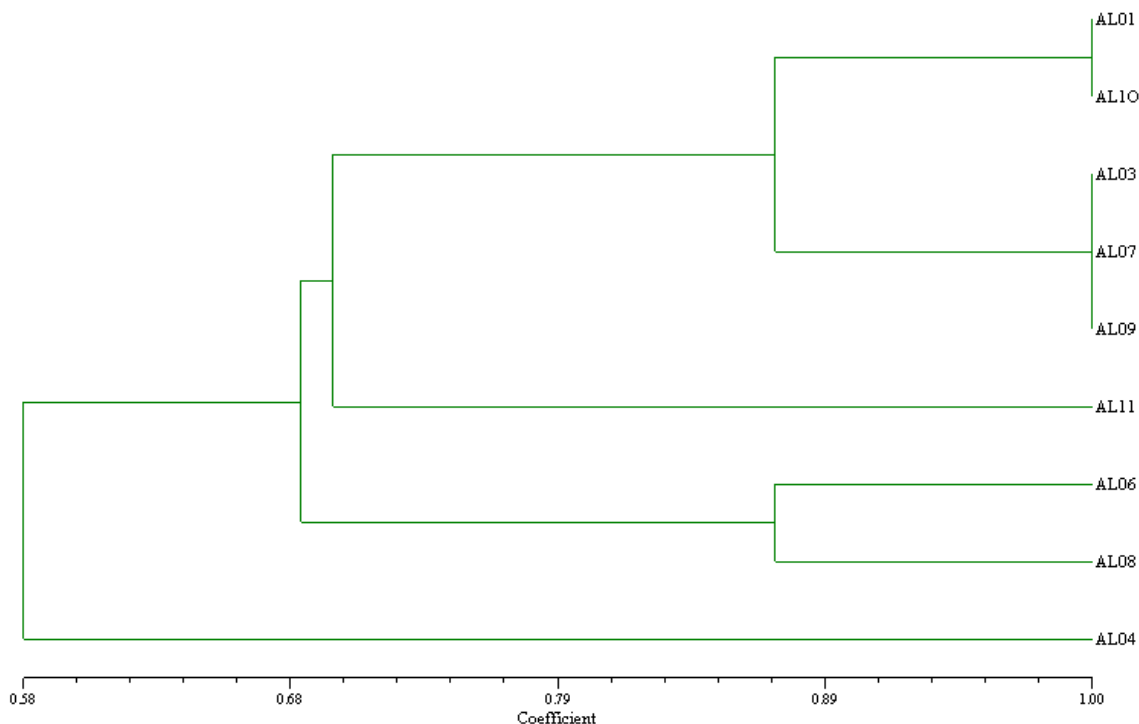
Đánh giá đa dạng di truyền thông qua cây di truyền dựa trên các yếu tố:

Hệ số tương đồng di truyền.

Mức độ phân nhánh của cây di truyền.

➤ Tại Bình Định nơi có diện tích trồng điều không được tập trung nên việc thu thập mẫu gặp nhiều khó khăn. Chính vì vậy tôi chỉ thu thập mẫu ở những huyện có diện tích đồi núi lớn. Vì từ năm 1995 tỉnh có chương trình trồng điều để phủ xanh đồi núi trọc với dự án xóa đói giảm nghèo của tỉnh, ở ba huyện Hoài Nhơn, Hoài Ân, An Lão là nơi có diện tích đồi núi nhiều. Vì vậy chúng tôi chủ yếu thu thập mẫu ở những huyện này. Khi đánh giá đa dạng di truyền của cây chúng tôi có kết quả sau:

➤ Đa dạng di truyền của huyện An Lão có 8 mẫu có kết quả RAPD-PCR, kết quả đánh giá đa dạng di truyền được hiển thị theo dạng bảng và dạng cây di truyền (hình 4.4 -4.5)



Hình 4.4 Cây di truyền một số cây điều tiêu biểu ở huyện An Lão

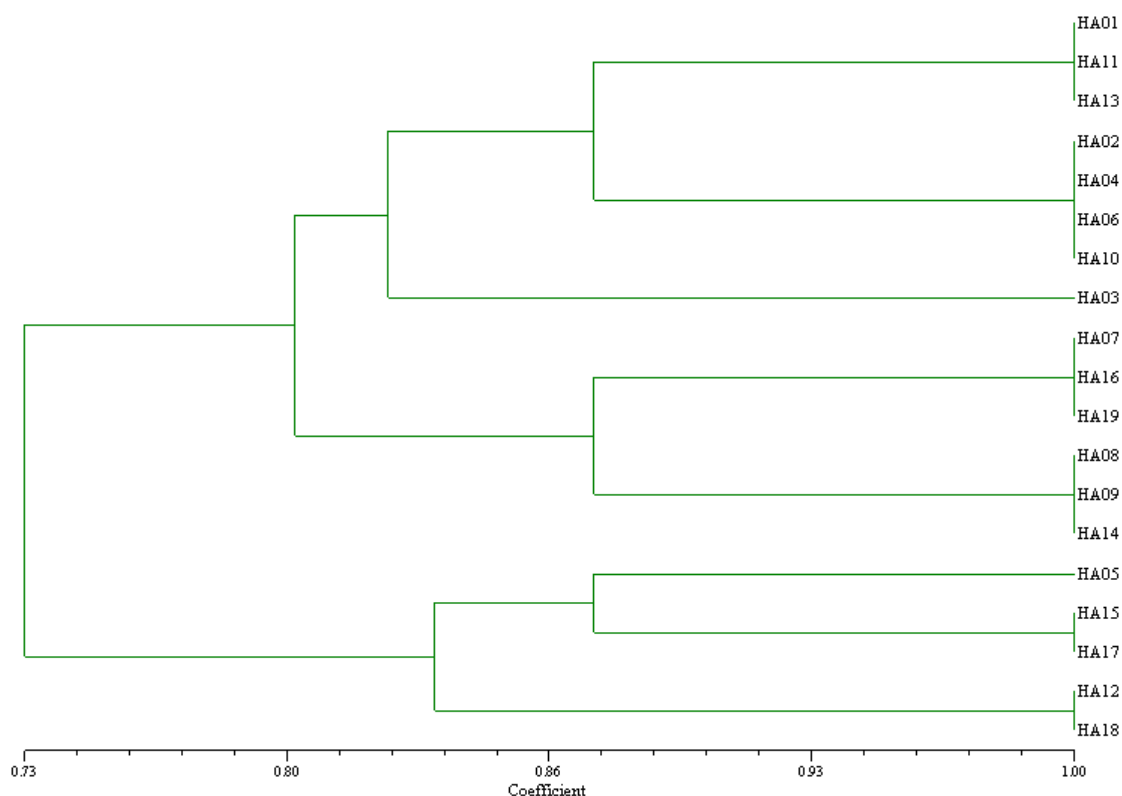
Rows\Cols	AL01	AL03	AL04	AL06	AL07	AL08	AL09	AL10	AL11
AL01	1.0000000								
AL03	0.8750000	1.0000000							
AL04	0.5000000	0.6250000	1.0000000						
AL06	0.7500000	0.6250000	0.5000000	1.0000000					
AL07	0.8750000	1.0000000	0.6250000	0.6250000	1.0000000				
AL08	0.6250000	0.7500000	0.6250000	0.8750000	0.7500000	1.0000000			
AL09	0.8750000	1.0000000	0.6250000	0.6250000	1.0000000	0.7500000	1.0000000		
AL10	1.0000000	0.8750000	0.5000000	0.7500000	0.8750000	0.6250000	0.8750000	1.0000000	
AL11	0.6250000	0.7500000	0.6250000	0.6250000	0.7500000	0.7500000	0.7500000	0.6250000	1.0000000

Hình 4.5 Kết quả đánh giá đa dạng di truyền dạng số liệu NTSYS đối với các mẫu điều tại huyện An Lão

➤ Kết quả phân tích của huyện An Lão ta thấy hệ số di truyền dao động từ 0,5-1,00. như vậy các mẫu phân tích có hệ số di truyền khá gần nhau. Qua bảng số liệu và cây di truyền ta thấy có một mẫu AL04 nằm riêng biệt một nhánh. Theo kết quả điều tra thì mẫu này có tính trạng về hình thái cây thấp, ít cánh, trái vàng chát,

hạt lớn nhưng bị lép hạt. Trên kết quả điện di tiêu biểu mẫu này không có vạch 850bp so với các mẫu khác. Có thể vạch 850 bp là vạch có gen quy định tính trạng hạt lớn tròn căng. Đây có thể là một chỉ thị làm tiền đề cho những nghiên cứu sau này cho công tác tuyển chọn giống.

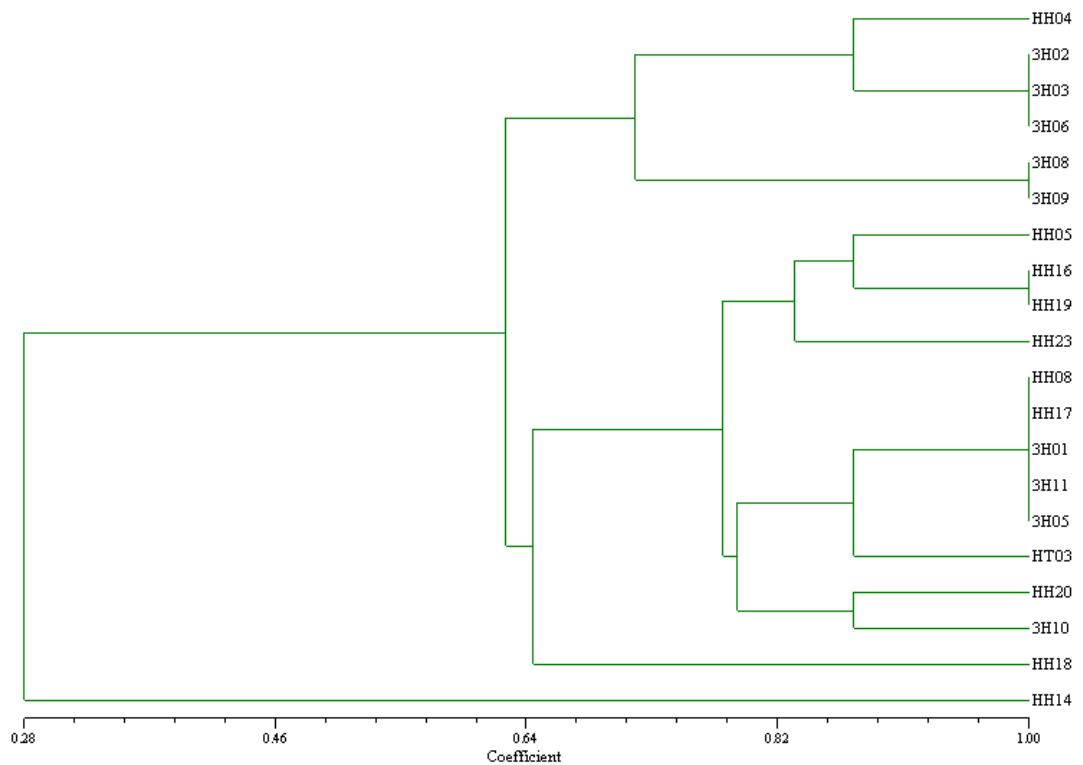
➤ Đa dạng di truyền của cây điều ở huyện Hoài Ân Có 19 mẫu có kết quả RAPD-PCR kết quả đánh giá đa dạng di truyền được hiển thị theo dạng bảng và dạng cây di truyền ở hình 4.6.



Hình 4.6 Cây di truyền một số cây điều tiêu biểu ở huyện Hoài Ân

➤ Kết quả phân tích của huyện Hoài Ân ta thấy hệ số di truyền dao động từ 0,73-1,00. Như vậy các mẫu phân tích có quan hệ di truyền khá gần nhau về mặt di truyền. Có thể những giống điều ở đây có sự tạp giao với nhau hoặc có thể là sự đồng bộ trong việc tuyển chọn giống của huyện. Qua bảng điều tra nông dân tôi cũng nhận thấy sự đồng bộ về những tính trạng như: cây thấp đến cao trung bình, hạt lớn tròn căng .v.v.

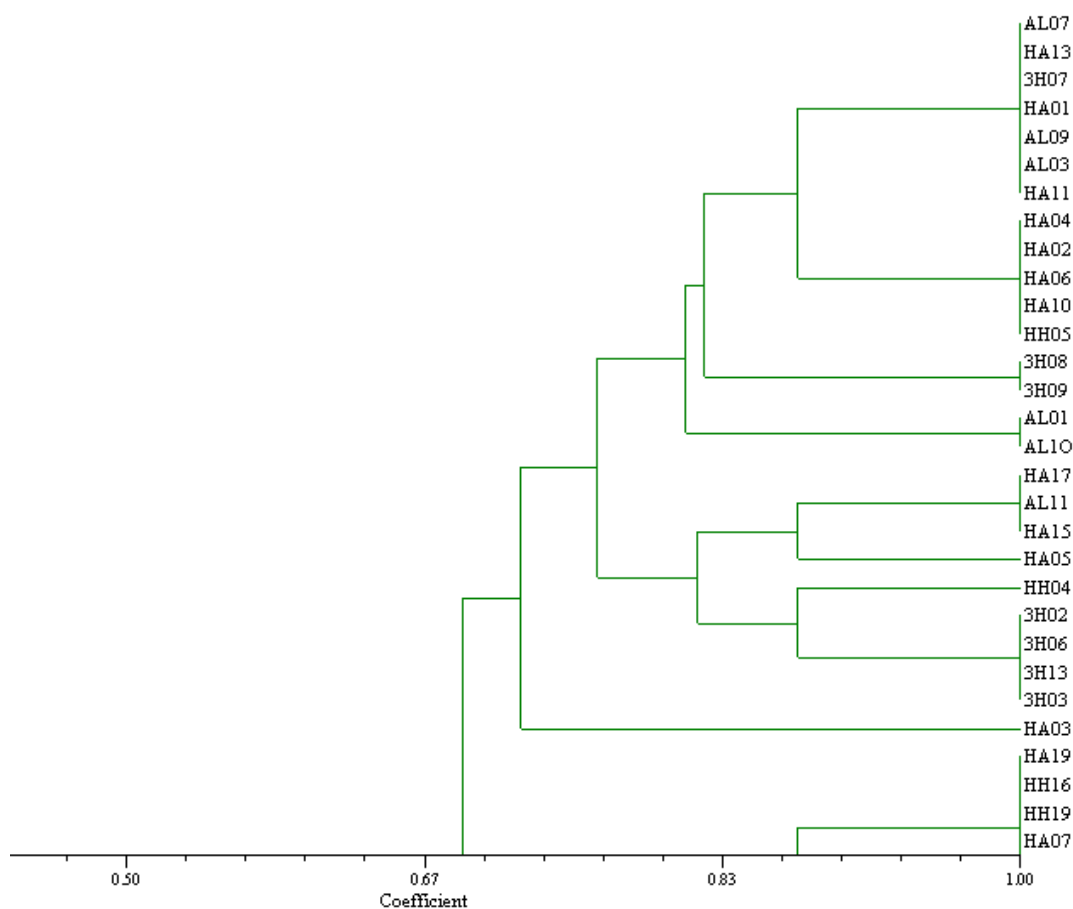
➤ Đa dạng di truyền của cây điều ở huyện Hoài Nhơn có 22 mẫu có kết quả RAPD-PCR, kết quả đánh giá đa dạng di truyền được hiển thị theo dạng bảng và dạng cây di truyền(hình 4.7).



Hình 4.7 Cây di truyền một số cây điều tiêu biểu ở huyện Hoài Nhơn

➤ Kết quả phân tích của huyện Hoài Nhơn ta thấy hệ số di truyền dao động từ 0,375- 1,00 như vậy các mẫu phân tích có quan hệ di truyền khá xa. Cây di truyền được chia thành 11 nhánh. Riêng mẫu HH14 tạo thành một nhánh riêng trong cây di truyền của huyện Hoài Nhơn. Trong phiếu điều tra tôi nhận thấy cây này có tính trạng cây cao tán rộng, trái vàng ngọt hạt rất lớn năng suất cao và khá ổn định. Trên hình điện di tôi thấy có xuất hiện vạch khoảng 650 bp, qua bảng so sánh tôi thấy vạch này chỉ có ở mẫu này không có ở mẫu khác đây có thể là một chỉ thị phân tử để làm tiền đề cho những nghiên cứu cho công tác tuyển chọn giống.

➤ Đa dạng di truyền của cây điều ở Bình Định có 50 mẫu có kết quả RAPD-PCR, kết quả đánh giá đa dạng di truyền được hiển thị theo dạng bảng và dạng cây di truyền (hình 4.8)



Hình 4.8 Cây di truyền một số cây điều tiêu biểu tại Bình Định

➤ Theo như cây di truyền, các cá thể điều tại Bình Định được chia thành 10 nhánh trung bình mỗi nhánh 5 mẫu, có mức độ tương đồng di truyền từ 37,5%-100%. Theo đánh giá của chúng tôi thông qua kỹ thuật RAPD-PCR, những cây điều trồng tại Bình Định có tính đa dạng di truyền ở mức từ trung bình đến trung bình khá. Chúng tôi nhận thấy các giống điều được trồng tại huyện Hoài Ân, An Lão có mức độ phân bố rộng nhất, đồng thời có mức độ tương đồng di truyền khá cao, thể hiện có nhiều mẫu có số vạch giống nhau và cùng phân bố cùng một nhánh trong cây di truyền. Các cây điều trồng tại huyện Hoài Nhơn có mức đa dạng di truyền khá cao, đồng thời có bản chất di truyền giống với các cây điều trồng tại Hoài Ân và An Lão. Điều này cũng thật dễ hiểu vì theo kết quả điều tra thì cây điều ở Hoài Nhơn có độ tuổi cao hơn. Có thể các giống điều ở Hoài Nhơn đem trồng ở các huyện khác.

4.3.5. Hạn chế của kết quả đánh giá đa dạng di truyền bằng kĩ thuật RAPD-PCR.

Từ quá trình thực hiện tôi rút ra một số kết luận.

Số lượng mẫu thu thập được chưa đủ để thực hiện thực tế, chưa mang tính đại diện cao.

Do những hạn chế của kĩ thuật điện di bằng agarose không cho độ phân tách cao, độ dài của các band có thể không bằng nhau nhưng không thể phân biệt bằng mắt thường nên có thể nhận định sai lệch band điện di.

4.3.6. Một vài điểm lưu ý khi thực hiện phản ứng RAPD-PCR.

➤ Không dùng giấy dán vào thành eppendorf để đánh dấu mẫu khi chạy RAPD-PCR.

➤ RAPD-PCR rất nhạy cảm với các thành phần hóa chất, chỉ cần có sự thay đổi về một yếu tố nào đó thì sản phẩm thu được sẽ khác nhau. Do đó cần kiểm tra lại toàn bộ quy trình khi có sự thay đổi một yếu tố nào đó.

➤ Khi thay đổi về nhiệt độ bắc cặp của primer thì thường biến thiên 2⁰C, thay đổi 1⁰C ít có sự khác biệt.

➤ Máy PCR khác nhau cho kết quả khác nhau.

❖ Khi gặp trở ngại về việc điện di thì nguyên nhân có thể do:

➤ Kỹ thuật đổ gel: agarose chưa tan đều hoặc do agarose quá nguội khi đổ.

➤ Điện trường của máy điện di: do điện thế không ổn định hoặc điện cực bị cong v.v.

➤ Dung dịch điện di: cần thay dung dịch điện di khác.

➤ Dung dịch nhuộm gel cũng ảnh hưởng, tốt nhất nên sử dụng dung dịch mới pha và chỉ dùng cho nhuộm gel RAPD-PCR.

CHƯƠNG V

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 Kết luận.

Từ các kết quả thu được, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Quy trình tách chiết DNA khá ổn định. Ly trích được 50 mẫu DNA đạt tiêu chuẩn dùng trong các kĩ thuật sinh học phân tử.

➤ Primer 11 dùng trong kĩ thuật RAPD-PCR cho 8 band đối với các mẫu thí nghiệm, trong đó có 5 band đồng hình, 3 band đa hình. Primer 11 có tính đa hình cao đối với các cá thể điều. Kết quả thu được 217 band trong tổng số 50 mẫu thu thập tại Bình Định.

➤ Việc phân tích RAPD-PCR sử dụng primer 11 các cá thể điều trồng tại Bình Định có hệ số di truyền trên cây phát sinh chủng loại dao động trong khoảng 0,375-1,00.

➤ Cây phát sinh nhiều nhánh chứng tỏ các cá thể điều trồng tại Bình Định có sự tạp giao giữa các giống điều.

5.2 Đề nghị.

5.2.1 Đề nghị phương pháp nghiên cứu.

➤ Khảo sát thêm các primer khác dùng trong kĩ thuật RAPD.

➤ Khảo sát thêm các marker phân tử như AFLP, SSR... để phân tích đa dạng di truyền một cách chính xác hơn.

➤ Cần xác định đa dạng di truyền của các cá thể trên diện rộng, số lượng mẫu lớn hơn.

➤ Các band có trọng lượng 850 bp và 650 là những band tạo nên sự khác biệt. Có thể sử dụng làm các chỉ thị phân tử cho những nghiên cứu sau này.

5.2.2 Về phương hướng phát triển canh tác điều ở Bình Định.

➤ Tránh tình trạng phát triển cây điều một cách tự phát như hiện nay.

➤ Tiến hành điều tra và nghiên cứu đa dạng di truyền những giống điều hiện có. Chọn lọc cá thể có những tính trạng tốt, tiến hành nghiên cứu sâu hơn về những cá thể này.

➤ Định hướng phát triển chiến lược lâu dài cụ thể cải thiện giống cũng như kỹ thuật canh tác

Tài liệu tham khảo

Tài liệu trong nước

1 Châu Văn Quang.2005. *Điều tra hiện tượng canh tác và bước đầu xác định tính đa dạng di truyền của một số giống điều đang trồng ở tỉnh Bình Phước nhờ kỹ thuật PCR* . LVTN kỹ sư nông học trường Đại Học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh.

2Phạm Văn Bình 2005. *Đánh giá sơ bộ đa dạng di truyền của quần thể điều(Anacardium occidentale L) hiện được trồng tại tỉnh Ninh Thuận bằng kỹ thuật RAPD và AFLP*. LVTN công nghệ sinh học trường Đại Học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh .

3Nguyễn Thị Huyền 2005 *Bước đầu xây dựng ngân hàng gen trên cây điều ở một số huyện của tỉnh đồng nai*. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư nông học Trường Đại Học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh.

4 Nguyễn Thị Thanh Bình, Hoàng Thi Hằng, Nông Văn Hải 2005 ..nghiên cứu đa hình một số giống tầm dâu bằng kỹ thuật rapd. *Tạp chí di truyền học và ứng dụng*.

5 Nguyễn Việt Chương. 2000 *Kinh nghiệm trồng điều theo phương pháp mới*. Nhà xuất bản Thanh Niên

6 Phạm Đình Thanh. 2003 *Hạt Điều: sản xuất và chế biến*. nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật Hà Nội (trang 9-12; 28-36).

7 Khuất Hữu Thanh. 2003 *Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Tp Hồ Chí Minh (trang 221).

8 Phạm Thành Hồ, 1998 *Di truyền học*. Nhà xuất bản giáo dục (trang 612)

9 Hồ Thị Thùy Dương, 2002 *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản giáo dục. Trang 24-30; 122-124).

10 Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang. 1999 *Di truyền phân tử: những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng*. Nhà xuất bản Nôi Nghiệp Tp Hồ Chí Minh (trang 275).

11 Nguyễn Đức Thành, 2004. *Một số kỹ thuật chỉ thị phân tử*. Nhà xuất bản viên khoa học và công nghệ Niềm Nam- Viện Công Nghệ Sinh Học Hà Nội.

12 Lê Duy Thành, 2001 *Cơ sở di truyền chọn giống thực vật*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật Hà Nội. (trang 159).

13 Nguyễn Văn Uyển 1996. Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật- tập II. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Tp Hồ Chí Minh (trang 56).

14 Nguyễn Thị Lang 2001. Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.

Tài liệu nước ngoài.

15 Kazutoshi Okuno and Shuichi Fukuoka, 1998. Manual for DNA extraction in plants. Janpan international cooperatoin agency.

16 Sunil Archak, Arbika B. Gaikwad, Diksha Gautam, E.V.V.B. Rao, K.R.M. Swamy and J.L.Karihaloo. 2003 DNA fingerprinting of indian cashew (*Anacardium occidentale* L) varieties using RAPD and ISSR techniques. Euphytica 230: p 397-404.

17 Samal. S, Rout G.R, Lenka P.C 2003. Analysis of genetic relationships between polulations of cashew (*Anacardium occidentale* L) by using morphological characterisation and RAPD markers. Plant soil environ 49: p176-182.

MỘT VÀI HÌNH ẢNH CÂY ĐIỀU.



