

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA GIỐNG LAN
RỪNG *DENDROBIUM* THU THẬP TẠI TỈNH
BÌNH PHƯỚC VÀ THỊ XÃ BẢO LỘC (TỈNH
LÂM ĐỒNG) BẰNG KỸ THUẬT RAPD**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2003 – 2007

Sinh viên thực hiện: LÊ TRẦN PHÚC KHOA

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2007

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA GIỐNG LAN
RỪNG *DENDROBIUM* THU THẬP TẠI TỈNH
BÌNH PHƯỚC VÀ THỊ XÃ BẢO LỘC (TỈNH
LÂM ĐỒNG) BẰNG KỸ THUẬT RAPD**

**Giáo viên hướng dẫn:
TS. TRẦN THỊ DUNG
TS. VÕ THÁI DÂN**

**Sinh viên thực hiện:
LÊ TRẦN PHÚC KHOA**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2007

LỜI CẢM TẠ

Thành kính ghi nhớ công ơn ba mẹ cùng những người thân trong gia đình đã luôn tạo điều kiện và động viên con trong suốt quá trình học tập.

Xin chân thành cảm tạ:

– Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập tại trường.

– Các Thầy, Cô trong Bộ môn công nghệ sinh học cùng các thầy cô đã trực tiếp giảng dạy tôi trong suốt bốn năm qua.

– TS. Trần Thị Dung, TS. Võ Thái Dân, CN. Lưu Phúc Lợi đã tận tình hướng dẫn và động viên tôi trong thời gian thực hiện đề tài tốt nghiệp.

– Kỹ sư Hồ Viết Thế và các anh chị thuộc Viện nghiên cứu công nghệ sinh học và công nghệ môi trường – Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã quan tâm giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài.

– Toàn thể các bạn lớp CNSH29 thân yêu đã hỗ trợ, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt bốn năm qua.

Tháng 9 năm 2007

LÊ TRẦN PHÚC KHOA

TÓM TẮT

LÊ TRẦN PHÚC KHOA, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Tháng 9/2007.
“Đánh giá đa dạng di truyền của giống lan rừng *Dendrobium* thu thập tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc (tỉnh Lâm Đồng) bằng kỹ thuật RAPD”

Đề tài được tiến hành tại Viện nghiên cứu công nghệ sinh học và công nghệ môi trường – Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, thời gian từ tháng 3 đến tháng 8 năm 2007 nhằm giá đa dạng di truyền của giống lan rừng *Dendrobium* bằng kỹ thuật RAPD, làm tiền đề phục vụ cho công tác chọn, tạo giống lan. Đề tài bao gồm các nội dung: ly trích DNA tổng số từ lá lan; tối ưu hóa các thành phần phản ứng PCR với marker RAPD; thực hiện phản ứng PCR với các điều kiện đã được tối ưu và cuối cùng xây dựng cây phân nhóm di truyền bằng các phần mềm NTSYSpc 2.1 và Winboot. Kết quả cho thấy, có 6 trên 10 primer RAPD (OPAC10, OPB01, S1384, OPB08, U693, OPAH13) tạo ra sản phẩm khuếch đại với 20 mẫu lan nghiên cứu. Tổng cộng có 57 băng được tạo ra, trong đó có 55 băng đa hình chiếm tỉ lệ 96,5% và 2 băng đồng hình chiếm tỉ lệ 3,5%; Trung bình có 9,1 băng đa hình/primer. Sản phẩm khuếch đại có kích thước từ 180 – 3000 bp. Phân tích dữ liệu RAPD cho thấy nếu xét mức độ tương đồng di truyền của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* ở 0,55 thì sẽ chia thành ba nhóm với mức độ tương đồng di truyền biến thiên trong khoảng từ 0,55 – 0,66. Ba nhóm này bao gồm hai nhóm chính (nhóm 1 và 2) và một nhóm phụ (nhóm 3). Ngoài ra, các loài lan Vẩy Rồng (Bảo Lộc), Vẩy Rồng (Bình Phước), Thái Bình (Bình Phước) và Long Nhân (Bình Phước) không phân nhóm mà chúng nằm rải rác trên cây phát sinh loài. Điều này cho thấy các loài lan rừng giống *Dendrobium* khảo sát có sự đa dạng cao về di truyền.

SUMMARY

LE TRAN PHUC KHOA, Nong Lam University, Ho Chi Minh City. September, 2007. “Revealing genetic diversity of wild *Dendrobium* orchid at Binh Phuoc province and Bao Loc town (Lam Dong province) by RAPD technique”

Genetic diversity of wild *Dendrobium* orchid collected from Binh Phuoc province and Bao Loc town was studied based on RAPD marker to set up the scientific premise for orchid breeding. The phylogenetic dendrogram of 20 tested wild *Dendrobium* was produced based on RAPD polymorphic bands by using NTSYSpc 2.1 and Winboot softwares. Cluster analysis based on Dice similarity coefficient matrix were produced using the unweighted pair – group method with arithmetic average (UPGMA) to group all the studied species. Six from ten RAPD primers (OPAC10, OPB01, S1384, OPB08, U693, OPAH13) produced a total of 55 polymorphic bands, sized from 180 bp to 3000 bp. The resulting dendrogram confirmed that species could be distinguished and clustered into two main groups and one auxiliary group. This result indicated that there was a significant genetic variation among the studied species.

MỤC LỤC

CHƯƠNG.....	TRANG
Trang tựa	i
Lời cảm tạ.....	iii
Tóm tắt	iv
Summary	v
Mục lục.....	vi
Danh sách các bảng.....	ix
Danh sách các hình.....	x
Danh sách các chữ viết tắt.....	xi
CHƯƠNG 1. MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề	1
1.2. Mục đích – yêu cầu đề tài	2
1.2.1. Mục đích.....	2
1.2.2. Yêu cầu.....	2
1.3. Giới hạn đề tài	2
CHƯƠNG 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1. Giới thiệu về cây hoa lan.....	3
2.1.1. Nguồn gốc và phân bố các loài phong lan.	3
2.1.2. Các đặc tính chủ yếu của loài lan ký sinh	4
2.1.3. Giới thiệu chung về giống lan <i>Dendrobium</i>	7
2.1.3.1. Đặc điểm hình thái	8
2.1.3.2. Điều kiện sinh thái	9
2.1.4. Tình hình sản xuất hoa lan trên thế giới và ở Việt Nam	9
2.1.4.1. Tình hình sản xuất hoa lan trên thế giới.....	9
2.1.4.2. Tình hình sản xuất hoa lan ở Việt Nam	10
2.2. Giới thiệu về đa dạng sinh học.....	12
2.2.1. Định nghĩa.....	12

2.2.2. Các phân mức về đa dạng sinh học.....	12
2.2.2.1. Sự đa dạng về hình thái.....	12
2.2.2.2. Đa dạng loài.....	12
2.2.2.3. Sự đa dạng về di truyền.....	13
2.3. Một số phương pháp nghiên cứu đa dạng di truyền.....	14
2.3.1. Phương pháp sử dụng các marker hình thái.....	14
2.3.2. Phương pháp sử dụng các marker isozyme.....	14
2.3.3. Phương pháp sử dụng các marker phân tử.....	15
2.4. Quy trình ly trích DNA tế bào thực vật.....	15
2.5. Kỹ thuật PCR.....	17
2.5.1. Khái niệm và nguyên tắc của kỹ thuật PCR.....	17
2.5.2. Thành phần phản ứng PCR.....	19
2.5.3. Ưu, nhược điểm của kỹ thuật PCR.....	20
2.6. Một số marker phân tử thường dùng trong nghiên cứu đa dạng di truyền.....	21
2.6.1. Marker RFLP.....	22
2.6.2. Marker AFLP.....	22
2.6.3. Marker RAPD.....	23
2.6.4. Marker SSR.....	25
2.7. Cây phát sinh loài.....	26
2.7.1. Một số thuật ngữ.....	26
2.7.2. Những cách vẽ cây phát sinh loài.....	26
2.7.3. Các phương pháp chủ yếu tạo cây phát sinh loài.....	27
2.8. Các công trình nghiên cứu khoa học có liên quan.....	27
2.8.1. Tình hình nghiên cứu khoa học trên cây lan ngoài nước.....	27
2.8.2. Tình hình nghiên cứu khoa học trên cây lan trong nước.....	28
CHƯƠNG 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH.....	30
3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện.....	30
3.2. Vật liệu.....	30
3.2.1. Các loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i>	30

3.2.2. Hóa chất thí nghiệm	34
3.2.3. Trang thiết bị thí nghiệm.....	35
3.3. Phương pháp.....	36
3.3.1. Quy trình ly trích DNA tổng số	36
3.3.2. Kiểm tra định tính và định lượng DNA	37
3.3.2.1. Định tính DNA bằng phương pháp điện di.....	37
3.3.2.2. Định lượng DNA bằng phương pháp đo OD.....	38
3.3.3. Tối ưu hóa các thành phần phản ứng PCR với marker RAPD	38
3.3.4. Thực hiện phản ứng PCR với marker RAPD.....	42
3.3.5. Phương pháp đánh giá mối quan hệ di truyền bằng phần mềm NTSYS ..	43
3.3.6. Phân tích Bootstrap bằng phần mềm Winboot.....	44
CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	45
4.1. Sản phẩm ly trích DNA tổng số	45
4.2. Hoàn thiện quy trình PCR với marker RAPD.....	48
4.3. Đánh giá đa dạng di truyền của 10 loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i> thu thập tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc tỉnh Lâm Đồng	52
4.3.1. Sản phẩm PCR với marker RAPD	52
4.3.2. Phân tích nhóm của 10 loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i> dựa trên dữ liệu RAPD.....	58
CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	65
5.1. Kết luận	65
5.2. Đề nghị	65
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	67
PHỤ LỤC	

DANH SÁCH CÁC BẢNG

BẢNG	TRANG
Bảng 3.1 Danh sách các loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i> nghiên cứu	30
Bảng 3.2 Danh sách các primer dùng trong nghiên cứu	35
Bảng 3.3 Chương trình nhiệt cho phản ứng PCR	38
Bảng 3.4 Thành phần hóa chất cho phản ứng PCR	39
Bảng 3.5 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của số chu kỳ đến sản phẩm RAPD....	39
Bảng 3.6 Thành phần phản ứng PCR dùng trong thí nghiệm 1	40
Bảng 3.7 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ primer đến sản phẩm RAPD	40
Bảng 3.8 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Mg^{2+} đến sản phẩm RAPD	41
Bảng 3.9 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ <i>Taq</i> đến sản phẩm RAPD	41
Bảng 3.10 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ DNA mẫu đến sản phẩm RAPD	42
Bảng 3.11 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dNTPs đến sản phẩm RAPD	42
Bảng 4.1 OD của 20 mẫu dùng để thực hiện phản ứng PCR với marker RAPD ..	47
Bảng 4.2 Nồng độ tối ưu các thành phần của phản ứng PCR.....	52
Bảng 4.3 Chương trình nhiệt tối ưu cho phản ứng PCR	52
Bảng 4.4 Danh sách các primer được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền của 10 loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i>	53
Bảng 4.5 Hệ số tương đồng di truyền của các loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i> khảo sát	58

DANH SÁCH CÁC HÌNH

HÌNH	TRANG
Hình 2.1 Nguyên tắc cơ bản của phản ứng PCR.....	18
Hình 2.2 Nguyên tắc của kỹ thuật RAPD	24
Hình 3.1 Các loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i> nghiên cứu.....	33
Hình 4.1 DNA tổng số của 10 loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i> ở Bảo Lộc	46
Hình 4.2 DNA tổng số của 10 loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i> ở Bình Phước....	46
Hình 4.3 Khảo sát ảnh hưởng của số chu kỳ.....	49
Hình 4.4 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ primer	49
Hình 4.5 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Mg^{2+}	50
Hình 4.6 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ <i>Taq</i>	50
Hình 4.7 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ DNA mẫu	51
Hình 4.8 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dNTPs.....	51
Hình 4.9 Sản phẩm PCR với primer OPAC10 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc (hình a) và Bình Phước (hình b)	55
Hình 4.10 Sản phẩm PCR với primer OPB01 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc (hình a) và Bình Phước (hình b).....	56
Hình 4.11 Sản phẩm PCR với primer S1384 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc (hình a) và Bình Phước (hình b).....	57
Hình 4.12 Cây phân nhóm di truyền giữa 10 loài lan rừng giống <i>Dendrobium</i> thu thập tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc.....	60
Hình 4.13 Đồ thị phân bố nhóm dựa trên dữ liệu RAPD.....	61

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

Bp: base pairs

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DAF: DNA amplification fingerprinting

dNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate

EB: extraction buffer

EDTA: Ethylene Diamine Tetra acetic Acid

GH: Giả Hạc

KĐ: Kim Diệp

LN: Long Nhân

LT: Long Tu

NĐH: Nhất Điểm Hoàng

NTSYS: Numerical Taxonomy System

OD: Optical density

OTU: Operational Taxonomic Units

PCI: Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

PCR: Polymerase Chain Reaction

PVP: Polyvidon

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SDS : Sodium Dodecyl Sulfat

SSCP: Single – Strand Conformation Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeat

T_a: Annealing temperature

TAE: Tris – Acetate – EDTA

TB: Thái Bình

TE: Tris – EDTA

T_m : Melting temperature

TT: Thủy Tiên

TTV: Thủy Tiên Trắng Vàng

TV: Thủy Tiên Vàng

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic

VR: Vây Rông

WWF: World Wildlife Fund (quỹ quốc tế về bảo tồn thiên nhiên)

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Hoa lan là một món quà của tạo hóa, nó không chỉ là một loài hoa đẹp có giá trị về mặt tinh thần mà còn có giá trị kinh tế cao và hiện đang có thị trường tiêu thụ mạnh trong nước cũng như xuất khẩu. Ngày nay, chúng ta có thể thấy hoa lan ở khắp mọi nơi và dễ bị choáng ngợp trước vẻ đẹp quyến rũ, biến hóa muôn màu, muôn vẻ của các loài hoa như: *Cattleya*, Hồ Điệp, *Dendrobium*, *Vanda*, *Cymbidium*. Hoa lan được ưa chuộng phải chăng bởi đó là biểu tượng của niềm khao khát cuộc sống phong lưu và hạnh phúc bên bờ.

Ở vùng nhiệt đới, đặc biệt là tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc (tỉnh Lâm Đồng) phù hợp với nhiều loại phong lan, địa lan. Ngoài việc nhập nội, lai tạo, nhân giống các loại lan mới, chúng ta còn sở hữu nhiều nguồn gen quý hiếm, độc đáo, mới lạ. Hơn nữa, các giống lan thương mại hiện nay tại Việt Nam đều là những giống lan lai (có nguồn gốc từ Thái Lan, Đài Loan, Singapore và Trung Quốc) làm cho tình hình giống ngày càng trở nên phức tạp. Vì vậy, trước hết chúng ta cần phải tiến hành khảo sát tính đa dạng di truyền các giống lan địa phương, trên cơ sở đó thực hiện có hiệu quả việc nhân và tạo giống mới cho chất lượng tốt, đồng thời xây dựng các định hướng về kiểm tra, quản lý và bảo vệ nguồn gen các giống lan sẵn có trong nước.

Để nghiên cứu đa dạng di truyền người ta có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau: phương pháp sử dụng các marker hình thái, marker isozyme hay marker phân tử (RFLP, RAPD, AFLP, SSR, SSCP). Tùy vào đối tượng, điều kiện và mục đích nghiên cứu mà lựa chọn phương pháp phù hợp nhất. Trong đề tài này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tính đa dạng về di truyền của một số loài lan rừng giống *Dendrobium* bằng kỹ thuật RAPD vì đây là kỹ thuật đơn giản, cho kết quả nhanh, và đặc biệt không cần phải biết trước trình tự bộ gen của đối tượng nghiên cứu.

Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài:

"Đánh giá đa dạng di truyền của giống lan rừng *Dendrobium* thu thập tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc (tỉnh Lâm Đồng) bằng kỹ thuật RAPD"

1.2. Mục đích - yêu cầu đề tài

1.2.1. Mục đích

Thông qua kỹ thuật RAPD, đánh giá độ đa dạng di truyền của một số loài lan rừng giống *Dendrobium* thu thập tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc (tỉnh Lâm Đồng) làm tiền đề phục vụ cho công tác chọn, tạo giống lan.

1.2.2. Yêu cầu

- Thành thạo thao tác ly trích DNA tổng số.
- Nắm vững kỹ thuật PCR, hạn chế sai sót trong quá trình thực hiện.
- Nắm vững các kỹ thuật trong sử dụng marker RAPD.
- Hiểu rõ về các phần mềm xây dựng cây phát sinh loài như NTSYSpc 2.1, Winboot.

1.3. Giới hạn đề tài

- Khóa luận được thực hiện từ tháng 3 – 2007 đến tháng 8 – 2007 là khoảng thời gian tương đối ngắn nên kết quả chưa phản ánh đầy đủ và chính xác.
- Chưa đủ điều kiện để thực hiện trên nhiều primer RAPD để thu được kết quả chính xác hơn.
- Việc lấy mẫu cá thể cũng là vấn đề trở ngại, ảnh hưởng đến kết quả phân tích.

Chương 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Giới thiệu về cây hoa lan

2.1.1. Nguồn gốc và phân bố các loài phong lan [15]

Trên khắp trái đất, hầu như nơi nào có thực vật là có phong lan. Nhưng số lượng nhiều ít khác nhau rất lớn liên quan mật thiết đến độ cao. Ở Columbia có trên 3000 loài, khoảng 100 loài ở Mỹ và Alaska chỉ có 14 đến 15 loài. Mỗi loài có một cách phân bố và phát triển rất riêng biệt cho kiểu dáng và kích cỡ của cây lan, sự khác biệt đó không chỉ vì chúng xuất xứ từ các lục địa khác nhau mà còn có khi ở ngay trong một vùng địa lý vài kilomet vuông.

Trong quá trình tiến hóa, mỗi loài lan như đã có một hợp đồng “riêng với mỗi loại côn trùng nào đó để đảm bảo việc thụ phấn và phát triển”. Phải chăng “vì hợp đồng” này mà hoa lan đó thể hiện mọi đặc trưng riêng biệt thật kỳ lạ, không chỉ hấp dẫn bởi mắt nhìn (thị giác), mùi vị (khứu giác), chất mật ngọt mà còn hấp dẫn cả giới tính.

Về đại thể, có hai loài lan: địa lan và phong lan hoặc lan ký sinh (epiphytes). Chúng có các đặc tính về thực vật học khác nhau rõ rệt. Loài lan ở các vùng ôn đới có khuynh hướng chui xuống đất trong mùa rét và hình thành một cơ cấu khá lớn phân nhánh nhiều hay ít như một loại củ hoặc thân cây nằm dưới đất. Phần trên không của cây phát triển về mùa xuân để rồi biến mất về mùa thu. Loài lan này, cho đến ngày nay vẫn thuộc loài lan khó trồng. Có thể là không dễ xác định thật đúng yêu cầu của các loài địa lan này, từ chất đất đến chế độ ẩm và chế độ nhiệt. Một phần thực tế là trong nuôi trồng nhân tạo đã có nhiều ứng dụng kỹ thuật nhưng cũng rất khó tạo ra được các điều kiện cần thiết như trong tự nhiên. Điều đáng chú ý là loài lan này đang có khuynh hướng mất dần. Cho nên ở nhiều nơi người ta đã có qui định các biện pháp ngăn ngừa việc khai thác này.

Việc nuôi trồng lan đặc biệt phát triển ở các loài lan nhiệt đới, ít chịu ảnh hưởng của môi trường như loài các lan ôn đới, ngay cả một số loài địa lan. Nói cách

khác lan nhiệt đới thì loài ký sinh hay là loài địa lan cũng cho nhà nuôi trồng nhiều cơ hội tốt, nuôi trồng dễ dàng. Chính vì vậy, nên lan nhiệt đới vô cùng phong phú và cũng có nhiều đặc tính thực vật học hết sức ưu việt.

Trong khoảng trên 600 loài lan nhiệt đới, các nhà nuôi trồng đã chọn lọc được hơn 50 loài nhưng chỉ một số không nhiều thu hút được sự chú ý và hấp dẫn đầu tư phát triển chủ yếu dựa trên giá trị thương mại và khả năng lai giống tốt. Phải kể đến: *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Lycaste*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Paphiopedium*, *Phalaenopsis*, và các loài *Vanda*. Vài loài lân cận đã được lai ghép với các loài kể trên cho các giống lai rất quen thuộc mà ngày nay người ta đã có khá nhiều thông tin về đặc tính di truyền đến kỹ thuật nuôi trồng cụ thể.

Bên cạnh những loài rất được ưa chuộng trên đây, còn hàng trăm loài khác thường thấy ở nơi này hay nơi khác trong các vườn thực vật. Chúng cũng có những đặc tính riêng và giá trị nhưng không được phát triển rộng rãi vì có những hạn chế nhất định. Hoặc là hoa quá nhỏ hay không đẹp, điều kiện nuôi trồng không thuận tiện.

2.1.2. Các đặc tính chủ yếu của loài lan ký sinh [7], [15]

Việc hiểu biết về các đặc tính của cây lan là cần thiết giúp cho nhà nuôi trồng đạt kết quả cao với chi phí vật chất và công sức ít nhất. Yêu cầu thì nhiều nhưng phần chủ yếu là sinh lý học của việc nuôi trồng phong lan. Chúng ta xem xét từng thành phần cụ thể sau đây:

– Rễ nổi

Ngoài chức năng neo bám và nuôi dưỡng cho cây, rễ của loài lan ký sinh còn có vai trò dự trữ, hô hấp và cả nhiệm vụ quang hợp.

Với loài lan có thân nằm ngang rễ tạo ra thân, loài thân mọc đứng rễ phát ra từ thân cây và thường là đâm thẳng góc với thân cây vào các kẽ lá. Trong tự nhiên, rễ có thể đạt đến mức chiếm một tỷ trọng khá lớn, tới 2/3 khối lượng toàn phần.

Như vậy ta thấy rễ lan quả là một bộ phận phát triển đảm nhận một chức năng rất quan trọng trong đời sống của cây lan. Thật thế, rễ càng phát triển còn có

nhều khả năng gạn lọc hấp thu các muối khoáng, các chất dinh dưỡng khác tan trong nước hay sương mai.

Trên bề mặt của rễ lan, có một kết cấu đáng chú ý: chất nhung tơ. Chúng thường có màu trắng có lúc như phớt (ní) có lúc óng ánh như xà cừ, một chất liệu hết sức đặc biệt, có tác dụng hút nước được nhiều nhất và nhanh nhất. Chúng cho phép bộ rễ có thể thay đổi thời gian thấm nước. Mỗi khi bị khô chúng trở lại trạng thái trắng xà cừ. Và đối với rễ đây là màng che chống nóng hết sức hiệu quả. Khi tiếp xúc vỏ cây chúng tự hình thành một lớp các chất kết dính để cố định cho cây lan thật vững chắc trên giá thể hay giá đỡ của chúng.

Rễ có khi làm nhiệm vụ hô hấp còn hơn cả lá. Nhưng để chức năng hô hấp này phát huy hiệu quả, cần đảm bảo cho được một điều kiện cần thiết: các lớp nhung tơ phủ khô hoặc ít nhất phủ khô một phần giữa hai lần tưới nước.

Chức năng quang hợp (hay quang tổng hợp) có thể thấy một phần khi trên rễ chuyển thành màu xanh lá cây.

Trạng thái của bộ rễ cũng thể hiện trạng thái cây lan có phát triển tốt hay không, nói cách khác nhìn bộ rễ có thể biết cây có khỏe hay không. Nếu không còn vẻ trắng xà cừ, có nghĩa là ít nhiều cây đã già yếu. Nếu điều đó xảy ra quá sớm (cây chưa già) thì ắt đã có những sự chịu đựng quá đáng, có thể do:

- Tưới quá nhiều.
- Bón phân không thích hợp.
- Sự phân hủy của giá thể.

– Lá

Lan chỉ có một lượng lá rất hạn chế. Tuy vậy, lá lan cũng thật đa dạng khác nhau giữa giống này giống khác hoặc ngay trong cùng một loài (như *Dendrobium*). Lá lan có hình bầu dục hay lưỡi táo, phẳng hoặc gấp nếp, cuộn tròn hay có cuống, nhẵn hay có lông tơ, mau héo tàn hay vĩnh cửu, mỏng hay mập, chồng lên nhau hay hình que, hình mái dầm, uốn cong hoặc thẳng đứng. Trong phần lớn các loài lan trên lá thường có những đường gân song song, đặc tính này cho biết chúng thuộc dòng họ *Monocotyledones*.

Khi chịu ảnh hưởng bởi sự khô hay của sức nóng, cây lan đã thích nghi với những bộ lá có lớp vỏ thật dày hoặc lá thật mỏng, chúng trở thành một kho dự trữ cho cây. Để hạn chế tối đa sự mất nước trong ngày, ở thân trên của cây lan thường không có các khí khổng (mà chỉ có ở phần dưới). Vào những lúc nắng nóng gay gắt, các khí khổng này chỉ được nở ra vào ban đêm. Ngay việc quang hợp cũng được thực hiện một cách rất đặc biệt theo một tiến trình khá phức tạp nhưng rất hợp lý và hiệu quả không để mất nước (quang hợp ban ngày và hô hấp vào ban đêm).

Trong một vài loài như *Catasetum*, một số *Dendrobium*, *Calanthe*, lá chỉ có ở các mầm non và thuộc loài chống tàn, chúng tàn úa và rụng đi vào mùa thu để thân cây phình ra như một loại củ, hoàn toàn không có lá. Đây cũng là một cách dự trữ năng lượng cho mầm non sau này. Sau vài năm, khi đã hoàn tất nhiệm vụ, cơ cấu này cũng héo tàn và biến mất.

Cấu trúc và trạng thái của lá cây có thể thể hiện cho biết các điều sau đây:

- Lá càng dày, càng hạn chế tưới.
- Nếu lá cây chống héo tàn, thể hiện loài cây có giai đoạn ngủ (nghi đông) rõ rệt và kéo dài.
- Nếu lá mềm và tồn tại lâu (vĩnh cửu) phải thường xuyên giữ độ ẩm nhất định, tưới đều không gián đoạn.
- Nếu lá hình que, thể hiện loài cây chịu nóng tốt có thể chịu ánh nắng mặt trời trực tiếp

Với phong lan và cả địa lan cũng vậy vẻ đẹp của lá cây cũng góp phần thẩm mỹ giá trị. Đặc biệt, với các loài lan có lá thật đồ sộ, có lớp vỏ nhưng mướt có màu hồng đỏ chạy theo các phân nhánh màu vàng, vàng kim hay trắng.

– Thân cây và giả hành

Thân là bộ phận xác định hướng phát triển chính của cây. Ở loài lan ký sinh có hai loại thân: thân nằm ngang, bò trên mặt giá thể và loài thẳng đứng.

Loài thân nằm ngang có thân mà trên đó có nhiều chồi non. Chồi sẽ thành giả hành mang theo một hay nhiều lá và một phát hoa đâm ra ở đầu giả hành như

Cattleya, hoặc từ gốc ngay trên thân như *Coelogyne*, hay trực tiếp từ các giả hành vào năm sau như một vài loài *Dendrobium*.

Các giả hành có thể phát triển gần như kế tiếp chồng lên nhau như ở loài *Coelogyne* hoặc cách quãng trên thân nằm ngang như *Bulbophyllum* và điều này cũng phát sinh một vài vấn đề khi thay chậu.

Loài thân thứ hai có thân mọc thẳng lên và mầm ở trên cùng như *Vanda Angraecum*. Cách phát triển này về kỹ thuật được coi như vô tận, có dạng như cây leo. Chiều cao kỷ lục thuộc về loài *Gastrodia*, được 18 m.

Trong một số trường hợp thân cây như biến mất hoặc teo tóp thoái hóa. Các loại lan này thường được gọi là loài không có thân (*acaules*).

Các đặc tính nói trên của thân cây cần được xác định vì nó ảnh hưởng rất nhiều đến việc phát triển sau này. Người nuôi trồng cần biết loại thân cây thẳng đứng có thể vươn lên đến một độ cao nào đó trong khi loài thân nằm ngang có khuynh hướng bò lan ra ngoài chậu.

Về phần các giả hành, có thể coi chúng như những nhánh có sự phát triển giới hạn, chúng có những hình dạng rất khác nhau. Có loại hình trụ, hình bầu dục, hình trứng, có hình hột hoặc ép phẳng ở chung quanh. Cũng có khi, như ở loài *Dendrobium*, là những cơ quan dự trữ có nhiệm vụ tích trữ nước và các muối khoáng đủ một lượng cần thiết cho cây.

2.1.3. Giới thiệu chung về giống lan *Dendrobium* [12], [13], [15]

Phong lan có vùng phân bố rộng lớn, trải dài từ đường xích đạo cho đến Bắc cực, từ đồng bằng cho đến các vùng núi băng tuyết. Họ phong lan (*Orchidaceae*) với 750 chi và hơn 25000 loài là họ lớn thứ hai sau họ cúc (*Asteraceae*) trong ngành hạt kín (*Angiospermae*) và cũng là họ lớn nhất trong lớp một lá mầm.

Việc phân loại phong lan khá phức tạp. Theo truyền thống cổ điển các nhà khoa học trước đây phân loại *Dendrobium* thuộc tông *Epidendreae*, họ phụ *Epidendroideae*, phân họ *Orchidaceae*.

Theo Phạm Hoàng Hộ (1999) phân loại giống lan *Dendrobium* gồm hai nhóm:

- Nhóm *Callista* gồm có:
 - *D. chrysotosum* (Kim điệp)
 - *D. densiflorum* Wall (Thủy Tiên)
 - *D. farmari* Paxt (Thủy tiên trắng vàng)
 - *D. lindleyi* Steudel (Vảy rồng)
 - *D. thrysiflorum* Reichb (Thủy tiên vàng)
- Nhóm *Dendrobium* gồm có:
 - *D. anosmum* Lindl (Giả hạc)
 - *D. fimbriatum* Hook.f. (Long nhãn)
 - *D. heterocarpumi* Lindl (Nhất điểm hoàng)
 - *D. primulinum* Lindl (Long tu)
 - *D. moschatum* (Buch-Ham) (Thái bình)

Đây là hai nhóm lan thuộc giống *Dendrobium* chúng tôi sử dụng để nghiên cứu trong đề tài.

2.1.3.1. Đặc điểm hình thái [15]

– **Rễ:** thuộc loại rễ bì sinh, chung quanh rễ thật được bao bọc bởi một lớp mô xốp (màng) giúp cây dễ dàng hút nước, muối khoáng và ngăn chặn ánh sáng mặt trời gay gắt. Chóp rễ có màu xanh lá cây, ở phần rễ có các sắc lạp không bị ngăn bởi mô xốp nên có thể giúp cây quang hợp.

– **Thân:** lan *Dendrobium* thuộc loài đa thân có giả hành rất dài, hình trụ, hình múi hay hình dẹt, có nhiều đốt thân. Thân có dạng mọc thẳng hoặc rũ xuống.

– **Lá:** xếp thành hai dãy đối nhau trên thân (lá đối), lá có hình xoang và các gân lá chính chạy song song các khe lõm xuống, lá lan có thể sống dai hay dễ rụng.

– **Các cụm hoa:** mọc từ thân thành từng chùm, trên một cành hoa có những chiếc hoa đơn xếp theo hình xoắn ốc, các hoa đơn liền cành nhờ cuống. Cuống kéo dài cho tới bầu hoa tạo ra ba lá noãn (bầu hoa được tạo thành bởi 3 lá đài, 3 cánh hoa và 1 trụ hoa). Cột nhị, nhụy ngắn.

2.1.3.2. Điều kiện sinh thái [15]

– Nhiệt độ

Cây lan *Dendrobium* có biên độ nhiệt độ rất rộng, người ta chia làm 2 hai nhóm chính:

- Nhóm lan ưa lạnh: nhiệt độ lý tưởng là 15⁰C sống chủ yếu ở vùng cao nguyên trên 1000m. Tuy nhiên, những loài lan này có thể ra hoa ở nhiệt độ cao.
- Nhóm lan ưa nóng: nhiệt độ thích hợp nhất là 25⁰C. Ngoài ra còn có giống lan thích hợp ở nhiệt độ 20⁰C, có thể ra hoa ở vùng nóng và vùng lạnh.

– Độ ẩm và chế độ tưới nước

Trong thời kỳ sinh trưởng cần tưới đủ, nhất là vào mùa nóng. Giữa các lần tưới cần xem xét các giá thể trồng có bị đọng nước không. Khô hoặc gần khô là tốt nhất. Phải đảm bảo cho giá thể trồng được thông thoáng làm cho rễ lan có lúc khô, và được khô từng lúc là điều rất quan trọng. Chế độ thở của lan có một phần nhờ vào rễ.

Trong mùa nóng, tưới hai đến ba ngày một lần là vừa phải, mùa thu và mùa đông hai lần.

Thời kỳ sinh trưởng độ ẩm cần từ 60 đến 70%. Thời kỳ nghỉ cần giảm thích đáng.

– Ánh sáng

Dendrobium là loài lan ưa sáng (60 - 70%), rất thích hợp với ánh sáng mạnh, có những loài yêu cầu ánh sáng tới 80 - 90%. Nhờ đó mà chúng phát triển được các giả hành thật mạnh mẽ, tất nhiên không để ánh nắng chiếu trực tiếp có thể làm cháy lá. Do đặc tính này nên việc nuôi trồng trong nhà hoặc dùng ánh sáng nhân tạo thực tế không thuận tiện, dễ dàng.

2.1.4. Tình hình sản xuất hoa lan trên thế giới và ở Việt Nam [9], [14]

2.1.4.1. Tình hình sản xuất hoa lan trên thế giới

Hiện nay nhu cầu về hoa lan trên thị trường thế giới rất lớn, ngày càng tăng và đã mang lại lợi nhuận kinh tế cao:

– Ở Châu Âu

Năm 1994, Mỹ nhập từ Thái Lan 16,4 triệu cành, từ Singapore 289000 cành lan *Dendrobium*.

Holland là một quốc gia duy nhất ở Châu Âu có công nghiệp trồng lan xuất khẩu, do trồng trong nhà kính nên Holland có thể xuất khẩu hoa quanh năm nhất là *Cymbidium*.

Italia là quốc gia nhập khẩu hoa lan lớn nhất Châu Âu. Năm 1993, nhập 75,3 triệu cành, chủ yếu từ các nước: Thái Lan, Holland, Singapore.

Đức và Pháp là hai quốc gia nhập khẩu lan đứng thứ 2 và thứ 3 Châu Âu.

– Ở Châu Á

Nhật là quốc gia nhập khẩu đứng đầu thế giới. Theo thống kê, tại Thái Lan, Singapore, Malaysia dành 600 ha đất trồng lan để xuất khẩu sang Nhật, chủ yếu là *Dendrobium*, *Oncidium*, *Cymbidium*, *Phalaenopsis*.

Thái Lan là nước xuất khẩu lan đứng đầu thế giới, chủ yếu là lan *Dendrobium*, xuất khẩu hơn 50 quốc gia trên thế giới với giá 1 – 3 USD / cành, có khi 8 – 10 USD / cành, những giống quý có thể lên đến hàng trăm USD.

Ngày nay, bằng nhiều kỹ thuật khác nhau người ta đã tạo ra được nhiều giống lan mới như: *Dendrobium ayaka*, *Dendrobium edians beauty*, *Dendrobium sungould*.

2.1.4.2. Tình hình sản xuất hoa lan ở Việt Nam

Tại Việt Nam ngành sản xuất kinh doanh hoa kiểng nói chung và lan nói riêng trong vòng 10 năm trở lại đây rất phát triển, với nhiều chủng loại. Tham gia sản xuất gồm nhiều thành phần kinh tế (cá thể, tập thể, nhà nước, liên doanh hoặc 100% vốn đầu tư nước ngoài). Tuy nhiên sản xuất còn chưa được áp dụng khoa học kỹ thuật nên mặc dù đa dạng nhưng không đạt về tiêu chuẩn, số lượng và chất lượng do đó tính cạnh tranh còn thấp.

Ở vào vùng nhiệt đới, TP.HCM cùng với các tỉnh miền Đông và Tây Nam Bộ phù hợp với nhiều loại phong lan, địa lan. Ngoài việc nhập nội, lai tạo, nhân giống các loại lan mới, chúng ta còn sở hữu nhiều nguồn gen quý hiếm, độc đáo,

mới lạ. Cùng với đội ngũ nghệ nhân, doanh nhân tích lũy ngày càng nhiều kiến thức, kinh nghiệm, đang trực tiếp sản xuất – kinh doanh, còn có các cơ sở khoa học, các trường đại học, viện nghiên cứu, các thành phần kinh tế khác vào cuộc, góp phần khai thác tiềm năng, mở ra các khả năng, triển vọng sản xuất, kinh doanh và phát triển các loại phong lan, địa lan, nhằm đáp ứng nhu cầu về loài hoa này ngày càng lên cao trong và ngoài nước.

– Tại TP.HCM

Trong các chủng loại sản phẩm hoa kiểng, hoa lan xem là nhóm hoa có giá trị kinh tế cao, trong đó lan cắt cành đem lại lợi nhuận khá cao (có thể đạt 500 triệu – 1 tỉ đồng / ha / năm) nhưng vốn đầu tư ban đầu vẫn còn cao (600 – 800 triệu đồng / ha), chủ yếu là phân vốn đầu tư cho cây giống. Trong đó nhóm *Mokara* và *Dendrobium* được trồng nhiều nhất.

Theo Trung tâm Nghiên cứu khoa học kỹ thuật và khuyến nông TP.HCM, trong thời gian qua diện tích trồng hoa lan trong thành phố tăng nhanh, từ 20 ha năm 2003 lên 50 ha năm 2004 và khoảng 80 ha năm 2005.

Để đưa hoa lan trở thành một trong những cây chủ lực trong cơ cấu kinh tế nông nghiệp trong những năm tới, TP.HCM đề ra mục tiêu phát triển diện tích trồng hoa lan lên 200 ha vào năm 2010 và một số giải pháp chính về giống, khoa học kỹ thuật, thị trường tiêu thụ, đào tạo nguồn nhân lực, chính sách hỗ trợ.

– Tại Đà Lạt

Cây lan *Cymbidium* đã được nuôi trồng tại Đà Lạt từ rất lâu, chủ yếu để tiêu khiển. Tại đây, ngoài những loài tự nhiên, các biến chủng, còn có nhiều giống nhập nội nuôi trồng.

Từ năm 1977, sau khi thành lập tổ Hoa Lan Xuất Khẩu, phong trào trồng lan đã được phát triển mạnh.

Đến năm 1985, đã xuất khẩu được trên 15000 cành hoa *Cymbidium*.

Hiện nay nhu cầu hoa lan đang tăng nhanh, trong khi đó mức độ phát triển còn hạn chế. Đó là do chưa có những đầu tư nghiên cứu về đối tượng này như: vấn

đề khoa học, chọn tạo giống và kỹ thuật nuôi trồng, do đó không thể hiểu rõ và đánh giá đúng đắn tiềm năng và triển vọng nguồn lợi này.

Xu hướng hiện nay đang tập trung vào các giống nhập nội, còn lại các loại lan nội địa ít được chú ý. Mặc dù các loài biến chủng nội địa có giá trị rất cao, có thể đáp ứng được nhu cầu xuất khẩu. Như vậy cơ sở để phát triển nghề trồng lan xuất khẩu vẫn phải chú trọng vào cây lan nội địa, nhất là chọn tạo giống mới từ cây lan nội.

2.2. Giới thiệu về đa dạng sinh học

2.2.1. Định nghĩa [6]

Đa dạng sinh học (Biodiversity) là sự giàu có, phong phú và đa dạng về nguyên liệu di truyền, về loài và các hệ sinh thái.

Định nghĩa do Quỹ bảo tồn thiên nhiên thế giới – WWF (1989) đề xuất như sau: “ Đa dạng sinh học là sự phong phú của sự sống trên Trái đất, là hàng triệu loài thực vật, động 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 môi trường”.

2.2.2. Các phân mức về đa dạng sinh học [5], [6]

2.2.2.1. Sự đa dạng về hệ sinh thái

Hệ sinh thái là một cộng đồng gồm các loài sinh vật sống trong một điều kiện nhất định và mối quan hệ tương hỗ giữa các sinh vật đó với các nhân tố môi trường.

Sự đa dạng hệ sinh thái thể hiện bằng sự khác nhau của các kiểu quần xã sinh vật. Quần xã này được tạo nên do các cơ thể sống và mối liên hệ giữa chúng với nhau và với các điều kiện sống (đất, nước, khí hậu, địa hình).

Tóm lại, hệ sinh thái càng khác nhau thì tính đa dạng sinh học càng cao. Điều kiện môi trường càng khác nhau thì hệ sinh thái nơi đó càng đa dạng.

2.2.2.2. Đa dạng loài

Sự đa dạng loài bao gồm số loài có trên Trái đất. Sự đa dạng này được thể hiện bằng số lượng loài khác nhau cùng sống trong một vùng nhất định. Loài được xác định bởi một trong hai cách:

– Phân loại theo cấu tạo hình thái của loài: xác định theo nhóm cá thể có những hình thái, sinh lý hoặc hoá sinh đặc trưng, khác biệt với các nhóm khác. Cách phân loại này thường được các nhà phân loại học, sinh học vận dụng để định loại, đặt tên khoa học cho những mẫu vật mới.

– Phân loại sinh học loài: là nhóm cá thể có khả năng giao phối với nhau tạo con lai hữu thụ, không giao phối sinh sản với các nhóm khác. Cách này được sử dụng để nghiên cứu quá trình tiến hoá khảo sát mối quan hệ về gen.

2.2.2.3. Sự đa dạng về di truyền

Là phân mức cơ bản nhất trong đa dạng sinh học, tạo nên sự khác biệt của các cá thể trong quần thể và nghiên cứu về đa dạng di truyền cũng là các nghiên cứu cơ bản và chính xác nhất sự khác biệt về loài.

Sự đa dạng về mặt di truyền trong loài thường bị ảnh hưởng bởi những tập tính sinh sản của các cá thể trong quần thể. Một quần thể là một nhóm cá thể giao phối được với nhau tạo ra con lai hữu thụ, trong loài bao gồm một hay nhiều quần thể.

Các cá thể trong một quần thể thường có bộ gen khác nhau. Sự đa dạng về bộ gen này là do các cá thể có các gen khác nhau, dù chỉ là rất ít. Gen là đơn vị di truyền cùng với nhiễm sắc thể đặc trưng cho những protein riêng biệt.

Những hình thái khác nhau của gen được thể hiện bằng những alen và những khác biệt do sự đột biến. Những alen khác nhau của một gen có thể ảnh hưởng đến sự phát triển và đặc điểm sinh lý của mỗi cá thể theo cách khác nhau.

Những sự khác biệt về gen trong di truyền học được tăng dần khi con cái nhận đầy đủ tổ hợp gen và nhiễm sắc thể của bố mẹ thông qua sự tái tổ hợp của các gen trong quá trình sinh sản. Các gen trao đổi trong quá trình giảm phân và một tổ hợp mới được thiết lập khi nhiễm sắc thể của cả bố và mẹ kết hợp thành một tổ hợp thống nhất mới cho con cái.

Tổng các gen và alen trong một quần thể là vốn gen của quần thể và những tổ hợp của các alen mà mỗi cá thể có được gọi là kiểu di truyền (genotype). Kiểu hình (phenotype) của mỗi cá thể được biểu hiện bởi các tính chất về hình thái, sinh

lý, hoá sinh và được đặc trưng bởi các kiểu di truyền trong từng môi trường nhất định.

Số lượng khác biệt nhau về gen trong một quần thể được xác định bởi số gen trong vốn gen đó, thường mỗi gen có nhiều hơn một alen (các gen đa hình) và số các alen cho mỗi một gen đa hình. Sự tồn tại của các gen đa hình cho phép các cá thể trong quần thể có thể có kiểu gen dị hợp tử, có nghĩa là cá thể nhận được những alen khác nhau từ các gen của mỗi bố mẹ. Sự khác biệt về gen cho phép các loài thích ứng được với sự thay đổi của môi trường.

2.3. Một số phương pháp nghiên cứu đa dạng di truyền

2.3.1. Phương pháp sử dụng các marker hình thái [1], [4]

Sự đa dạng di truyền có thể phát hiện dựa vào các biểu hiện hình thái. Gen thể hiện bản chất di truyền sẽ được liên kết với một tính trạng hình thái nào đó mà người ta có thể đo đếm được – gen đó có thể xem như marker. Tuy nhiên, số marker hình thái hiện diện trong tự nhiên cũng rất ít, không thỏa mãn yêu cầu của nhiều chương trình chọn giống và chỉ có quy mô hình thái (cơ quan) hoặc ở giai đoạn phát triển đặc biệt của cá thể. Sự thể hiện các marker hình thái bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường, điều này làm cho marker hình thái kém thu hút trong cải tiến giống cây trồng.

2.3.2. Phương pháp sử dụng các marker isozyme [1]

Isozyme là các dạng protein có cùng phản ứng enzyme nhưng có sự khác nhau khi chạy điện di. Kỹ thuật điện di được dùng để đo sự di động của phân tử protein trong một khoảng thời gian nhất định, trên điện trường đồng nhất. Các protein đột biến khác nhau về điện tích sẽ có sự di chuyển khác nhau nên có thể phát hiện sự khác nhau giữa chúng bằng kỹ thuật điện di. Sự khác nhau này phản ánh sự khác nhau trong kích thước và cấu trúc của phân tử protein. Trong nhiều trường hợp, còn liên quan tới sự thay thế bởi một amino acid trong phân tử protein do đột biến từ alen này sang alen khác.

Nhờ kỹ thuật điện di này, cùng lúc có thể phân tích nhiều cá thể của một quần thể nào đó để đánh giá chính xác số phần trăm dị hợp tử của một gen nhất định. Nó cho biết sự đa dạng giữa các nhóm sinh vật theo các protein được quan sát.

Tuy việc áp dụng marker isozyme đã làm thay đổi việc nghiên cứu đa dạng di truyền theo chiều hướng thuận lợi hơn nhưng số marker cũng quá ít, không thỏa mãn cho nhu cầu nghiên cứu.

2.3.3. Phương pháp sử dụng các marker phân tử [1], [24]

Các marker phân tử đã chứng minh có tầm quan trọng hơn về lâu dài so với marker hình thái và marker isozyme, do số lượng của nó gấp hơn nhiều lần so với marker isozyme.

Về căn bản, bất cứ chuỗi mã DNA nào được phân biệt giữa hai cá thể, hai dòng hoặc hai giống khác nhau đều có thể được xem là một marker phân tử. Các marker phân tử có thể chia làm hai nhóm như sau:

- Marker dựa vào phương pháp lai DNA (DNA – DNA hybridization based): RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), minisatellite.
- Marker dựa vào phương pháp PCR: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Những lợi ích của marker phân tử so với marker hình thái và marker isozyme:

- Đo lường trực tiếp các vật liệu di truyền.
- Có nhiều marker trong quần thể.
- Đo lường không chi phối ảnh hưởng môi trường và ảnh hưởng có tính chất phát triển.

2.4. Quy trình ly trích DNA tế bào thực vật [3]

DNA, vật liệu mang thông tin di truyền được cấu tạo bởi nucleotide, là yếu tố mở đầu cho mọi nghiên cứu và ứng dụng sinh học phân tử, trong đó bao gồm các nghiên cứu tính đa dạng di truyền trong quần thể. Để có thể tiến hành các thí nghiệm phân tích sâu hơn thì việc thu nhận một lượng DNA lớn và sạch là điều kiện

tiên quyết. Đối với tách chiết DNA thì mối quan tâm hàng đầu là thu nhận được các phân tử này ở trạng thái nguyên vẹn tối đa, ít bị phân hủy do các tác nhân cơ học (phân tử bị gãy do nghiền, lắc mạnh) hay hoá học (phân tử bị thủy giải do các enzym (enzym nội bào giải phóng ra môi trường khi tế bào bị phá vỡ hay sự tập nhiễm trong khi thao tác). Quá trình tách chiết DNA cần thực hiện ở nhiệt độ thấp để ức chế enzym nội bào.

Một qui trình ly trích DNA ở tế bào thực vật gồm 3 bước cơ bản:

Bước 1: Phá vỡ màng tế bào.

Thông thường người ta nghiền tế bào hoặc mô trong một hỗn hợp dung dịch đệm chiết gồm Tris – HCl 1M (pH 7,5), NaCl 5M, EDTA 0,5M, sodium dodecyl sulfat 10% (SDS). Hỗn hợp này sẽ phá vỡ vách tế bào và màng nhân, giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA. Ngoài ra trong thành phần dịch trích còn có mercaptoethanol có tác dụng bảo vệ DNA trong quá trình ly trích.

Bước 2: Loại bỏ các thành phần không mong muốn trong mẫu chủ yếu là các protein.

Có thể sử dụng CTAB/NaCl (CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide) tạo phức hợp với polysaccharide và protein rồi kết tủa chúng. Loại bỏ protein và phức hợp CTAB – polysaccharide – protein bằng hỗn hợp phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25 : 24 : 1). Phenol và chloroform sẽ làm biến tính protein. Ngoài ra chloroform còn làm cho pha nước và pha hữu cơ dễ tách rời nhau. Isoamyl alcohol hạn chế sự nổi bọt trong suốt quá trình ly trích. Mặc dù phenol làm biến tính protein nhưng nó có thể làm ức chế hình dạng của RNase và làm dung môi cho phân tử RNase có chứa những chuỗi dài polyA. Do đó, có thể khắc phục nhược điểm này bằng cách sử dụng thêm chloroform sẽ giúp loại bỏ tất cả các dấu vết còn sót lại của phenol trong nucleic acid. Protein bị biến tính sẽ không 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 hữu cơ. Pha nước có chứa nucleic acid được thu nhận lại.

Bước 3: Tủa nucleic acid trong isopropanol.

Các DNA có trọng lượng phân tử thấp không bị tủa nên có thể loại bỏ chúng bằng tủa trong isopropanol. Nucleic acid sẽ được thu nhận lại bằng ly tâm. Sau đó, cặn tủa phải được rửa trong ethanol 70% để loại bỏ các muối hoặc các dấu vết của isopropanol còn dính lại.

2.5. Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction)

2.5.1. Khái niệm và nguyên tắc của kỹ thuật PCR [3]

PCR là phương pháp nhân nhanh một đoạn phân tử DNA trong ống nghiệm. Đây là một kỹ thuật nhằm tạo ra hàng triệu đoạn DNA đồng nhất từ một hỗn hợp các phân tử bao gồm RNA, protein, polysaccharide, DNA không có chức năng và DNA có chức năng di truyền. Người ta còn gọi đó là kỹ thuật tạo dòng DNA invitro. Ngày nay PCR được dùng rất phổ biến trong nhiều lĩnh vực về sinh học.

PCR được thực hiện trên cơ sở sinh tổng hợp DNA theo nhiều chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm 3 trình tự như sau :

Bước 1: Biến tính (Denature)

Giai đoạn này được thực hiện ở nhiệt độ cao (94 - 95° C) trong vòng 30 giây đến 1 phút, làm cho phân tử DNA mạch kép tách hoàn toàn thành 2 mạch đơn. Chính 2 mạch đơn này đóng vai trò là mạch khuôn cho sự tổng hợp 2 mạch bổ sung mới.

Bước 2: Bắt cặp (Annealing)

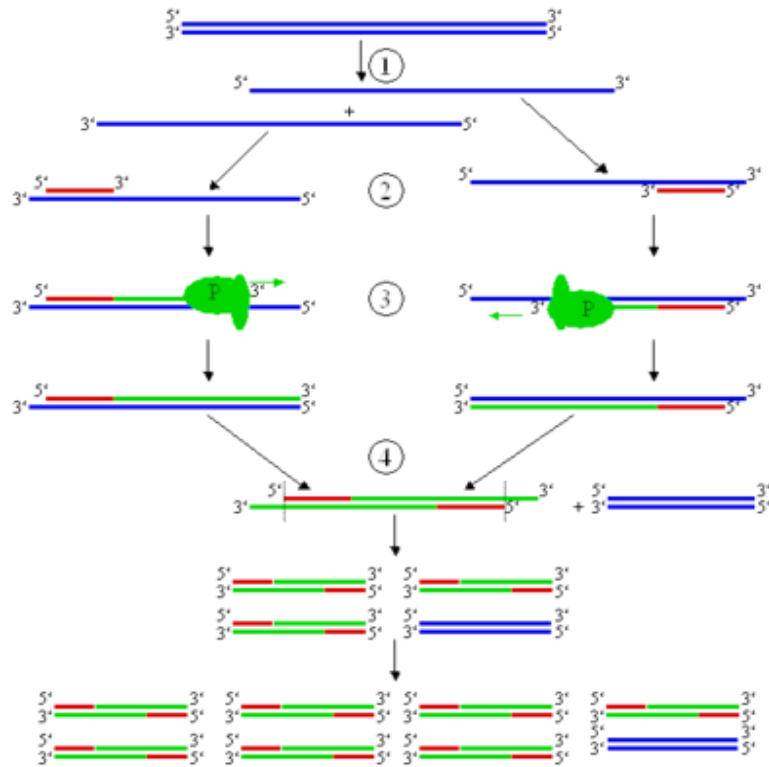
Phản ứng của primer tác động lên dây nền, các primer này gắn vào đầu dây chuỗi mã đối xứng với chuỗi mã trên dây template để có phân tử DNA mới.

Ở giai đoạn này nhiệt độ được hạ thấp đến mức cho phép các primer bắt cặp được với khuôn, nhiệt độ này dao động trong khoảng 30 – 70°C, kéo dài trong khoảng 30 giây đến 1 phút, tùy thuộc vào nhiệt độ nóng chảy T_m (melting temperature) của các primer sử dụng.

Bước 3: Kéo dài (Extension)

Đây là giai đoạn tổng hợp dây đơn bổ sung dọc theo chiều 5' - 3' của 2 primer nhờ hoạt động của *polymerase*. Nhiệt độ được tăng lên 72°C giúp cho DNA

polymerase hoạt động tốt nhất. Thời gian của giai đoạn này tùy thuộc vào độ dài của trình tự DNA khuếch đại, thường kéo dài từ 30 giây đến vài phút.



Hình 2.1 Nguyên tắc cơ bản của phản ứng PCR

Nguyên tắc cơ bản của phản ứng PCR là khuếch đại một đoạn gen quan tâm bằng primer chuyên biệt kết hợp với hoạt động của enzym chịu nhiệt *polymerase* như *Taq DNA polymerase* trong một chu trình nhiệt hợp lý. Tác động của primer được xem như yếu tố đánh dấu cho hoạt động của *polymerase* khi nó được gắn kết vào DNA mạch đơn làm khuôn trong giai đoạn bắt cặp. Primer bên trái tác động trên dây DNA 3' - 5' còn được gọi là forward primer, kí hiệu là F. Primer bên phải tác động trên dây 5' - 3' còn được gọi là reverse primer, kí hiệu là R. Sự sắp xếp như vậy đảm bảo vùng bị can thiệp được tăng cường hoạt động, theo 3 trình tự đã nói ở trên. Tóm lại, khi các primer kết hợp với sợi DNA đối lập của nó trong điều kiện một khoảng cách đã được kích hoạt, các đoạn DNA này có thể sẽ được khuếch đại lên theo phản ứng dây chuyền với *polymerase*.

2.5.2. Thành phần phản ứng PCR [1], [3], [11]

Phản ứng PCR chứa 7 thành phần cần thiết:

– DNA *polymerase* chịu nhiệt để xúc tác tổng hợp đoạn DNA mục tiêu từ khuôn mẫu: trong một phản ứng PCR thông thường, *Taq polymerase* (0,5 – 2,5 units/ 25 – 50 μ l phản ứng) là enzym được lựa chọn. Trong các sản phẩm thương mại, lượng *Taq* khoảng 80000 units/mg protein. Do đó, một phản ứng PCR tiêu chuẩn có chứa từ $2 \cdot 10^{12}$ đến $10 \cdot 10^{12}$ phân tử enzym. Hoạt động của enzym bị ức chế khi lượng sản phẩm khuếch đại lên khoảng $1,4 \cdot 10^{12}$ đến $7 \cdot 10^{12}$ trong phản ứng. Tóm lại, *Taq DNA polymerase* là enzym tiêu chuẩn và phù hợp cho bước khuếch đại của hầu hết các dạng PCR. Thế nhưng, sự bắt cặp sai ở đầu 3' rất dễ xảy ra.

– Primer là yếu tố quyết định đến tính hiệu quả và chuyên biệt của phản ứng khuếch đại. Thiết kế primer như thế nào để tạo được sản phẩm số lượng lớn, đồng nhất. Primers là yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến sự thành công hay thất bại của quy trình phản ứng PCR. Trong phản ứng PCR thông thường chứa số lượng primer không hạn chế, điển hình từ 0,1 – 0,5 μ M mỗi primer ($6 \cdot 10^{12}$ đến $3 \cdot 10^{13}$ phân tử). Số lượng này đủ để khuếch đại đoạn DNA 1000 bp trong ít nhất 30 chu kỳ.

– Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs): Phản ứng PCR chứa số lượng phân tử bằng nhau giữa dATP, dTTP, dGTP và dCTP. Nồng độ mỗi dNTP khoảng 200 - 250 μ M là phù hợp với phản ứng chứa 1,5 mM $MgCl_2$. Tuy nhiên nồng độ dNTP thích hợp nhất để khuếch đại sản phẩm 1000 bp chỉ khoảng 0,5 – 1 pmole. Hàm lượng dNTP quá cao sẽ ngăn cản phản ứng xảy ra .

– Cations hoá trị II: tất cả các DNA *polymerase* chịu nhiệt đều cần cation hoá trị II tự do để hoạt động và Mg^{2+} thường được sử dụng. Một vài DNA *polymerase* cũng có thể hoạt động nhưng ít hiệu quả trong buffer có chứa Mn^{2+} còn ion Calci thì hoàn toàn không hiệu quả. Do đó, Mg^{2+} là sự lựa chọn tốt nhất trong mọi trường hợp. Mặc dù, hàm lượng của Mg^{2+} thường được sử dụng là 1,5 mM nhưng khi tăng hàm lượng Mg^{2+} lên 4,5 mM hay 6 mM có thể làm giảm sự bắt cặp sai trong vài trường hợp và làm tăng trong một số trường hợp khác.

– Buffer để duy trì pH: Tris- Cl, điều chỉnh pH giữa 8,3 – 8,8 ở nhiệt độ phòng, có nồng độ 10 mM trong phản ứng, khi ủ ở 72⁰C (nhiệt độ ở pha kéo dài), pH của toàn bộ hỗn hợp phản ứng là khoảng 7,2.

– Nước cất hai lần đã hấp khử trùng.

– DNA mẫu: Chứa trình tự mục tiêu, có thể được thêm vào hỗn hợp dưới dạng chuỗi đơn hay chuỗi đôi. DNA dạng vòng thì không hiệu quả bằng DNA ở dạng thẳng. Nồng độ DNA mẫu ở khoảng 50 ng/μl là thích hợp cho một phản ứng PCR.

2.5.3. Ưu, nhược điểm của kỹ thuật PCR

Kỹ thuật PCR được sử dụng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu quan trọng do các ưu điểm sau:

- Độ nhạy rất cao
- Thao tác đơn giản.
- Thời gian thực hiện nhanh.
- Độ tinh sạch của mẫu không cần cao.
- Lượng mẫu cần ít.

Tuy nhiên, phương pháp này có nhiều mặt hạn chế và đòi hỏi sự thận trọng đặc biệt khi tiến hành thí nghiệm cũng như khi phân tích kết quả. Có thể có ba vấn đề lớn khi sử dụng kỹ thuật PCR:

- Trong thực nghiệm, kích thước của trình tự cần khuếch đại là giới hạn đầu tiên.
- Trừ vài trường hợp rất cá biệt, phương pháp PCR không hoạt động được với những đoạn DNA lớn hơn 3000 bp. Việc sử dụng PCR với các độ dài dưới 1500 bp cho kết quả tốt. Với những độ dài lớn hơn, điều kiện tối ưu cho phản ứng phải được xác định qua thực nghiệm.
- Sự ngoại nhiễm là vấn đề lớn nhất đặt ra đối với PCR, gắn liền với khả năng khuếch đại bản sao của phương pháp này.

Nguồn ngoại nhiễm lớn nhất là các sản phẩm khuếch đại của những lần thao tác trước. Khi mở nắp các ống nghiệm sau mỗi lần khuếch đại, các phân tử khuếch đại sẽ thoát ra khỏi ống nghiệm và lơ lửng trong không gian phòng thí nghiệm rồi

niêm vào các phản ứng tiến hành sau đó. Có thể khắc phục vấn đề này bằng một số biện pháp sau:

- Các công đoạn thao tác khác nhau phải tiến hành ở những địa điểm cách xa nhau.
- Dụng cụ dùng để thực hiện phản ứng (micropipette không sử dụng vào các thao tác khác).
- Dùng tia tử ngoại để loại bỏ các phân tử còn lại từ các lần khuếch đại trước.
- Tất cả mọi thành phần phản ứng đều chia thành những lượng nhỏ đủ với 1, 2 lần thao tác.
- Hạn chế các sai sót gây ra do *Taq polymerase*: sự sao chép bởi *Taq polymerase* cho tỉ lệ sai sót khá cao (10^{-4} , nghĩa là cứ 10000 nucleotid thì enzyme gắn sai một nucleotid). Ta không thể loại bỏ hoàn toàn các sai sót này mà chỉ có thể giảm bớt.

2.6. Một số marker phân tử thường dùng trong nghiên cứu đa dạng di truyền

Theo thống kê từ một cuộc khảo sát các công trình ứng dụng kỹ thuật phân tử vào nghiên cứu sinh học quần thể, từ năm 1979 đến nay đã có hàng ngàn nghiên cứu về di truyền quần thể trên nhiều đối tượng khác nhau, trong đó có hơn 300 nghiên cứu đã sử dụng các marker phân tử như RFLP, RAPD, DAF, minisatellite, SSCP làm công cụ nghiên cứu. Sự gia tăng sử dụng các kỹ thuật này vào đầu thập niên 90 đã chứng minh vai trò to lớn của chúng trong việc cung cấp những thông tin hữu ích về cấu trúc di truyền quần thể.

Kỹ thuật RAPD được sử dụng rộng rãi để phân tích tính đa hình của DNA. RAPD và fingerprinting được sử dụng trong các vấn đề liên quan đến sinh sản và huyết thống. Gần đây, việc sử dụng kỹ thuật minisatellite và microsatellite dần dần tăng lên. Tuy nhiên, chi phí xây dựng thư viện DNA vẫn là nhân tố giới hạn của nhiều phòng thí nghiệm muốn sử dụng hai kỹ thuật này. Các kỹ thuật DNA sử dụng các marker phân tử như SSCP, DAF, cũng đã được áp dụng vào các nghiên cứu quần thể và đã cung cấp sự lựa chọn mới.

2.6.1. Marker RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) [1]

Trong số các marker phân tử, marker RFLP được sử dụng đầu tiên trong việc lập bản đồ gen của con người, sau đó được cải biên để ứng dụng cho việc lập bản đồ (mapping) ở cây trồng. RFLP là thể đa hình đáng tin cậy nhất, có thể được dùng cho những phân tích chính xác về kiểu gen.

RFLP được định nghĩa là tính đa hình về chiều dài các đoạn cắt giới hạn, biểu hiện sự khác nhau về kích thước các phân đoạn DNA được cắt bằng các enzyme cắt giới hạn.

Nguyên tắc của kỹ thuật này dựa trên độ đặc hiệu của enzyme cắt giới hạn đối với vị trí nhận biết của chúng trên DNA bộ gen. DNA bộ gen được cắt bằng các enzyme cắt giới hạn, chạy điện di qua gel agarose, thấm qua màng lai và lai với một mẫu dò DNA (được đánh dấu phóng xạ). Sự khác biệt vị trí cắt giữa hai cá thể sẽ tạo ra các phân đoạn cắt khác nhau.

Marker RFLP có khả năng sử dụng rất phong phú, vì là marker có đặc tính đồng trội cho phép phân biệt được cá thể đồng hợp và dị hợp, 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 sử dụng những marker đơn giản hơn trên cơ sở phản ứng PCR.

2.6.2. Marker AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) [1]

AFLP được định nghĩa là sự đa hình các đoạn cắt khuếch đại, là kỹ thuật kết hợp giữa RFLP và 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 là:

MseI: Là enzyme cắt ở vị trí xác định là 4 base

EcoRI: Là enzyme cắt ở vị trí xác định là 6 base

- Primer : Có hai loại primer được sử dụng

Primer dùng trong khuếch đại tiền chọn lọc:

EcoRI: 5'GACTGCGTACCAATTC-3'

MseI: 5'GATGAGTCCTGAGTAA-3'

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'.

EcoRI: 5'FAM-GACTGCGTACCAATTCACT-3'

MseI : 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'

– Quy trình thực hiện AFLP gồm các 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.

2.6.3. Marker RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [1], [11]

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) được định nghĩa là sự đa hình các đoạn DNA được khuếch đại ngẫu nhiên. Kỹ thuật này sử dụng các primer tổng hợp đơn, ngắn (thường khoảng 10 – mer), trình tự các primer này được thiết kế một cách ngẫu nhiên nhằm khuếch đại các trình tự DNA chưa biết bằng phản ứng PCR. Sau khi bắt cặp tại các vị trí trên sợi DNA khuôn, primer tiến hành sự khuếch đại để tạo ra các đoạn DNA có kích thước khác nhau. Các đoạn DNA có kích thước khác nhau này được nhận biết bằng điện di. Một primer có thể tạo ra sự đa hình DNA giữa các cá thể và các đoạn đa hình này có thể được dùng như những marker.

Để nghiên cứu đa dạng di truyền bằng marker RAPD, cần tiến hành các bước sau đây:

- Tách chiết DNA tổng số.

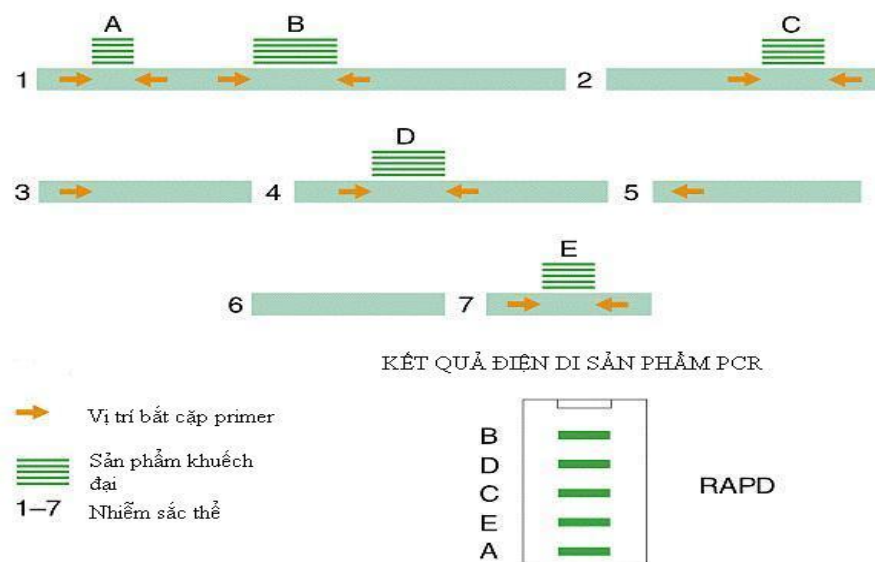
- Thực hiện phản ứng PCR với primer RAPD.
- Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose hoặc gel polyacrylamide.
- Xác định tính đa dạng di truyền bằng cách sử dụng các phần mềm như: NTSYSpc2.1, Genetix.

Ngoài những ứng dụng trong nghiên cứu đa dạng sinh học, marker RAPD cũng được sử dụng cho những mục đích sau:

- Lập bản đồ liên kết, xác định những gen liên kết với một tính trạng nào đó.
- Phân tích cấu trúc di truyền của quần thể.
- In dấu vân tay (DNA fingerprinting).

Tuy có nhiều ứng dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền nhưng marker RAPD cũng có một số hạn chế sau:

- Có đặc tính trội (dominant) do đó khó phân biệt được những gen lặn hay cá thể dị hợp tử.
- Có tính chất ngẫu nhiên nên sản phẩm PCR thường không thống nhất.
- Độ tin cậy chưa cao.



Hình 2.2 Nguyên tắc của kỹ thuật RAPD

Kỹ thuật RAPD ra đời sau kỹ thuật RFLP, tuy khả năng tạo đa hình tương đương với kỹ thuật RFLP nhưng quy trình thực hiện đơn giản hơn, chi phí thấp hơn, thu kết quả nhanh hơn, giúp các nhà khoa học có thể thu được sự đa hình DNA tại

rất nhiều locus. Vì các môi sử dụng trong kỹ thuật RAPD ngắn nên dễ dàng tìm được các trình tự tương đồng trên DNA bộ gen. Do đó, tính đa hình thu được từ RAPD là khá cao vì khi có bất kỳ sự thay đổi một base nitơ nào thì sẽ nó sẽ ngăn cản sự bắt cặp giữa môi và DNA mạch khuôn. Do tính hiệu quả nên RAPD nhanh chóng có vị trí xứng đáng trong nghiên cứu về sự đa dạng di truyền một số giống cây trồng một và hai lá mầm như lúa, chuối, dứa, cà chua, cacao... Khái niệm chọn tạo giống phân tử (molecular breeding) hình thành trên cơ sở chức năng chẩn đoán của các kỹ thuật sinh học phân tử, trong đó có kỹ thuật RAPD.

2.6.4. Marker SSR (Simple Sequence Repeat) [11], [22]

Microsatellite là chuỗi mã di truyền lặp lại rất đơn giản, thường xảy ra một cách ngẫu nhiên trong hầu hết genomic trên thực vật. SSR được viết tắt từ chữ “Simple Sequence Repeat”. Chiều dài thường 1 – 100 bp. Do đó SSR có thể khuếch đại trong ống nghiệm bằng phương pháp PCR với phát triển của primer theo miền của hai bên chuỗi ký tự lặp lại trên một locus. Do đó, hiện nay các nhà nghiên cứu tiếp tục dùng SSR để thiết kế bản đồ gen trong di truyền, chọn lọc giống bằng SSR, đa dạng hóa về các vật liệu di truyền.

Microsatellite có tính đa hình rất cao (đa hình theo chiều dài), là những codominant-ai hay ai đồng trội (bao gồm 2 loại: ai đồng hợp và ai dị hợp), nó có các tính chất cần thiết cho một marker. Tần số đột biến từ $10^4 - 5.10^{-6}$, nó tuân theo định luật Mendel. Vị trí của microsatellite trên nhiễm sắc thể có thể được xác định bằng PCR từ một lượng DNA rất nhỏ. Xác định microsatellite PCR trên một loài nào đó thì có thể áp dụng trên những loài khác có quan hệ họ hàng.

SSR được thực hiện theo bốn bước:

- Tách chiết và tinh sạch DNA của các mẫu nghiên cứu.
- Thực hiện phản ứng PCR với các primer đặc trưng cho các đoạn lặp đơn giản.
- Điện di kết quả trên gel polyacrylamide hoặc điện di mao quản trên máy giải trình tự ABI 3100 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. Lập bản đồ di truyền và dựng cây phát sinh loài.

2.7. Cây phát sinh loài [17]

Tất cả các phương pháp nghiên cứu sự đa dạng của quần thể đều cho kết quả cuối cùng là các dữ liệu phân tử biểu hiện bằng các băng vạch trên bảng điện di rất phức tạp. Để lấy được các thông tin sinh học từ dữ liệu thô này, các nhà khoa học cần đến sự hỗ trợ của máy tính với các phần mềm phân tích dữ liệu thực nghiệm. Các thông số về độ đa dạng kiểu gen, độ đa dạng kiểu hình, khoảng cách gen giữa các quần thể được tính toán theo phương trình của Dice (1945). Từ các thông tin này, cây phát sinh loài sẽ được xây dựng khi dùng các phương pháp UPGMA, Neighbor Joining, Maximum parsimoni hoặc Maximum likelihood. Trước khi tìm hiểu phải lựa chọn phương pháp và phần mềm phù hợp, chúng ta cần tìm hiểu một số thuật ngữ về cây phát sinh loài nhằm cung cấp những thông tin cơ bản để hiểu và giải thích cây phát sinh loài.

2.7.1. Một số thuật ngữ

- Điểm cùng: biểu diễn cho các cá thể, còn được gọi là đơn vị tiến hóa OTU (Operational Taxonomic Units).
- Điểm giữa (node): dùng để phân loại hay thể hiện tổ tiên của cá thể (OTU).
- Nhánh (branch): xác định các mối quan hệ của cá thể ở hiện tại với tổ tiên của chúng.
- Chiều dài nhánh (branch length): thể hiện thời gian tiến hóa của loài.
- Gốc: là một tổ tiên chung của các cá thể được biểu diễn trên cây phát sinh loài.

2.7.2. Những cách vẽ cây phát sinh loài

Cây phát sinh loài có thể được vẽ bằng nhiều cách. Có thể vẽ cây phát sinh loài với chiều dài nhánh thể hiện thời gian tiến hóa, cũng có thể vẽ cây với thời gian tiến hóa được chỉ ra ở phía bên trên nhánh hoặc có thể vẽ cây phát sinh loài có gốc hoặc không có gốc.

Đối với những cây có gốc thì gốc thể hiện một tổ tiên chung. Với mỗi loài, luôn có một đường duy nhất từ gốc dẫn đến loài đó.

Đối với cây không có gốc thì tuy chỉ ra được mối quan hệ giữa các loài nhưng không xác định rõ con đường tiến hóa.

2.7.3. Các phương pháp chủ yếu tạo cây phát sinh loài

Tất cả các phương pháp phân tích di truyền quần thể đều xây dựng một cây phát sinh loài mô tả mối quan hệ giữa các cá thể trong quần thể. Hiện nay, có hai phương pháp đang được sử dụng phổ biến nhất là UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) và Neighbor – Joining, cả hai phương pháp đều tạo cây tiến hóa từ ma trận khoảng cách gen và độ tương đồng gen giữa các quần thể.

UPGMA: Đây là phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất để xây dựng cây phát sinh loài, phản ánh mức tương tự các kiểu hình giữa các OTU. Với một ma trận cho trước, thuật toán sẽ nhóm một cặp đơn vị tiến hóa có khoảng cách nhỏ nhất (có mức tương đồng gen cao nhất) với giá trị bằng nửa khoảng cách giữa hai OTU. Sau đó, cặp đơn vị tiến hóa này được xem như một OTU mới, trong đó, khoảng cách giữa OTU mới này với một OTU khác là trung bình khoảng cách giữa OTU đó với OTU còn lại trong nhóm. Thuật toán tiếp tục nhóm các OTU có khoảng cách nhỏ nhất cho đến khi chỉ còn có hai OTU. Cuối cùng UPGMA sẽ tạo một cây tiến hóa có gốc.

Neighbor – Joining: Đây là một trong những phương pháp xây dựng cây tiến hóa với ít nhánh nhất. Nguyên tắc của phương pháp này là tìm ra thứ tự các cặp hàng xóm (neighbor) hợp lý nhất làm giảm tổng chiều dài của cây tiến hóa.

2.8. Các công trình nghiên cứu khoa học có liên quan [16], [20], [21]

2.8.1. Tình hình nghiên cứu khoa học trên cây lan ngoài nước

Trong những năm gần đây, cây lan, đặc biệt là giống lan *Dendrobium*, được các nhà khoa học quan tâm đến nhiều do giá trị sử dụng của loài hoa này không chỉ dùng làm hoa trang trí mà còn có giá trị dược liệu. Với kỹ thuật công nghệ sinh học phát triển mạnh, các nhà khoa học Singapore, Đài Loan, Trung Quốc, Thái Lan đã đẩy mạnh đầu tư cho nghiên cứu trên đối tượng này. Đặc biệt, công trình gây được

sự chú ý nhất là nghiên cứu phát triển marker SSR cho cây lan *Dendrobium*. Với sự đầu tư theo hướng chiều sâu, các tác giả đã xây dựng được các SSR primer cho các giống *Dendrobium*. Sau đó, 19 SSR primer này được thử nghiệm với 42 dòng *Dendrobium* lai. Kết quả các marker ấy đều cho cùng số băng sản phẩm PCR. Ngoài ra, công trình còn đề cập đến việc phân tích mối quan hệ gần gũi của các giống có cùng nguồn gốc để xác minh lại nguồn gốc các giống hiện có ở Singapore. Trong tất cả các primer nhân bản vùng SSR thì primer OA12 cho độ đa hình cao nhất với 33 allel và OA07 cho độ đa hình thấp nhất với 6 allel. Kết quả kiểm tra trên 42 dòng thì có 14 SSR marker hoạt động tốt, còn lại 4 primer cho kết quả không ổn định.

Cũng cùng nhóm tác giả này, công trình phát triển AFLP vào năm 2003 đã cho thấy kết quả cây phân nhóm di truyền giữa phương pháp AFLP và phương pháp SSR là giống nhau. Tuy nhiên, phương pháp SSR cho phép nhận diện những giống lai tốt hơn phương pháp AFLP. Hơn thế nữa, việc ứng dụng lại qui trình để nhận diện giống bằng marker thì phương pháp SSR tốn ít thời gian và dễ dàng thực hiện hơn so với phương pháp AFLP, nghĩa là tính tái sử dụng của phương pháp SSR cao hơn phương pháp AFLP.

Bên cạnh sử dụng marker phân tử SSR trên đối tượng *Dendrobium*, cũng có nhiều công trình thực hiện dựa trên kỹ thuật marker RAPD như công trình của nhóm nghiên cứu Ge Ding trên chi *Dendrobium officinate* và dựa trên marker ISSR của nhóm Shen J. trường đại học Nanjing Normal, Trung Quốc cũng thực hiện trên chi *Dendrobium officinate*. Nhưng do khả năng tái lập kết quả thấp, nên kết quả thường cho khác nhau giữa các phòng thí nghiệm mặc dù các điều kiện là giống nhau.

2.8.2. Tình hình nghiên cứu khoa học trên cây lan trong nước

Được mệnh danh là nữ hoàng của các loài hoa, cùng với sự đa dạng, phong phú về chủng loại, cây hoa lan đã được biết đến, khai thác và thậm chí thương mại hóa từ lâu. Do đó, đã có rất nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đã và đang được tiến hành trên loài hoa có giá trị cao này. Tuy nhiên, cho đến bây giờ tình hình

nghiên cứu khoa học trong nước trên đối tượng này vẫn chủ yếu tập trung vào các đặc tính nông học với các đề tài có hàm lượng đầu tư khoa học và công nghệ chưa cao, chỉ xoay quanh một số vấn đề bao gồm phát triển các kỹ thuật chọn, tạo, và nhân giống (nuôi cấy mô, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng), nuôi trồng (chọn giá thể, liều lượng phân bón), liệt kê, phân loại hình thái, tác dụng y học của phong lan và một số rất ít các đề tài nghiên cứu về khía cạnh sinh học phân tử. Đa số các đề tài nghiên cứu vẫn chưa chú ý đến công tác bảo tồn, phát huy nguồn giống mặc dù lan bản địa Việt Nam có sự đa dạng sinh học cao và sở hữu nhiều đặc tính quý.

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện

Đề tài được thực hiện từ tháng 3 năm 2007 tháng 8 năm 2007 tại phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực vật – Viện nghiên cứu công nghệ sinh học và công nghệ môi trường – Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM.

3.2. Vật liệu

3.2.1. Các loài lan rừng giống *Dendrobium*

Các loài lan thí nghiệm bao gồm 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* thu thập tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc (tỉnh Lâm Đồng), mỗi địa điểm sẽ thu thập 10 loài, mỗi loài chọn một cây có các đặc tính tốt: cây khỏe mạnh, lá không bị rách hay bị nấm, sâu hại tấn công. Các loài lan thu thập được đem về trồng để thuận tiện cho việc lấy mẫu.

Bảng 3.1 Danh sách các loài lan rừng giống *Dendrobium* nghiên cứu

Tên La tinh	Tên tiếng Việt	Ký hiệu	Nhóm
<i>D. chrysotosum</i>	Kim Diệp	KD	<i>Callista</i>
<i>D. lindleyi</i> Steudel	Vảy Rồng	VR	<i>Callista</i>
<i>D. densiflorum</i> Wall	Thủy Tiên	TT	<i>Callista</i>
<i>D. thrysiflorum</i> Reichb	Thủy Tiên Vàng	TV	<i>Callista</i>
<i>D. farmari</i> Paxt	Thủy Tiên Trắng Vàng	TTV	<i>Callista</i>
<i>D. primulinum</i> Lindl	Long Tu	LT	<i>Dendrobium</i>
<i>D. anosmum</i> Lindl	Giả Hạc	GH	<i>Dendrobium</i>
<i>D. heterocarpumi</i> Lindl	Nhất Điểm Hoàng	NDH	<i>Dendrobium</i>
<i>D. moschatum</i> (Buch-Ham)	Thái Bình	TB	<i>Dendrobium</i>
<i>D. fimbriatum</i> Hook.f.	Long Nhãn	LN	<i>Dendrobium</i>

❖ **Đặc điểm hình thái của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium***

– **Kim Diệp:** Lan sống phụ, thân mập, phình ở giữa, cao từ 20 – 35 cm, lá dài từ 2 – 8 cm, thuôn, hình giáo, dài 8 – 10 cm rộng 2.5 – 3 cm, mềm, dễ rụng. Cụm hoa mềm, buông xuống, mang 8 – 20 hoa lớn màu vàng tươi. Cánh môi có đốm vàng cam đậm ở giữa.

– **Vẩy Rồng:** Lan sống phụ, củ giả áp sát lấy giá thể, dẹt, gồm 3 – 4 đốt phình ở giữa, có khía rãnh dọc, cao 3 – 10 cm, rộng 1.5 cm. Lá một chiếc ở đỉnh, cứng, dày, thuôn, dài 10 – 15 cm, đầu tròn. Cụm hoa mọc trên đốt củ giả, buông xuống dài 20 – 30 cm có 5 – 10 hoa. Hoa lớn 3 cm màu vàng tươi, cánh môi tròn, rộng.

– **Long Tu:** Lan sống phụ, thân mềm, cong hay buông xuống, dài 20 – 50 cm. Lá mềm, hình giáo, dài 8 – 10 cm, rộng 2 cm, chia 2 thùy nhỏ ở đỉnh. Hoa trên các đốt không lá, lớn, màu hồng nhạt. Cánh môi hình trái xoan rộng, mép có răng mảnh, màu trắng có đốm vàng và tím.

– **Giả Hạc:** Lan sống phụ, thân buông xuống dài 1 – 2 cm. Lá mỏng xếp dãy, dài 10 – 20 cm, rộng 2 – 3 cm. Hoa đơn độc trên các đốt giả, lớn, màu hồng tím với cánh môi có đốm lớn màu tím đậm, đỉnh tù.

– **Thủy Tiên:** Lan sống phụ, cao 20 – 50 cm, mảnh ở gốc, phình ở các đốt giữa và có 4 cạnh. Lá ở đỉnh từ 2 – 5 chiếc, thuôn, hình giáo, dài 10 – 12 cm, rộng 3 – 4 cm, dày. Hoa lớn đường kính 2 – 4 cm, hoa màu vàng, cánh môi có phần giữa màu vàng cam.

– **Thủy Tiên Vàng:** Rất giống thủy tiên xong hoa màu vàng bóng tươi, cánh môi trải rộng, mép có lông mịn và cánh môi có màu vàng nghệ.

– **Thủy Tiên Trắng Vàng:** Lan sống phụ, mọc bụi, cao 30 – 60 cm, thân có gốc hình trụ. Lá từ 3 – 4 chiếc tập trung ở đỉnh, dạng trái xoan thuôn, dài 8 – 12 cm, rộng 4 – 5 cm, nổi rõ 7 gân. Cụm hoa ở đỉnh, dài trên 20 cm, buông xuống. Hoa có cánh màu trắng, môi có đốm vàng lớn.

– **Nhất Điểm Hoàng:** Lan sống phụ, mọc bụi, thân cao 20 – 50 cm, mọc thẳng hơi cong xuống. Lá thuôn, hình giáo, dài 10 – 15 cm, rộng 3 – 4 cm, nhọn ở đỉnh.

Cụm hoa trên các đốt già, có 2 – 3 hoa. Hoa lớn, màu vàng rom, cánh môi dạng bầu dục nhọn, dài 4 cm, màu vàng cam có sọc đỏ hay nâu đỏ ở giữa.

– **Thái Bình:** Lan sống phụ, mọc bụi, cao đến 1.5 m, thân hình trụ, nhẵn, có rãnh sâu. Lá thuôn dài, đỉnh hơi lõm dài 7 – 12 cm với 7 – 9 gân dọc. Cụm hoa mọc ở đỉnh, thân già không có lá dài 20 – 30 cm mang 5 – 10 hoa buông xuống. Hoa lớn dài 4 – 5 cm, màu vàng cam. Cánh môi hình chén, màu cam đậm với hai đốm lớn tròn màu đỏ.

– **Long Nhãn:** Lan sống phụ, mọc bụi, dày, cao đến 1m. Lá hình giáo, mỏng, tù ở gốc, thuôn nhọn ở đỉnh, dài 10 – 13 cm. Cụm hoa hình chùy trên thân có lá, mang 8 – 10 hoa lớn buông xuống. Hoa màu vàng nghệ, cánh môi lớn dạng trái xoan, khía rãnh mảnh, có đốm lớn màu đỏ đậm ở giữa.



D. lindleyi



D. heterocarpum



D. thysiflorum



D. fimbriatum



D. chrysotosum



D. primulinum



D. densiflorum



D. moschatum



D. farmari



Dend. anosum (bot. syn. superbum)

Hình 3.1 Các loài lan rừng giống *Dendrobium* nghiên cứu

❖ **Cách thức lấy mẫu như sau :**

- Chọn những lá tươi tốt, chỉ lấy lá non. Mỗi mẫu lấy 2 lá, cho vào bịch nylon và để vào thùng lạnh có ướp muối nhằm bảo quản độ tươi của lá. Những cây chọn lấy mẫu lá được cột dây nylon màu để đánh dấu.
- Mẫu lá được lấy tại vườn và đem về phòng thí nghiệm để ly trích DNA ngay.

3.2.2. Hóa chất thí nghiệm

❖ **Các hoá chất dùng trong ly trích DNA**

- Nitơ lỏng.
- Dung dịch EB (extraction buffer):
 - 2% w/v CTAB
 - 1,4M NaCl
 - 100 mM Tris – HCl pH 8.0
 - 20 mM EDTA
 - 2% PVP
 - 0,1% v/v β – mercaptoethanol
- TE buffer, bao gồm 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA (pH 8.0).
- Dung dịch phenol / chloroform / isoamylalcohol (PCI) tỉ lệ 25 : 24 : 1.
- Dung dịch isopropanol lạnh.
- Sodium acetate.
- Ethanol 70% và 100%.
- RNase.

❖ **Các hóa chất dùng trong phản ứng PCR**

- 5X PCR buffer (do công ty Promega cung cấp).
- 25 mM $MgCl_2$ (do công ty Promega cung cấp).
- 10 mM dNTP's (do công ty Promega và Biorad cung cấp).
- *Taq* DNA polymerase (do công ty Promega cung cấp).
- DNA mẫu (ly trích từ lá lan rừng giống *Dendrobium*).
- H_2O cất 2 lần, siêu lọc, hấp khử trùng, chiếu UV.

- RAPD Primer (do công ty Invitrogen cung cấp).

Bảng 3.2 Danh sách các primer dùng trong nghiên cứu

Primer	Trình tự	T _m (°C) (Melting temperature)
OPAC10	AGCAGCGAGG	34
OPAH13	TGAGTCCGCA	32
OPAF16	TCCCGGTGAG	32
OPB01	GTTTCGCTCC	32
OPB08	GTCCACAGGG	34
U109	TGTACGTGAC	32
U693	GACGAGACGG	34
T3	TCCACTCCTG	32
S1384	AGGACTGCTC	32
V20	CAGCATGGTC	30

❖ Hóa chất dùng trong điện di

- Agarose.
- Dung dịch TAE 0,5X.
- Ladder 100 bp.
- Loading dye.
- Dung dịch nhuộm ethidium bromide.

3.2.3. Trang thiết bị thí nghiệm

- Chén sứ và chày giã (Đức).
- Eppendorf 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml (Mỹ).
- Cân phân tích 4 số (Ohaus – Mỹ).
- Máy hút và tủ cấy vô trùng (Anh Quốc).
- Pipet các loại (Nichiryo – Nhật).
- Găng tay.

- Đầu tuýp các loại (Đức).
- Máy ly tâm lạnh (Hettich – Đức).
- Tủ cấy vô trùng.
- Máy PCR (Biorad – Thụy Điển).
- Máy điện di (Cosmo Bio Co. – Nhật).
- Máy chụp ảnh DNA (Biorad – Mỹ).
- Lò viba (Electrolux – Thụy Điển).
- Máy định ôn (Mettler – Đức).
- Tủ lạnh (Sanyo – Nhật).
- Máy chụp ảnh kỹ thuật số (Sony – Nhật)

3.3. Phương pháp

3.3.1. Quy trình ly trích DNA tổng số

DNA của lá lan được ly trích theo qui trình ly trích của Doyle và Doyle (1990), đã được tối ưu bởi Trương Minh Dũng, 2007 (kết quả chưa công bố). Quy trình ly trích như sau:

- Bước 1: Nghiền 0,5 g lá trong N₂ lỏng.
- Bước 2: Thêm 1 ml dung dịch EB đã ủ ở 65⁰C, lắc cho đến khi hỗn hợp đồng nhất.
- Bước 3: Ủ mẫu ở 65⁰C trong 1 giờ.
- Bước 4: Ly tâm 11.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4⁰C.
- Bước 5: Hút dịch nổi. Thêm 500 µl hỗn hợp PCI. Lắc đều và ly tâm 11.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4⁰C.
- Bước 6: Hút dịch nổi. Lặp lại bước 5.
- Bước 7: Hút dịch nổi. Thêm 20 µl muối sodium acetate 3M và 640 µl ethanol 100%. Trộn đều và ủ mẫu ở -20⁰C trong 1 giờ.
- Bước 8: Thu tủa bằng cách ly tâm 5.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4⁰C.
- Bước 9: Hòa tan tủa bằng cách thêm 300 µl dung dịch TE 1X. Ủ mẫu ở 37⁰C trong 1 giờ.

- Bước 10: Thêm 300 µl dung dịch isopropanol lạnh, ủ mẫu qua đêm.
- Bước 11: Thu tủa bằng cách ly tâm 5.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4⁰C.
- Bước 12: Đổ bỏ dịch trong. Rửa tủa bằng cách thêm 400 µl ethanol 100%, ly tâm 5.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4⁰C.
- Bước 13: Lặp lại bước 12.
- Bước 14: Phơi khô tủa ở 37⁰C trong khoảng 2 giờ.
- Bước 15: Thêm 50 µl dung dịch TE 1X và trữ mẫu ở -20⁰C.

3.3.2. Kiểm tra định tính và định lượng DNA

3.3.2.1. Định tính DNA bằng phương pháp điện di

DNA sau khi ly trích sẽ được định tính bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1 %. Dưới tác dụng của điện trường, do tích điện âm (do tính chất của nhóm phosphate) nên DNA di chuyển từ cực âm sang cực dương. 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 UV.

Cách tiến hành:

- Pha gel agarose với nồng độ 1%: Cân 0,125 g agarose cho vào 12,5 ml dung dịch TAE 0,5 X. Đun sôi bằng lò Viba ở bước sóng 650 W cho đến khi agarose tan hoàn toàn. Để nguội đến khoảng 60⁰C.
- 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 20 phút.
- Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromide 10mg/ml trong 20 phút, sau đó đưa vào máy Geldoc đọc kết quả. Nếu mẫu có DNA thì băng DNA sẽ phát sáng

dưới dạng vạch trên gel điện di. Độ tập trung và độ đậm nhạt của băng điện di phản ánh độ tinh sạch và nồng độ cao hay thấp của mẫu DNA.

3.3.2.2. Định lượng DNA bằng phương pháp đo OD (Optical Density)

Các mẫu DNA li trích sau khi đã định tính bằng phương pháp điện di, sẽ được kiểm tra độ tinh sạch và ước lượng hàm lượng DNA bằng cách đo mật độ quang OD, với bước sóng 260 nm và 280 nm bằng máy quang phổ kế với độ pha loãng 100 lần. Hàm lượng DNA được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng DNA (ng/}\mu\text{l)} = [(62,9 \times \text{OD}_{260\text{nm}}) - (36 \times \text{OD}_{280\text{nm}})] \times 100$$

DNA được xem là sạch nếu tỉ số $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ nằm trong khoảng 1,5 đến 2,2.

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 20 μl dung dịch DNA hòa tan với 1,8 ml TE 1X. Cho vào Curvette. Tiến hành đo OD.

3.3.3. Tối ưu hóa các thành phần phản ứng PCR với marker RAPD

Trong đề tài này, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa phản ứng PCR dựa trên chương trình nhiệt và các thành phần hóa chất chuẩn như sau:

Bảng 3.3 Chương trình nhiệt cho phản ứng PCR

Số chu kỳ	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Thời gian (phút)
1	94	5
45	$\left\{ \begin{array}{l} 94 \\ T_a \\ 72 \end{array} \right.$	1/2
		1/2
		1
1	72	5
Hold 4°C		

(Được trích từ Nguyễn Thị Lang, 2002)

Bảng 3.4 Thành phần hóa chất cho phản ứng PCR

Hóa chất	Nồng độ sử dụng
PCR buffer	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,2 mM
Primer	0,25 μM
<i>Taq</i> polymerase	0,5U
DNA mẫu	30 ng
H ₂ O	Thêm vừa đủ 25 μl

(Được trích từ Nguyễn Thị Lang, 2002)

❖ **Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của số chu kỳ khuếch đại đến sản phẩm RAPD.**

– **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí gồm 2 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức gồm 1 mẫu DNA.

Bảng 3.5 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của số chu kỳ đến sản phẩm RAPD

Nghiệm thức 1			Nghiệm thức 2		
Số chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Số chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
1	94	5	1	94	4
37	{ 94 36 72 }	1/2	45	{ 94 36 72 }	1/2
		1/2			1/2
		1			1
1	72	5	1	72	5
Giữ ở 4°C			Giữ ở 4°C		

– **Phương pháp tiến hành:** chọn ngẫu nhiên 1 mẫu DNA có chất lượng tốt, thực hiện phản ứng PCR với primer OPAC10 với nồng độ các thành phần phản ứng như bảng 3.4. Ở thí nghiệm này, chúng tôi chọn DNA của loài lan Thái Bình (Bảo Lộc) để thực hiện.

- **Chỉ tiêu theo dõi:** Độ sáng, rõ của các băng khuếch đại trên gel điện di.

Bảng 3.6 Thành phần phản ứng PCR dùng trong thí nghiệm 1

Hóa chất	Nồng độ sử dụng
PCR buffer	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,2 mM
Primer	1 μM
<i>Taq</i> polymerase	0,5U
DNA mẫu	30 ng
H ₂ O	Thêm vừa đủ 25 μl

❖ **Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ primer đến sản phẩm RAPD.**

– **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí gồm 4 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức gồm 1 mẫu DNA.

Bảng 3.7 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ primer đến sản phẩm RAPD

	Nghiệm thức 1	Nghiệm thức 2	Nghiệm thức 3	Nghiệm thức 4
Nồng độ primer	1.2 μM	1 μM	0.8 μM	0.6 μM

– **Phương pháp tiến hành:** Tiến hành chọn 1 mẫu DNA có chất lượng tốt (DNA của loài lan Long Nhãn ở Bảo Lộc) và primer OPAC10 để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ primer đến sản phẩm RAPD.

- **Chỉ tiêu theo dõi:** Độ sáng, rõ của băng khuếch đại trên gel điện di.

❖ **Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Mg²⁺ đến sản phẩm RAPD.**

– **Thiết kế thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí gồm 3 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức gồm 1 mẫu DNA.

Bảng 3.8 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Mg^{2+} đến sản phẩm RAPD

	Nghiệm thức 1	Nghiệm thức 2	Nghiệm thức 3
Nồng độ Mg^{2+}	3 mM	2.5 mM	2 mM

– **Phương pháp tiến hành:** Tiến hành chọn 1 mẫu DNA có chất lượng tốt (DNA của loài lan Thái Bình ở Bảo Lộc) và primer OPAC10 để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Mg^{2+} đến sản phẩm RAPD.

– **Chỉ tiêu theo dõi:** Độ sáng, rõ của băng khuếch đại trên gel điện di.

❖ **Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ *Taq* polymerase đến sản phẩm RAPD.**

– **Thiết kế thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí gồm 3 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức gồm 1 mẫu DNA

Bảng 3.9 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ *Taq* đến sản phẩm RAPD

	Nghiệm thức 1	Nghiệm thức 2	Nghiệm thức 3
Nồng độ <i>Taq</i>	0.5 U	1 U	1.5 U

– **Phương pháp tiến hành:** Tiến hành chọn 1 mẫu DNA có chất lượng tốt (DNA của loài lan Thái Bình ở Bảo Lộc) và primer OPAC10 để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ *Taq* polymerase đến sản phẩm RAPD.

– **Chỉ tiêu theo dõi:** Độ sáng, rõ của băng khuếch đại trên gel điện di.

❖ **Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ DNA mẫu đến sản phẩm RAPD.**

– **Thiết kế thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí gồm 3 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức gồm 1 mẫu DNA.

Bảng 3.10 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ DNA mẫu đến sản phẩm RAPD

	Nghiệm thức 1	Nghiệm thức 2	Nghiệm thức 3
Nồng độ DNA	10 ng	30 ng	50 ng

– **Phương pháp tiến hành:** Tiến hành chọn 1 mẫu DNA có chất lượng tốt (DNA của loài lan Thái Bình ở Bảo Lộc) và primer OPAC10 để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ DNA mẫu đến sản phẩm RAPD.

– **Chỉ tiêu theo dõi:** Độ sáng, rõ của băng khuếch đại trên gel điện di.

❖ **Thí nghiệm 6: khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dNTPs đến sản phẩm RAPD**

– **Thiết kế thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí gồm 4 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức gồm 1 mẫu DNA.

Bảng 3.11 Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dNTPs đến sản phẩm RAPD

	Nghiệm thức 1	Nghiệm thức 2	Nghiệm thức 3	Nghiệm thức 4
Nồng độ dNTPs	0.1 mM	0.2 mM	0.3 mM	0.4 mM

– **Phương pháp tiến hành:** Tiến hành chọn 1 mẫu DNA có chất lượng tốt (DNA của loài lan Thái Bình) và primer OPAC10 để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dNTPs đến sản phẩm RAPD.

– **Chỉ tiêu theo dõi:** Độ sáng, rõ của băng khuếch đại trên gel điện di.

3.3.4. Thực hiện phản ứng PCR với marker RAPD

Sau khi xác định quy trình tối ưu cho phản ứng RAPD, chúng tôi tiến hành thực hiện phản ứng PCR với marker RAPD với các mẫu lan nghiên cứu để đánh giá đa dạng di truyền của các loài lan rừng giống *Dendrobium* thu thập từ Bình Phước và thị xã Bảo Lộc.

Sản phẩm RAPD được kiểm tra kích thước bằng điện di trên gel agarose 2%, trong dung dịch đệm TAE 0.5X, dưới hiệu điện thế 50V trong 70 phút. Sau đó, gel được ngâm trong dung dịch ethidium bromide 10 mg/ml và các vạch DNA sẽ được quan sát dưới tia UV.

3.3.5. Phương pháp đánh giá mối quan hệ di truyền bằng phần mềm NTSYS

Phân tích đa dạng nguồn gen theo phần mềm NTSYSpc2.1 là chương trình phần mềm do Rohlf (1992) thiết kế dùng để tìm kiếm và thành lập kiến trúc những dữ liệu có nhiều biến. NTSYS là hệ thống phân loại số trong nghiên cứu đa dạng quần thể ở mức độ DNA, dựa vào kết quả từ phương pháp in dấu vân tay DNA (DNA fingerprinting).

Từ kết quả phản ứng PCR với marker RAPD, tiến hành xác định mức độ đa hình của các loài lan rừng giống *Dendrobium* từ các vùng khác nhau bằng cách so sánh các phân đoạn DNA. Các phân đoạn được ghi nhận dựa trên sự có mặt hay không có mặt của chúng trên ảnh điện di. Nếu xuất hiện phân đoạn DNA thì kí hiệu là 1, không thì kí hiệu là 0. Các số liệu thu được sẽ được xử lý và phân tích trong chương trình NTSYSpc 2.1 để tìm ra mối tương quan giữa các đối tượng nghiên cứu thông qua hệ số tương đồng di truyền và biểu đồ hình cây. Số liệu này sẽ được sử dụng để xây dựng ma trận tương đồng (Similarity matrix) hoặc ma trận khoảng cách (Distance matrix). Các ma trận này biểu hiện cho mối quan hệ xa gần về mặt di truyền giữa các mẫu phân tích và được xây dựng trên công thức toán học của Dice (1945).

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

- ij : số băng giữa hai mẫu.
- a : số băng chung.
- b : Số băng chỉ xuất hiện ở i , không có ở j .
- c : Số băng chỉ xuất hiện ở j , không có ở i .
- S_{ij} : Hệ số tương đồng giữa 2 mẫu i và j .

Từ S_{ij} ta tính được khoảng cách di truyền giữa i và j

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

– Cách nhập số liệu:

Dữ liệu thu được từ sản phẩm PCR sẽ nhập vào excell theo những quy định chung. Nếu như sản phẩm có băng hiện diện thì ta sẽ nhập là 1 và 0 nếu không hiện diện băng. Sau khi nhập số liệu, ở hàng đầu tiên chúng ta ký hiệu là 1 (đối với ma trận hình chữ nhật), cột thứ hai ghi số hàng, cột thứ ba ghi số cột, và cột thứ tư ghi số 0 nếu không có số liệu thiếu. Sau đó, bản số liệu trong excell sẽ được dùng để xây dựng ma trận tương đồng trong phần mềm NTSYSpc 2.1

3.3.6. Phân tích Bootstrap bằng phần mềm Winboot

Winboot là một phần mềm được sử dụng để dựng bootstrap nhằm mục đích kiểm tra độ tin cậy của cây phát sinh loài (dendrogram) dựa trên phương pháp UPGMA. Các thuật toán sử dụng trong Winboot cũng tương tự như các thuật toán sử dụng trong phần mềm NTSYSpc2.1. Tuy nhiên, cây phát sinh loài được tạo thành bởi Winboot cho chúng ta biết được mức độ liên kết giữa các cá thể trong cùng giống nghiên cứu.

Cách nhập số liệu trong Winboot như sau : Dữ liệu thu được từ sản phẩm PCR sẽ nhập vào excell theo những quy định chung. Nếu như sản phẩm có băng hiện diện thì ta sẽ nhập là 1 và 0 nếu không hiện diện băng. Số liệu được nhập theo hàng dọc, trong đó cột thứ nhất là số hàng tương ứng với số mẫu nghiên cứu và cột thứ hai là số cột tương ứng với số lượng sản phẩm thu được. Bản số liệu excell được lưu dưới dạng Text (Tab delimited) và tên file được lưu với đuôi .Dat. Sau đó, bản số liệu này sẽ được sử dụng để xây dựng ma trận tương đồng và kết quả là sơ đồ cây phát sinh loài sẽ được tạo ra khi sử dụng phương pháp UPGMA.

Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Sản phẩm li trích DNA tổng số

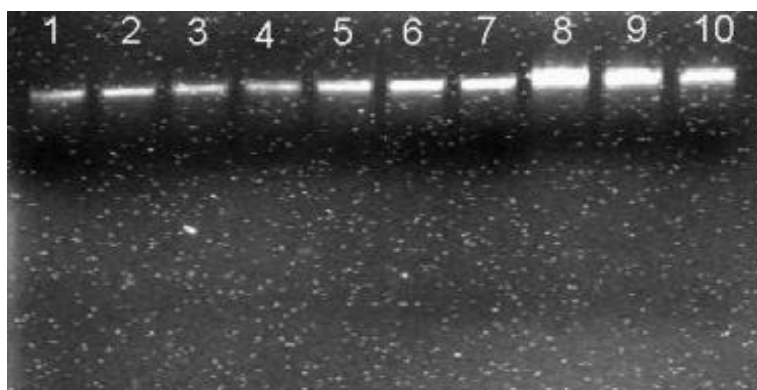
DNA là thông tin di truyền, là vật liệu quan trọng dùng trong các thao tác nghiên cứu về phân tử. Li trích DNA là một bước khởi đầu rất quan trọng, vì nó quyết định sự thành công cho phản ứng PCR sau này. Qui trình li trích DNA của Trương Minh Dũng, 2007 đạt hiệu quả tốt vì DNA li trích có độ tinh khiết cao. Việc sử dụng phenol có tác dụng biến tính protein rất nhanh và hiệu quả. Dịch trích DNA chứa chất 2 – mercaptoethanol có khả năng khử các hợp chất phenol và phá vỡ thành tế bào rất mạnh. Thêm vào đó, sự có mặt của muối sodium acetate có khả năng làm biến tính enzyme phân hủy DNA. Mặt khác, bước sử dụng phenol : chloroform : isoamylalcohol lặp lại 2 lần liên tiếp kết hợp với li tâm đã loại bỏ hết lượng protein và polysaccharide có trong mẫu. Do đó, DNA thu được rất tốt, đảm bảo cho phản ứng PCR xảy ra.

Áp dụng quy trình li trích DNA của Trương Minh Dũng , 2007, chúng tôi tiến hành ly trích 20 mẫu lan thu thập ở tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc để thực hiện phản ứng PCR với marker RAPD. Kết quả định lượng DNA bằng quang phổ kế cho thấy DNA của 20 mẫu được chọn có độ tinh sạch tương đối cao với tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} nằm trong khoảng 1,5 đến 2,2 và lượng DNA có trong mỗi mẫu đều lớn hơn 50 ng/ μ l. Trong 20 mẫu thu được có 60% số mẫu đạt DNA tinh sạch có tỉ lệ $OD_{260nm}/OD_{280nm} > 1,8$ và hàm lượng DNA trung bình ở mỗi mẫu là 220 ng/ μ l.

Những mẫu có tỉ lệ OD và độ tinh sạch không cao như TT và TB (xem bảng 4.1), chúng tôi vẫn có thể chạy PCR đạt kết quả tốt bằng cách xử lý như sau: pha loãng mẫu 2 lần rồi li tâm ở 12000 vòng, trong 5 phút ở 4°C để lắng cặn xuống đáy ống, rồi nhẹ nhàng hút DNA ở khoảng giữa ống để thực hiện phản ứng PCR.

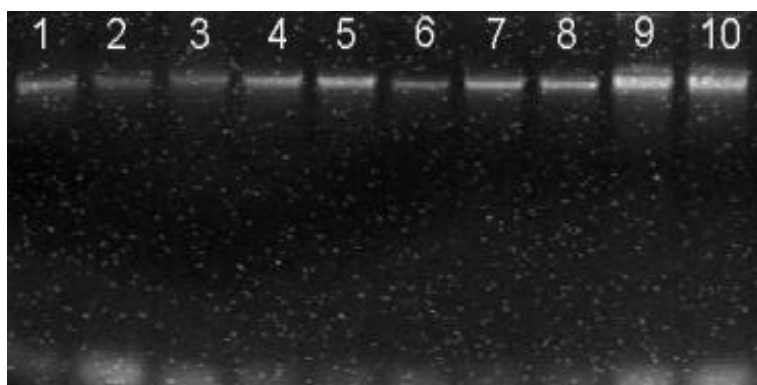
Bước pha loãng mẫu sẽ giúp giảm nồng độ tạp chất còn lẫn trong sản phẩm li trích sau cùng, bước li tâm tiếp theo sẽ giúp thu được DNA tinh sạch với nồng độ thấp ở khoảng giữa ống và không bị lẫn tạp chất đã lắng xuống đáy ống.

Hình 4.1 và Hình 4.2 cho thấy qui trình li trích DNA đạt hiệu quả tốt vì DNA li trích có độ tinh khiết cao, không có hiện tượng DNA bị đứt, gãy (gel bị smear) và lượng tạp bị loại bỏ gần như hoàn toàn.



Hình 4.1 DNA tổng số của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* ở Bảo Lộc

Chú thích: thứ tự các giếng (1 – 10): Kim Điệp, Vẩy Rồng, Long Tu, Giả Hạc, Thủy Tiên, Thủy Tiên Vàng, Thủy Tiên Trắng Vàng, Nhất Điểm Hoàng, Thái Bình, Long Nhân..



Hình 4.2 DNA tổng số của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* ở Bình Phước

Chú thích: thứ tự các giếng (1 – 10): Kim Điệp, Vẩy Rồng, Long Tu, Giả Hạc, Thủy Tiên, Thủy Tiên Vàng, Thủy Tiên Trắng Vàng, Nhất Điểm Hoàng, Thái Bình, Long Nhân..

Bảng 4.1 OD của 20 mẫu dùng để thực hiện phản ứng PCR với marker RAPD

Mẫu	Tỉ lệ OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	Nồng độ DNA (ng/ μ l)
KĐ	1,67800	$8,8309.10^{-2}$	$5,2628.10^{-2}$	360
VR	1,62500	$7,0719.10^{-2}$	$4,3519.10^{-2}$	280
LT	1,74440	$7,8892.10^{-2}$	$4,5226.10^{-2}$	300
GH	1,85770	$2,6543.10^{-2}$	$1,4288.10^{-2}$	115
TT	1,5225	$2,6094.10^{-2}$	$1,7878.10^{-2}$	88
TV	1,65370	0,12571	$7,6017.10^{-2}$	500
TTV	1,65920	$8,9845.10^{-2}$	$5,3966.10^{-2}$	150
NĐH	1,82950	$2,7328.10^{-2}$	$1,4937.10^{-2}$	110
TB	1,58210	$8,5102.10^{-2}$	$5,3812.10^{-2}$	140
LN	1,75520	$2,7552.10^{-2}$	$1,5511.10^{-2}$	360
KĐ1	2,12290	$4,7196.10^{-2}$	$2,2232.10^{-2}$	200
VR1	2,06840	$5,7723.10^{-2}$	$2,7907.10^{-2}$	260
LT1	1,87620	$5,3718.10^{-2}$	$2,8632.10^{-2}$	230
GH1	2,53130	$2,6097.10^{-2}$	$1,0310.10^{-2}$	127
TT1	2,23570	$3,7991.10^{-2}$	$1,6993.10^{-2}$	226
TV1	1,94600	$4,4865.10^{-2}$	$2,3055.10^{-2}$	199
TTV1	1,97590	$9,0024.10^{-2}$	$4,5561.10^{-2}$	400
NĐH1	1,85120	$2,5292.10^{-2}$	$1,3662.10^{-2}$	100
TB1	1,91890	$2,4959.10^{-2}$	$1,3007.10^{-2}$	600
LN1	1,95050	$7,9819.10^{-2}$	$4,0922.10^{-2}$	350

Chú thích: Các mẫu có ký hiệu số “1” ở cuối là các mẫu lan có nguồn gốc từ Bình Phước, các mẫu không có ký hiệu số “1” ở cuối là các mẫu lan có nguồn gốc từ Bảo Lộc.

Trong quá trình ly trích chúng tôi nhận thấy cần khắc phục những vấn đề sau:

- Sau khi cắt và cân mẫu xong, mẫu phải được giữ lạnh ngay trong N₂ lỏng thì chất lượng DNA ly trích được là tốt nhất.

- Dịch trích EB khi bảo quản thường có hiện tượng kết tủa (do có chứa CTAB) ảnh hưởng đến kết quả ly trích. Do đó, cần ủ dung dịch EB ở 65⁰C trong 15 phút trước khi sử dụng.

- Khi nghiền mẫu với N₂ lỏng cần chú ý:

- Nghiền mẫu cho đến khi thành bột mịn, nghiền đều tay, không nghiền quá mạnh để tránh làm đứt gãy DNA.

- Khi nghiền xong phải cho mẫu vào eppendorf ngay để tránh hiện tượng mẫu bị tan chảy ảnh hưởng đến kết quả ly trích.

- Dịch trích EB phải cho vào eppendorf có chứa mẫu ngay khi lấy ra khỏi N₂ lỏng.

- Sau khi thêm phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) vào phải lắc đều và li tâm ngay, nếu để lâu DNA sẽ bị gãy.

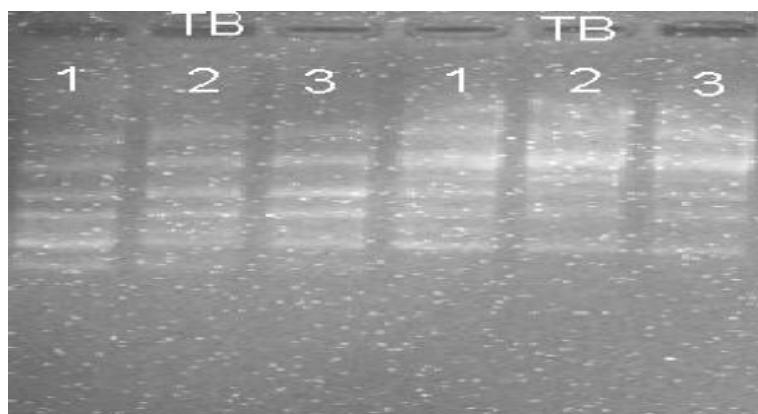
- Khi chuyển lấy dịch trong, cần cẩn thận tránh lấy phạm vào phần tạp phía dưới, nếu không độ tinh sạch sẽ không cao.

- Khi phơi khô cần cần lưu ý, nếu để quá khô sẽ làm hỏng DNA, nếu còn ethanol sẽ ảnh hưởng xấu đến DNA trong quá trình bảo quản và phản ứng PCR.

4.2. Hoàn thiện quy trình PCR với marker RAPD

❖ Ảnh hưởng của số chu kỳ khuếch đại đến sản phẩm RAPD

Hình 4.3 cho thấy sản phẩm RAPD ở cả hai nghiệm thức đều rất mờ cho thấy số chu kỳ khuếch đại không ảnh hưởng nhiều đến sản phẩm RAPD. Nguyên nhân làm cho sản phẩm khuếch đại ít là do thành phần phản ứng RAPD chưa phù hợp. Vì vậy, chúng tôi quyết định giữ nguyên số chu kỳ khuếch đại là 45 chu kỳ và tiến hành tối ưu hóa các thành phần phản ứng RAPD.

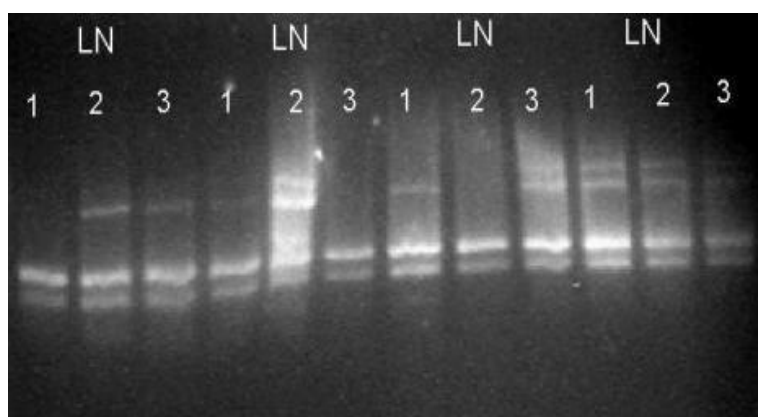


Hình 4.3 Khảo sát ảnh hưởng của số chu kỳ

Chú thích: 1, 2, 3: số lần lặp lại của mỗi nghiệm thức; TB: loài lan Thái Bình (Bảo Lộc).

❖ **Ảnh hưởng của nồng độ primer đến sản phẩm RAPD**

Primers là yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến sự thành công hay thất bại của phản ứng PCR. Hình 4.4 cho thấy, cả bốn nghiệm thức đều cho sản phẩm RAPD, trong đó nghiệm thức 4 cho sản phẩm RAPD với số lượng băng nhiều và rõ nhất. Các nghiệm thức còn lại cho sản phẩm không đồng đều, điều này có thể do thao tác PCR chưa tốt. Theo như kết quả khảo sát, chúng tôi chọn nồng độ primer tối ưu cho phản ứng RAPD là 0,6 μM nhằm đảm bảo hiệu quả về kinh tế.

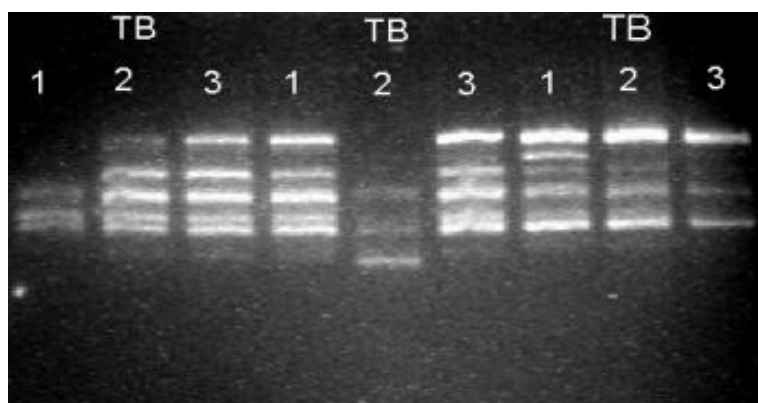


Hình 4.4 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ primer

Chú thích: 1, 2, 3: số lần lặp lại của mỗi nghiệm thức; TB: loài lan Long Nhân (Bảo Lộc).

❖ Ảnh hưởng của nồng độ Mg^{2+} đến sản phẩm RAPD

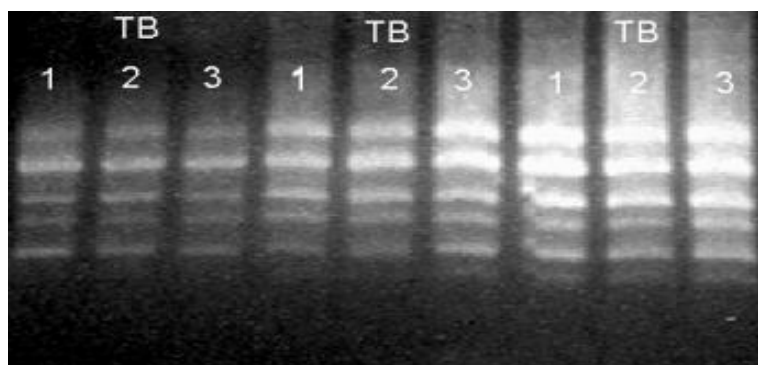
Nồng độ Mg^{2+} cũng là một trong những nhân tố ảnh hưởng mạnh đến phản ứng PCR. Hình 4.5 cho thấy, cả ba nghiệm thức đều cho sản phẩm RAPD, trong đó nghiệm thức 3 cho sản phẩm RAPD với số lượng băng nhiều và rõ nhất. Các nghiệm thức còn lại cho sản phẩm không đồng đều, điều này có thể do thao tác PCR chưa tốt. Vì vậy, chúng tôi chọn nồng độ Mg^{2+} tối ưu cho phản ứng RAPD là 2 mM nhằm đảm bảo hiệu quả kinh tế.



Hình 4.5 Khảo sát ảnh hưởng nồng độ Mg^{2+}

❖ Ảnh hưởng của nồng độ *Taq polymerase* đến sản phẩm RAPD

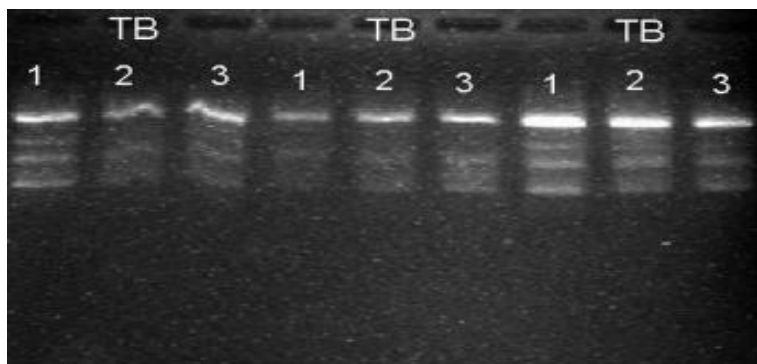
Nồng độ *Taq* quá thấp sẽ không đủ lượng enzyme để xúc tác tạo sản phẩm như mong muốn. Ngược lại, nồng độ *Taq* quá cao sẽ tạo ra những sản phẩm không chuyên tính, gây sai lệch kết quả. Qua kết quả khảo sát, chúng tôi nhận thấy nghiệm thức 1 cho sản phẩm RAPD hơi mờ, trong khi sản phẩm RAPD ở nghiệm thức 3 lại chứa nhiều tạp. Vì vậy, chúng tôi chọn nồng độ *Taq* tối ưu cho phản ứng RAPD là 1U.



Hình 4.6 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ *Taq polymerase*

❖ Ảnh hưởng của nồng độ DNA mẫu đến sản phẩm RAPD

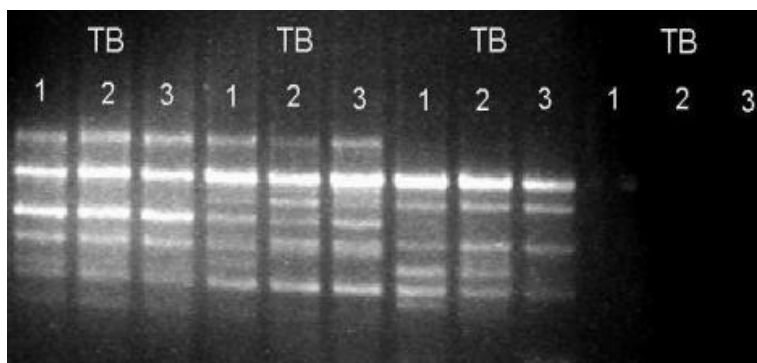
Kết quả khảo sát cho thấy nồng độ DNA mẫu ở 3 nghiệm thức không ảnh hưởng nhiều đến phản ứng RAPD. Chúng tôi nhận thấy nồng độ DNA mẫu 50 ng/μl là tối ưu cho phản ứng RAPD.



Hình 4.7 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ DNA mẫu

❖ Ảnh hưởng của nồng độ dNTPs đến sản phẩm RAPD

Trong phản ứng PCR, mối tương quan giữa nồng độ Mg^{2+} , dNTPs và *Taq* đóng vai trò rất quan trọng. Ở nghiệm thức 3, 4 tương ứng với nồng độ dNTPs là 0,3 mM và 0,4 mM (xem hình 4.8), sản phẩm PCR là rất ít. Đặc biệt, ở nghiệm thức 4 sản phẩm khuếch đại không xuất hiện. Điều này xảy ra là do khi sử dụng dNTPs ở nồng độ cao sẽ làm mất đi một lượng lớn Mg^{2+} tự do mà Mg^{2+} đóng vai trò là cofactor cho *Taq polymerase* hoạt động nên khi *Taq polymerase* hoạt động kém hiệu quả cũng có nghĩa là sản phẩm PCR sẽ giảm đi. Nếu sử dụng dNTPs với nồng độ quá cao thì sẽ không có sản phẩm khuếch đại. Kết quả khảo sát cho thấy nghiệm thức với nồng độ dNTPs là 0,2 mM là tối ưu cho phản ứng RAPD.



Hình 4.8 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dNTPs

Sau khi tối ưu hóa phản ứng PCR với marker RAPD, chúng tôi đưa ra thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng và chương trình nhiệt tối ưu như sau:

Bảng 4.2 Nồng độ tối ưu của các thành phần trong phản ứng PCR

Hóa chất	Nồng độ sử dụng
PCR buffer	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,2 mM
Primer	0,6 μM
<i>Taq</i> polymerase	1U
DNA mẫu	50 ng
H ₂ O	Thêm vừa đủ 25 μl

Bảng 4.3 Chương trình nhiệt tối ưu cho phản ứng PCR

Số chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
1	94	5
45	{ 94 T _a 72	30
		30
		1
1	72	5
Hold 4°C		

4.3. Đánh giá đa dạng di truyền của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc

4.3.1. Sản phẩm PCR với marker RAPD

Để phát hiện sự đa hình của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* đã thu thập, 10 primer được sử dụng trong phản ứng PCR theo quy trình đã tối ưu ở trên. Sản phẩm RAPD của những primer này được quan sát dựa theo kết quả điện di trên gel. Mỗi giếng đại diện cho một loài, mỗi băng hiện diện với một kích thước phân tử xác định bởi vì nó là kết quả của sự tăng bội của một sợi đơn DNA gốc. Các đoạn DNA

có cùng trọng lượng phân tử sẽ di chuyển với cùng khoảng cách trên gel. Sự đa dạng di truyền phân tử được chỉ ra bởi sự khác biệt của các băng DNA hình thành. Chúng tôi nhận thấy, trong số 10 primer sử dụng chỉ có 6 primer cho sản phẩm RAPD (OPAC10, OPB01, S1384, OPB08, U693, OPAH13) trên tất cả các loài lan khảo sát, các primer còn lại hoặc không cho sản phẩm ở tất cả các loài (V20, T3) hoặc chỉ cho sản phẩm ở một hay hai loài (U109, OPAF16).

Cả 6 primer được chọn đều cho sản phẩm khuếch đại tốt, các băng rõ, băng đa hình nhiều. Tổng cộng có 57 băng được tạo ra, trong đó có 55 băng đa hình chiếm tỉ lệ 96,5% và 2 băng đồng hình chiếm tỉ lệ 3,5%. Trung bình có 9,1 băng đa hình/primer. Sản phẩm khuếch đại có kích thước từ 180 – 3000 bp. Dựa vào sự khác biệt giữa các băng thể hiện trên gel điện di ta có thể xác định được sự khác nhau giữa các loài lan về mặt di truyền.

Bảng 4.4 Danh sách các primer được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium*

Primer	Tổng số băng	Số băng đa hình	Kích thước (bp)
OPAC10	14	14	180 – 3000
OPB01	7	7	400 – 1700
OPB08	10	10	300 – 1500
OPAH13	10	9	290 – 1500
S1384	10	10	290 – 1500
U693	6	5	490 – 1000

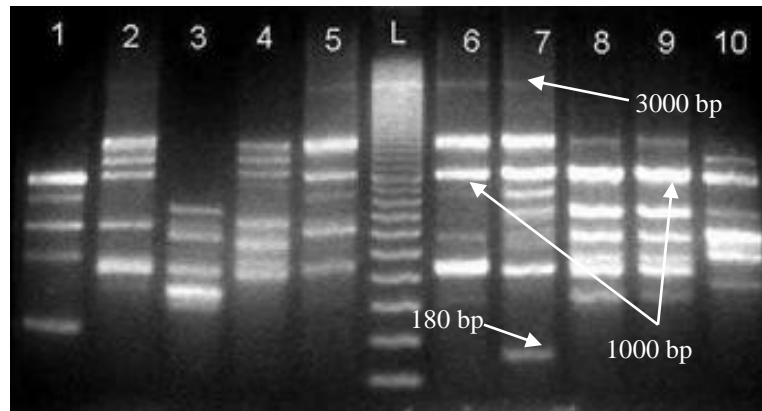
Quan sát kết quả điện di cho thấy ngoài những băng rõ còn có những băng mờ hoặc khó nhận diện. Điều này có thể do đặc điểm di truyền của DNA mẫu làm hạn chế khả năng bắt cặp của primer, làm giảm số lượng sản phẩm PCR. Nguyên nhân khác có thể do thao tác PCR chưa tốt, điều kiện PCR chưa thật sự phù hợp, hóa chất PCR kém chất lượng. Trong trường hợp này để các băng rõ hơn có thể phải thay đổi nhiều yếu tố trong phản ứng PCR và có thể kết quả cũng sẽ mất đi một vài băng đã có. Trong điều kiện khóa luận chúng tôi chưa khảo sát thật sâu vấn đề này

nên kết quả thu được còn một số băng chưa rõ nếu nhìn bằng mắt thường. Một nguyên nhân khác nữa có thể do thời gian nhuộm ethidium bromide ít hay chất lượng ethidium bromide kém.

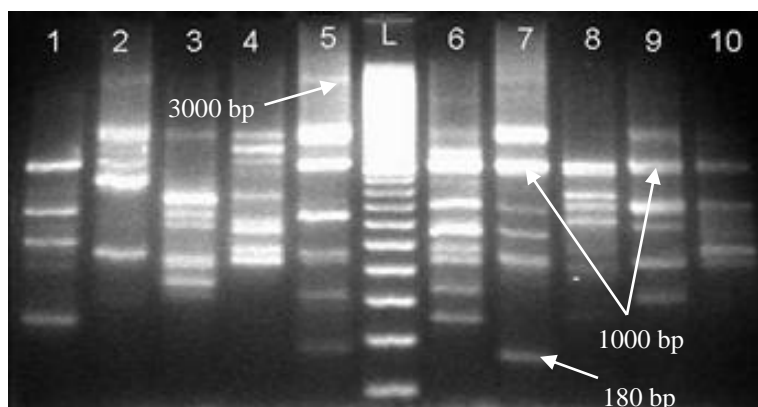
Ngoài ra, còn có một số băng tách không rõ có thể do quá trình điện di các băng có kích thước gần bằng nhau nên việc phân tách của chúng trên gel không thật sự rõ ràng, bên cạnh đó còn có hiện tượng các băng di chuyển không đều, có thể do điện cực của buồng điện di bị cong hay do đổ gel đổ chưa tốt. Những trường hợp này nên thực hiện lại phản ứng PCR hay chạy điện di lại, cho lượng mẫu nhiều hơn và chỉnh sửa máy điện di để thu được kết quả tốt hơn.

❖ Primer OPAC10

Trong số 6 primer cho sản phẩm RAPD thì primer OPAC10 là primer cho sản phẩm trên tất cả các loài lan rừng giống *Dendrobium* khảo sát với số lượng băng nhiều nhất. Sản phẩm khuếch đại được tạo ra đối với primer này là 14 băng, tất cả đều là băng đa hình, không xuất hiện băng đồng hình nào. Băng đa hình xuất hiện với kích thước từ 180 – 3000 bp, trong đó băng đa hình 3000 bp chỉ xuất hiện ở các loài Vảy Rồng, Thủy Tiên, Thủy Tiên Vàng, Thủy Tiên Trắng Vàng và băng đa hình 180 bp chỉ xuất hiện ở loài Thủy Tiên Trắng Vàng (xem hình 4.9). Kết quả trên cho thấy, có sự khác biệt về mặt di truyền giữa các loài lan này (trong phạm vi nghiên cứu này).



(a)



(b)

Hình 4.9 Sản phẩm PCR với primer OPAC10 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc (hình a) và Bình Phước (hình b)

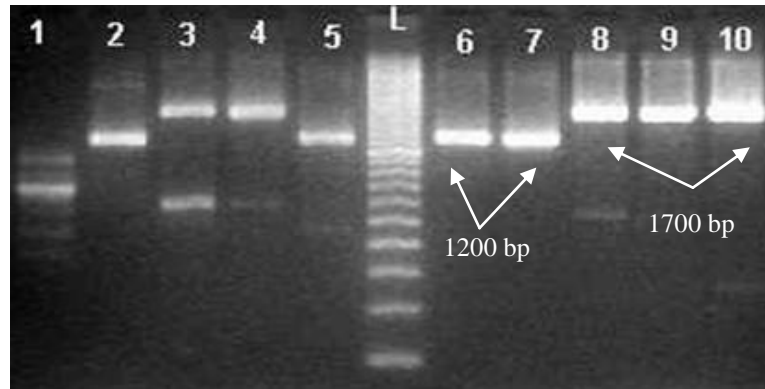
Chú thích: L : thang chuẩn. Thứ tự các giếng (1 – 10): Kim Điệp, Vẫy Rồng, Long Tu, Giả Hạc, Thủy Tiên, Thủy Tiên Vàng, Thủy Tiên Trắng Vàng, Nhất Điểm Hoàng, Thái Bình, Long Nhân.

Trong 20 mẫu lan nghiên cứu thì có 18 mẫu xuất hiện băng đa hình 1000 bp, chiếm tỉ lệ 90% số mẫu khảo sát nhưng băng này không xuất hiện ở loài lan Long Tu (giếng số 3 trên gel) ở cả Bảo Lộc và Bình Phước. Tuy nhiên, băng 1000 bp xuất hiện không đồng nhất, giữa các mẫu còn có sự chênh lệch. Điều này có thể do bản chất trọng lượng phân tử của băng nhưng cũng có thể do quá trình điện di làm sai lệch các băng (điện di không thẳng). Băng 1000 bp có thể là băng đặc biệt để phân biệt giống lan rừng *Dendrobium* với các giống lan khác trong họ *Orchidaceae* (trong phạm vi nghiên cứu này). Do đó, nên tách băng này ra để giải trình tự nhằm giải đáp cho sự chênh lệch đó và phục vụ cho công tác phân biệt, chọn giống.

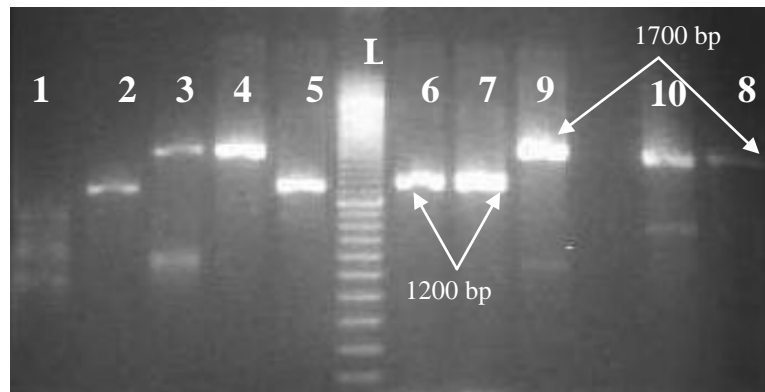
❖ **Primer OPB01**

Hình 4.10 cho thấy sản phẩm khuếch đại được tạo ra bởi primer OPB01 là 7 băng với kích thước từ 400 – 1700 bp. Cả 7 băng đều đa hình. Đây là primer cho số lượng băng thấp nhưng lại có sự phân nhóm rất rõ, trong đó băng đa hình 1700 bp chỉ xuất hiện ở các loài lan Long Tu, Giả Hạc, Nhất Điểm Hoàng, Thái Bình, Long Nhân còn băng đa hình 1200 bp chỉ xuất hiện ở các loài lan Vẫy Rồng, Thủy Tiên, Thủy Tiên Vàng, Thủy Tiên Trắng Vàng (ở cả Bảo Lộc và Bình Phước). Có thể hai

băng đa hình này là chỉ thị đặc trưng cho các loài lan trên. Vì vậy, nên tách băng này ra để giải trình tự nhằm phục vụ cho công tác phân biệt và chọn giống lan.



(a)

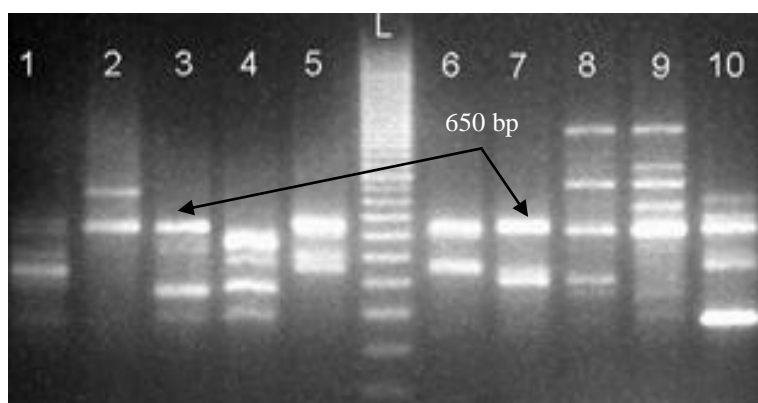


(b)

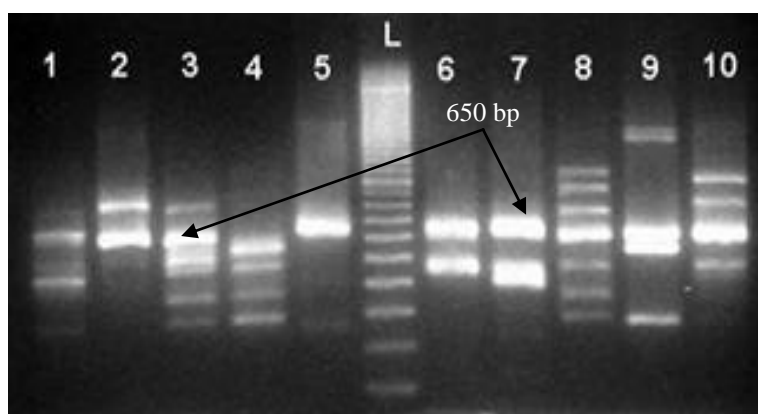
Hình 4.10 Sản phẩm PCR với primer OPB01 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc (hình a) và Bình Phước (hình b)

❖ **Primer S1384**

Quan sát hình 4.11.a và hình 4.11.b chúng tôi nhận thấy, với primer S1384 sản phẩm khuếch đại tạo ra có 10 băng kích thước từ 290 – 1500 bp. Cả 10 băng đều đa hình.



(a)



(b)

Hình 4.11 Sản phẩm PCR với primer S1384 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc (hình a) và Bình Phước (hình b)

Trong 20 mẫu lan nghiên cứu thì có 18 mẫu xuất hiện băng 650 bp, chiếm tỉ lệ 90% số mẫu khảo sát nhưng băng này không xuất hiện ở loài lan Giả Hạc (giống số 4 trên gel) ở cả Bảo Lộc và Bình Phước. Tuy nhiên băng 650 bp xuất hiện không đồng nhất, giữa các mẫu còn có sự chênh lệch. Điều này có thể do bản chất trọng lượng phân tử của băng nhưng cũng có thể do quá trình điện di làm sai lệch các băng (điện di không thẳng). Băng 650 bp có thể là băng đặc biệt để phân biệt giống lan rừng *Dendrobium* với các giống lan khác trong họ *Orchidaceae* (trong phạm vi nghiên cứu này). Do đó, nên tách băng này ra để giải trình tự nhằm giải đáp cho sự chênh lệch đó và phục vụ cho công tác phân biệt, chọn giống lan.

Ngoài ra, primer OPB08 tạo ra 10 sản phẩm đa hình có kích thước từ 300 – 1500 bp, với primer U693 là 5 sản phẩm đa hình có kích thước từ 490 – 1000 bp và

primer OPAH13 tạo ra 9 sản phẩm đa hình có kích thước từ 290 – 1500 bp (xem phụ lục I). Điều này cũng cho thấy sự khác biệt về di truyền giữa các loài lan rừng giống *Dendrobium* khảo sát. Đặc biệt, primer U693 và primer OPAH13 đều tạo ra 1 băng đồng hình có kích thước 350 bp. Băng đồng hình 350 bp xuất hiện ổn định, có thể tiếp tục nghiên cứu để tìm ra mối quan hệ của chúng với các tính trạng có liên quan, đồng thời đây có thể là băng đặc biệt dùng để phân biệt giống lan *Dendrobium* với các giống lan khác thuộc họ *Orchidaceae*.

4.3.2. Phân tích nhóm của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* dựa trên dữ liệu RAPD

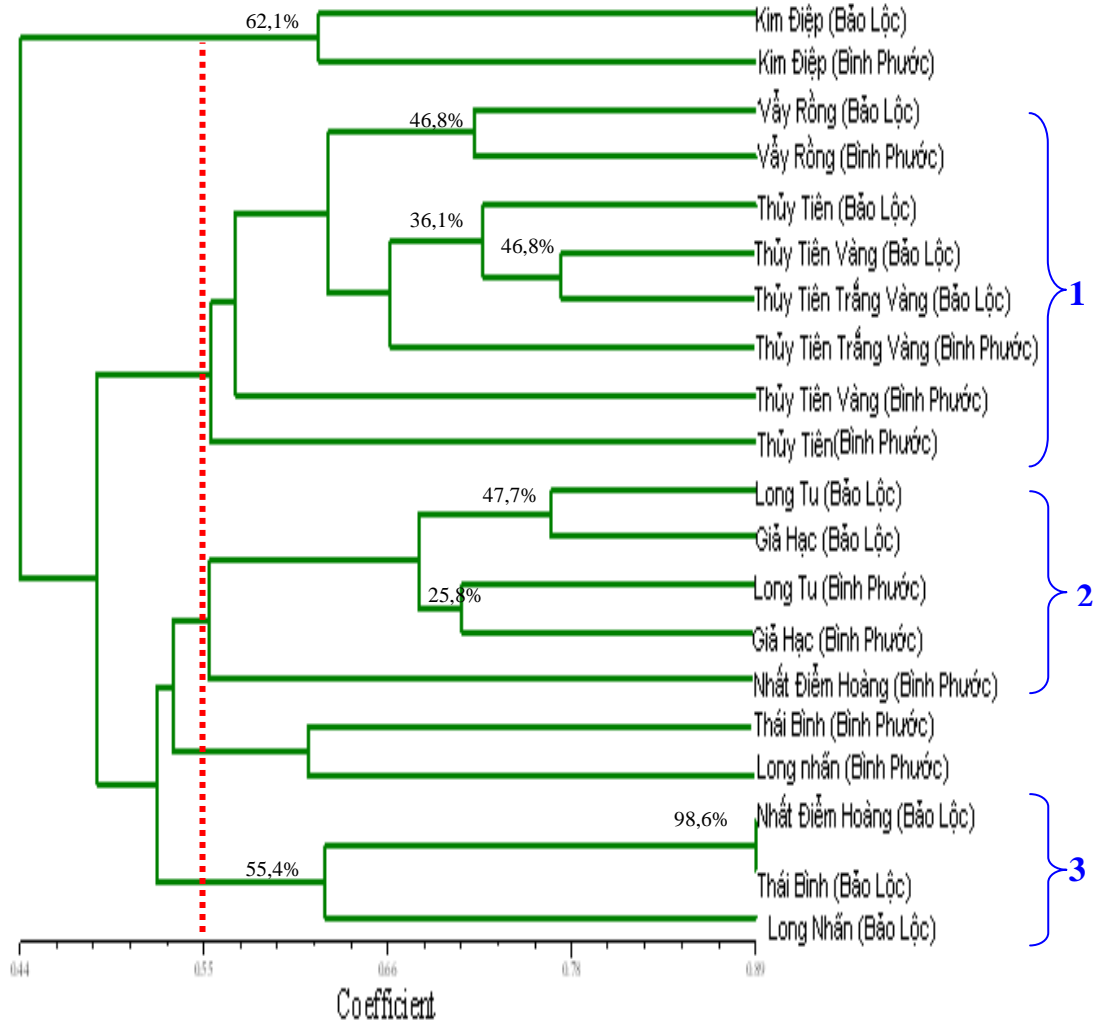
Những dữ liệu thu thập từ việc mã hoá sản phẩm PCR theo quy tắc có băng ghi 1 và không có băng ghi 0 sẽ được dùng để tạo ra ma trận khoảng cách của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* với việc sử dụng chỉ số Dice similarity coefficient, từ đó xây dựng sơ đồ hình cây và sơ đồ phân bố nhóm biểu diễn mối quan hệ về di truyền giữa chúng thông qua phần mềm NTSYSpc 2.1. Bên cạnh đó, để kiểm tra độ tin cậy của việc phân nhóm ở trên, chúng tôi tiến hành phân tích bootstrap với 1000 lần lặp lại bằng cách dùng phần mềm Winboot.

Bảng 4.5 Hệ số tương đồng di truyền của các loài lan rừng giống *Dendrobium* khảo sát

	KĐ1	VR1	LT1	GH1	TT1	TV1	TTV1	NĐH1	TB1	LN1
KĐ1	1.00									
VR1	0.51	1.00								
LT1	0.39	0.47	1.00							
GH1	0.52	0.60	0.71	1.00						
TT1	0.45	0.61	0.42	0.51	1.00					
TV1	0.41	0.55	0.47	0.65	0.50	1.00				
TTV1	0.35	0.55	0.57	0.60	0.50	0.65	1.00			
NĐH1	0.57	0.46	0.62	0.56	0.35	0.41	0.46	1.00		
TB1	0.47	0.51	0.48	0.61	0.57	0.51	0.51	0.47	1.00	
LN1	0.51	0.45	0.33	0.46	0.44	0.50	0.45	0.60	0.61	1.00

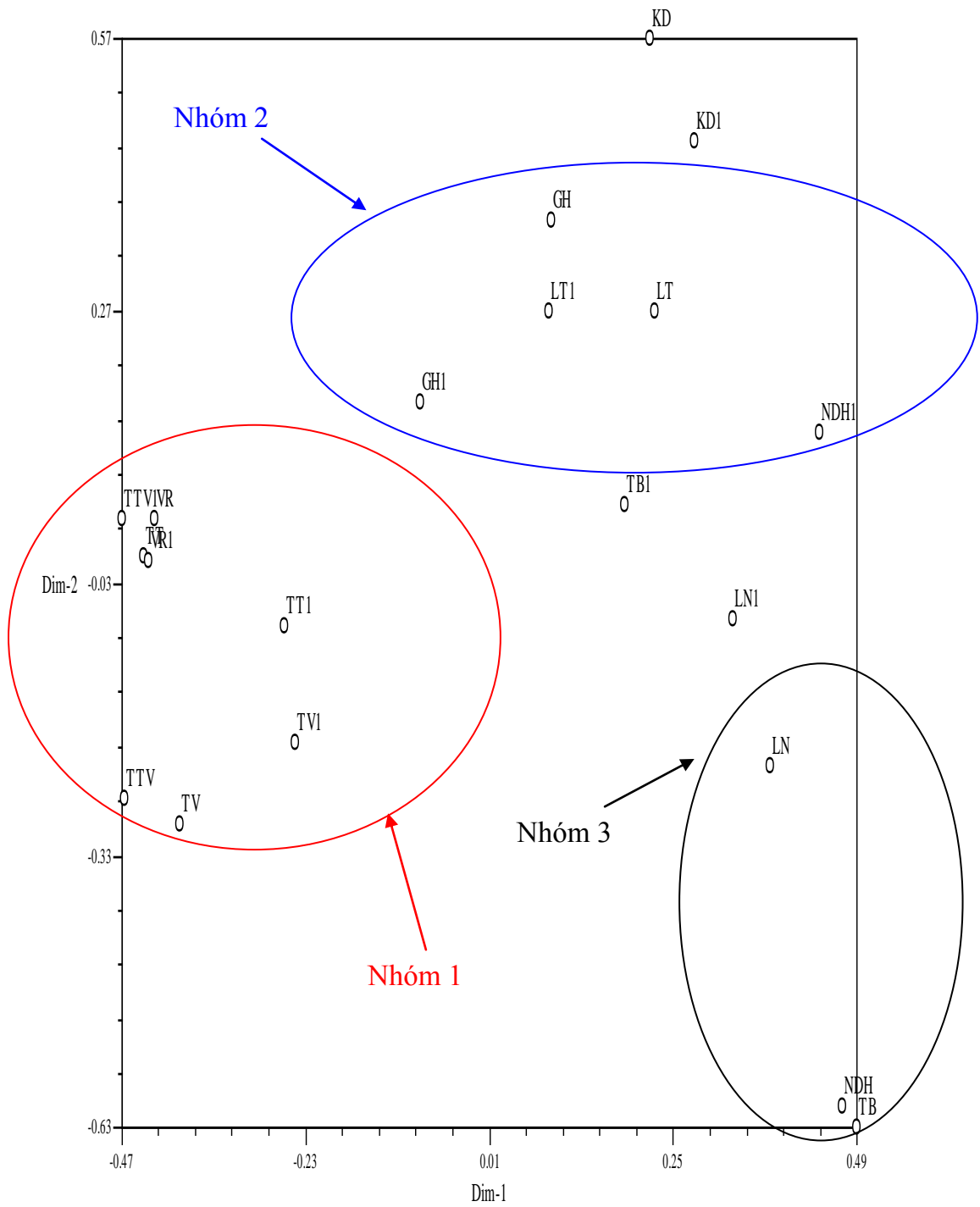
	KĐ	VR	LT	GH	TT	TV	TTV	NDH	TB	LN
KĐ	1.00									
VR	0.44	1.00								
LT	0.50	0.53	1.00							
GH	0.54	0.59	0.76	1.00						
TT	0.54	0.59	0.59	0.64	1.00					
TV	0.45	0.63	0.45	0.51	0.72	1.00				
TTV	0.37	0.63	0.54	0.55	0.72	0.77	1.00			
NDH	0.43	0.41	0.54	0.51	0.51	0.58	0.58	1.00		
TB	0.41	0.43	0.53	0.50	0.50	0.57	0.53	0.89	1.00	
LN	0.39	0.46	0.61	0.53	0.44	0.42	0.42	0.57	0.68	1.00
KĐ1	0.62	0.36	0.48	0.50	0.40	0.34	0.39	0.41	0.39	0.35
VR1	0.39	0.71	0.47	0.53	0.66	0.71	0.66	0.40	0.46	0.40
LT1	0.50	0.48	0.68	0.63	0.51	0.50	0.50	0.50	0.48	0.47
GH1	0.44	0.52	0.66	0.75	0.62	0.57	0.66	0.53	0.52	0.51
TT1	0.33	0.62	0.42	0.48	0.48	0.52	0.63	0.40	0.46	0.38
TV1	0.34	0.41	0.38	0.44	0.62	0.57	0.61	0.48	0.46	0.50
TTV1	0.39	0.56	0.47	0.48	0.66	0.66	0.66	0.40	0.34	0.35
NDH1	0.53	0.33	0.48	0.54	0.37	0.53	0.44	0.57	0.56	0.46
TB1	0.40	0.42	0.68	0.63	0.54	0.48	0.43	0.50	0.56	0.51
LN1	0.39	0.30	0.47	0.53	0.44	0.47	0.42	0.57	0.51	0.40

Kết quả phân tích NTSYS cho thấy mức tương đồng gen cao nhất giữa 2 loài lan Nhất Điểm Hoàng và Thái Bình (0,89) chứng tỏ 2 loài lan này có cùng nguồn gốc (Bảo Lộc) và đứng rất gần nhau trong cây phát sinh loài. Trong khi đó, mức tương đồng gen thấp nhất giữa 2 loài lan Vẫy Rồng và Long Nhãn 1 (0,30) chứng tỏ hai loài lan này không cùng nguồn gốc và đứng rất xa nhau trong cây phát sinh loài (bảng 4.5).



Hình 4.12 Cây phân nhóm di truyền giữa 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* thu thập tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc

Sơ đồ cây phát sinh loài hình 4.12 cho thấy nếu xét mức độ tương đồng di truyền của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* ở 0,55 thì sẽ chia thành ba nhóm với mức độ tương đồng di truyền biến thiên trong khoảng từ 0,55 – 0,66. Ba nhóm này bao gồm hai nhóm chính (nhóm 1 và 2) và một nhóm phụ (nhóm 3). Ngoài ra, các loài lan Vẩy Rồng (Bảo Lộc), Vẩy Rồng (Bình Phước), Thái Bình (Bình Phước) và Long Nhãn (Bình Phước) không phân nhóm mà chúng nằm rải rác trên cây phát sinh loài. Điều này cho thấy các loài lan rừng giống *Dendrobium* khảo sát có sự đa dạng cao về mặt di truyền. Việc phân nhóm như vậy hoàn toàn phù hợp với đồ thị phân bố nhóm ở hình 4.13.



Hình 4.13 Đồ thị phân bố nhóm dựa trên dữ liệu RAPD

Hình 4.12 cho thấy loài lan Kim Điệp (Bảo Lộc) và Kim Điệp (Bình Phước) nằm cùng một nhánh trên cây phát sinh loài chứng tỏ sự khác nhau về địa lý không ảnh hưởng nhiều đến kiểu gen của loài lan này. Tuy nhiên, do có mức độ tương đồng di truyền khá thấp (0,62) nên giữa chúng vẫn có sự khác biệt nhất định về di truyền, chứng tỏ sự đa dạng về nguồn gen đã xảy ra trong cùng một loài (trong phạm vi nghiên cứu này). Kết quả phân tích bootstrap cho thấy mức độ liên kết giữa chúng trên cây phát sinh loài là 62,1% (xem hình 4.12), chứng tỏ kết quả phân nhóm của loài lan này là đáng tin cậy. Trong khi đó, hai loài lan Thái Bình (Bình Phước) và Long Nhãn (Bình Phước) mặc dù khác loài nhưng chúng lại nằm cùng nhánh trên cây phát sinh với mức độ tương đồng di truyền là 0,61. Đây có thể là kết quả của một hay nhiều đột biến xảy ra giữa hai loài lan này làm cho chúng trở nên gần nhau về di truyền. Bên cạnh đó, hai loài lan Thái Bình (Bảo Lộc) và Long Nhãn (Bảo Lộc) mặc dù đứng khác nhánh nhưng lại nằm chung nhóm 3 trên cây phát sinh với mức độ tương đồng di truyền là 0,68 (xem bảng 4.5) nghĩa là giữa chúng có sự giống nhau về di truyền. Như vậy, qua phân tích kết quả trên, chúng tôi nhận thấy sự khác biệt về vùng địa lý đã ảnh hưởng lớn đến kiểu gen của hai loài lan Thái Bình và Long Nhãn, nghĩa là giữa chúng có sự đa dạng lớn về nguồn gen khi đem trồng ở những vùng khác nhau. Vì vậy, phải tiếp tục nghiên cứu sự giống nhau và khác nhau giữa hai loài lan này nhằm xác định được các tính trạng có tốt phục vụ cho công tác chọn, tạo giống lan.

Nhóm một gồm các loài lan thuộc nhóm *Callista*. Trong đó, loài lan Thủy Tiên (Bình Phước) có sự khác biệt về di truyền so với các loài lan còn lại trong nhóm có mức độ tương đồng di truyền thấp (0,55). Hình 4.12 cho thấy loài lan Vảy Rồng (Bảo Lộc) và Vảy Rồng (Bình Phước) nằm chung một nhánh trên cây phát sinh loài với mức tương đồng di truyền cao (0,72) nghĩa là sự khác nhau về vùng địa lý không ảnh hưởng đến kiểu gen của loài lan này. Ngoài ra, các loài lan còn lại trong nhóm một gồm Thủy Tiên (Bảo Lộc), Thủy Tiên (Bình Phước), Thủy Tiên Vàng (Bảo Lộc), Thủy Tiên Vàng (Bình Phước), Thủy Tiên Trắng Vàng (Bảo Lộc) và Thủy Tiên Trắng Vàng (Bình Phước) đều nằm khác nhánh nhau trên cây phát

sinh với mức tương đồng gen giữa chúng khá thấp (xem bảng 4.5) chứng tỏ nguồn gen có sự đa dạng.

Kết quả phân tích bootstrap cho thấy, mức độ liên kết giữa các loài lan trong nhóm một là rất thấp (xem hình 4.12). Điều này xảy ra là do số lượng primer nghiên cứu ít (6 primer) nên số băng tạo ra không đủ để gia tăng mức độ tin cậy.

Qua phân tích nhóm một, chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt lớn về di truyền giữa các loài lan có cùng nguồn gốc và cùng loài, chứng tỏ các loài lan nhóm một có sự đa dạng lớn về nguồn gen. Đây sẽ là yếu tố quan trọng góp phần vào công tác chọn giống nhằm hạn chế việc chọn những giống ít có sự khác biệt di truyền.

Nhóm hai gồm có các loài lan thuộc nhóm *Dendrobium* trong đó loài Nhất Điểm Hoàng (Bình Phước) có sự khác biệt di truyền cao với các loài lan còn lại trong nhóm với hệ số tương đồng thấp (khoảng 0,56). Nhóm hai còn cho thấy sự gần nhau về di truyền giữa loài lan Long Tu (Bảo Lộc) và Giả Hạc (Bảo Lộc); Long Tu (Bình Phước) và Giả Hạc (Bình Phước) mặc dù chúng khác loài nhau, với mức tương đồng gen lần lượt là 0,76 và 0,71 nghĩa là nguồn gen có sự đa dạng.

Nhóm ba gồm các loài lan có nguồn gốc từ Bảo Lộc: Nhất Điểm Hoàng, Thái Bình, Long Nhãn, trong đó hệ số tương đồng gen giữa Nhất Điểm Hoàng và Thái Bình là rất cao (0,89) chứng tỏ chúng rất gần nhau về di truyền. Trong khi đó hệ số tương đồng gen giữa hai loài lan này ở Bình Phước là rất thấp (0,47). Điều này có thể là do sự đột biến đã xảy ra dẫn đến sự khác nhau về di truyền giữa hai loài lan này. Tuy nhiên, do số lượng primer nghiên cứu ít nên vẫn chưa xác định được mức độ tin cậy của nhận định trên, bên cạnh đó việc lấy mẫu cá thể cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phân tích.

Tóm lại, với 6 marker RAPD sử dụng, 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* thu thập tại tỉnh Bình Phước và thị xã Bảo Lộc được phân thành 3 nhóm với khoảng cách di truyền giữa các loài lan có sự dao động lớn chứng tỏ có sự đa dạng cao về mặt di truyền. Qua phân nhóm, các loài lan thuộc các nhóm khác nhau có thể được sử dụng để làm vật liệu lai tạo trong chọn giống, cụ thể các loài lan thuộc nhóm 1,

2, có thể lai tạo với các loài lan nhóm 3 sẽ tạo ra những quần thể đa dạng về nguồn gen bởi vì những nhóm có khoảng cách di truyền càng xa nhau thì khả năng tạo ra con lai có nhiều tính trạng càng cao.

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Từ những kết quả thu được, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

– Tối ưu hóa thành công các thành phần của phản ứng PCR với marker RAPD: Số chu kỳ nhiệt thích hợp nhất cho phản ứng PCR là 45 chu kỳ; nồng độ primer: 0,6 μM ; nồng độ Mg^{2+} : 2 mM; nồng độ *Taq*: 1U; nồng độ DNA mẫu: 50 ng/ μl ; nồng độ dNTPs: 0,2 mM.

– Trong tổng số 10 primer tiến hành nghiên cứu đa dạng di truyền thì có 6 primer (OPAC10, OPB01, S1384, OPB08, U693, OPAH13) cho sản phẩm khuếch đại trên tất cả các loài lan rừng giống *Dendrobium* khảo sát. Tổng cộng có 57 băng được tạo ra, trong đó có 55 băng đa hình chiếm tỉ lệ 96,5% và 2 băng đồng hình chiếm tỉ lệ 3,5%. Trung bình có 9,1 băng đa hình/primer. Sản phẩm khuếch đại có kích thước từ 180 – 3000 bp.

– Với 6 marker RAPD sử dụng, nếu xét mức độ tương đồng di truyền của 10 loài lan rừng giống *Dendrobium* ở 0,55 thì sẽ chia thành ba nhóm với mức độ tương đồng di truyền biến thiên trong khoảng từ 0,55 – 0,66. Ba nhóm này bao gồm hai nhóm chính (nhóm 1 và 2) và một nhóm phụ (nhóm 3). Ngoài ra, các loài lan Vẫy Rồng (Bảo Lộc), Vẫy Rồng (Bình Phước), Thái Bình (Bình Phước) và Long Nhân (Bình Phước) không phân nhóm mà chúng nằm rải rác trên cây phát sinh loài. Điều này cho thấy các loài lan rừng giống *Dendrobium* khảo sát có sự đa dạng cao về mặt di truyền.

5.2. Đề nghị

– Tiếp tục khảo sát thêm nhiều primer và nhiều mẫu hơn nữa để có được kết quả chính xác hơn, tạo cơ sở cho việc xây dựng hoàn chỉnh sơ đồ cây phát sinh loài đối với giống lan *Dendrobium*.

– Tiếp tục ứng dụng marker RAPD trên nhiều giống lan khác để nghiên cứu sự đa dạng di truyền và nhận diện giống.

- Kết hợp phân nhóm di truyền dựa vào kết quả RAPD với việc phân nhóm di truyền dựa các cơ sở khác như: kiểu hình, SSR, AFLP để có những nhận định chính xác và độ tin cậy cao hơn trong công tác tuyển chọn và lai tạo giống mới.
- Xây dựng các định hướng về kiểm tra, quản lý và bảo vệ nguồn gen các giống lan sẵn có trong nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 1999. *Di truyền phân tử*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Tp. Hồ Chí Minh.
2. Dương Ngọc Bích Quyên, 2000. *Khảo sát các yếu tố môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự nhân giống invitro cây lan Cymbidium*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông Học, Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
3. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản giáo dục.
4. Huỳnh Chấn Khôn, 2006. *Nghiên cứu đa dạng di truyền cây tiêu (Piper nigrum L.) tại thị xã Bà Rịa thuộc tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu bằng kỹ thuật RAPD*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công Nghệ Sinh Học, Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
5. Lê Thị Thanh Tuyên, 2005. *Nghiên cứu đa dạng nguồn gen dưa Cayenne bằng marker phân tử*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công Nghệ Sinh Học, Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
6. Lê Trọng Cúc, 2002. *Đa dạng sinh học và bảo tồn thiên nhiên*. Nhà xuất bản ĐHQG Hà Nội.
7. Lưu Chấn Long, 2002. *Trồng Và thương thức lan nghệ thuật*. Nhà xuất bản Đà Nẵng.
8. Nguyễn Nghĩa Thìn, 2005. *Đa dạng sinh học và tài nguyên di truyền thực vật*. Nhà xuất bản ĐHQG Hà Nội.
9. Nguyễn Thị Hồng Nhật, 2004. *Nhân giống invitro cây lan Dendrobium bằng phương pháp nuôi cấy chồi đơn và giả hành*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông Học, Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
10. Nguyễn Thị Phương Dung, 2005. *Xây dựng phương pháp nhận diện và phân tích tính đa dạng di truyền của 21 dòng Cacao (Theobroma Cacao L.) bằng kỹ thuật Microsatellite*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công Nghệ Sinh Học, Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
11. Nguyễn Thị Lang, 2002. *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Tp. Hồ Chí Minh.

12. Phạm Hoàng Hộ, 1990. *Cây cỏ Việt Nam*. Nhà xuất bản trẻ Tp. Hồ Chí Minh.
13. Trần Hợp, 1993. *Phong lan có hương thơm*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
14. Trần Quang Hoàng, 2005. *Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nuôi cấy invitro của hai giống lan Dendrobium và Cymbidium*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công Nghệ Sinh Học, Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
15. Trần Văn Bảo, 2002. *Kỹ thuật nuôi trồng phong lan*. Nhà xuất bản trẻ.

TIẾNG NƯỚC NGOÀI

16. Averyanov L. V., 2004. *Biogeography of orchids in Eastern Indochina*. VNU. Journal of Science, Nat., Sci., and Tech., T.XX, No 4.
17. Chen T. C., Lin T. J., Kuo Y. L., and Wu W. L., 2003. *Genetic fingerprinting of orchids by molecular markers*. The Eighteenth Joint Annual Conference of Biomedical Sciences. 22-23 March, 2003. Taipei, Taiwan. Abstract book: 89.
18. Dan Thai Vo, 2006. *Revealing genetic diversity in tea grown in Vietnam by using simple sequence repeat (SSR) makers*. Doctoral thesis.
19. DING Xiao-yu, XU Luo-san, WANG Zhen-tao, et al, 2002. *Molecular authentication of Dendrobium chrysanthum from its allied species of Dendrobium[J]*. China J Chin Mater Med, 27(6):407-411.
20. Ge Ding, Xiao-Yu Ding, Jie shen, Feng Tang, Dong-Yang Liu, Jia He, Xue-Xia Li, Bi-Hai Chu, 2005. *Genetic diversity and molecular authentication of wild population of Dendrobium officinate by RAPD*. 40:1028-32
21. Hugh G. Griffin., and Annette M. Griffin., 2000. *PCR Technology Current Innovations*. The Cromwell press, UK.
22. James Rohlf F., 2000. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Department of Ecology and Evolution State University of New York.
23. McPherson M. J., and Moller S. G., 2000. *PCR*. The Cromwell press, UK.

24. Yue G. H., Lam-Chan L. T., and Hong Y., 2006. *Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of Dendrobium varieties. Molecular Ecology Notes.*

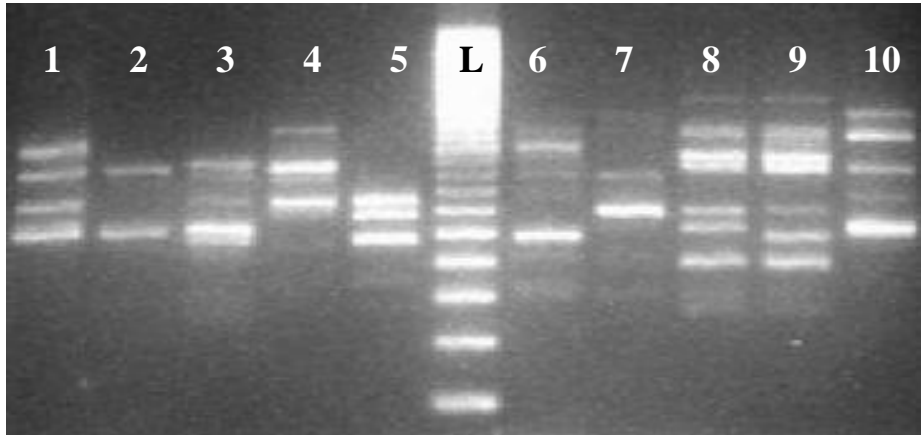
CÁC TRANG WEB

25. <http://www.biorad.com>
26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
27. <http://www.promega.com>

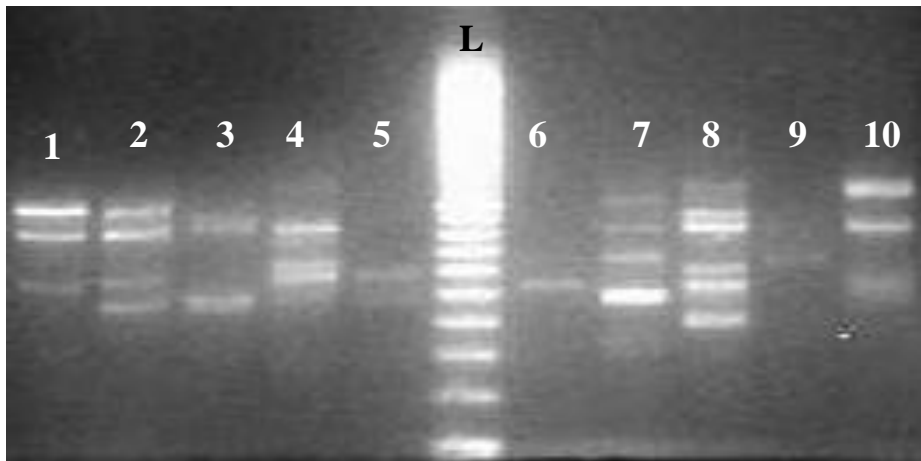
PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Sản phẩm PCR với marker RAPD

❖ Primer OPB08



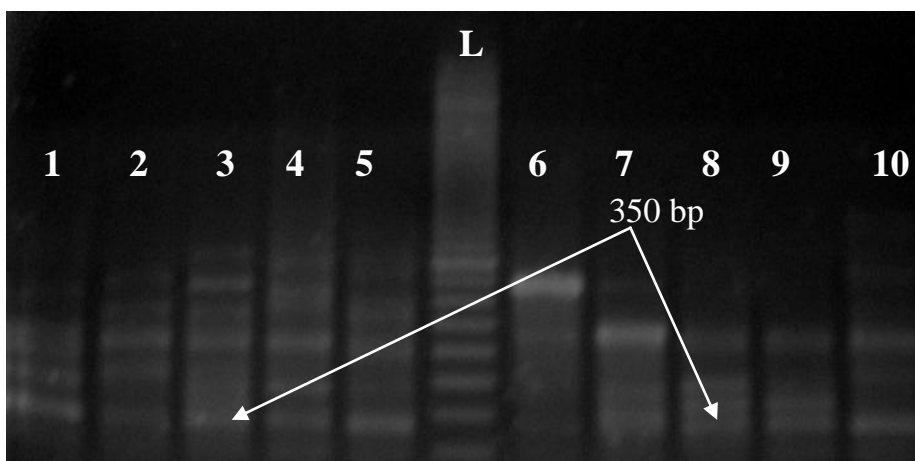
(a)



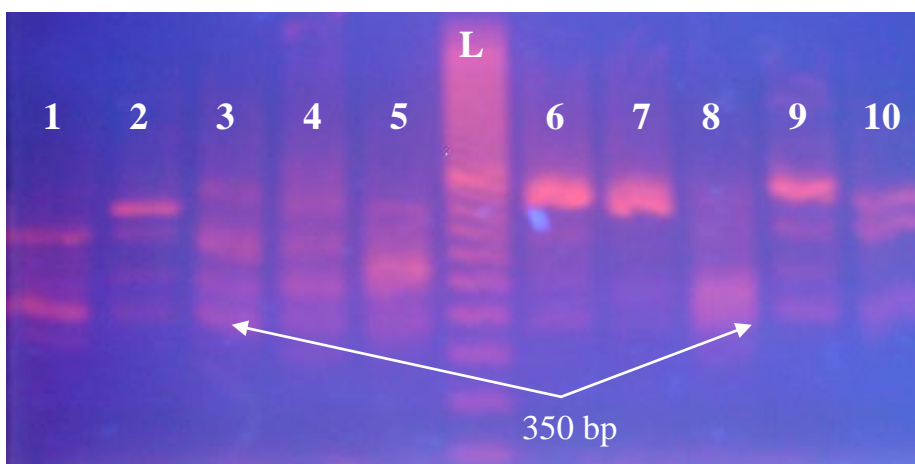
(b)

Sản phẩm PCR với primer OPB08 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc (hình a) và Bình Phước (hình b)

❖ **Primer U693**



(a)

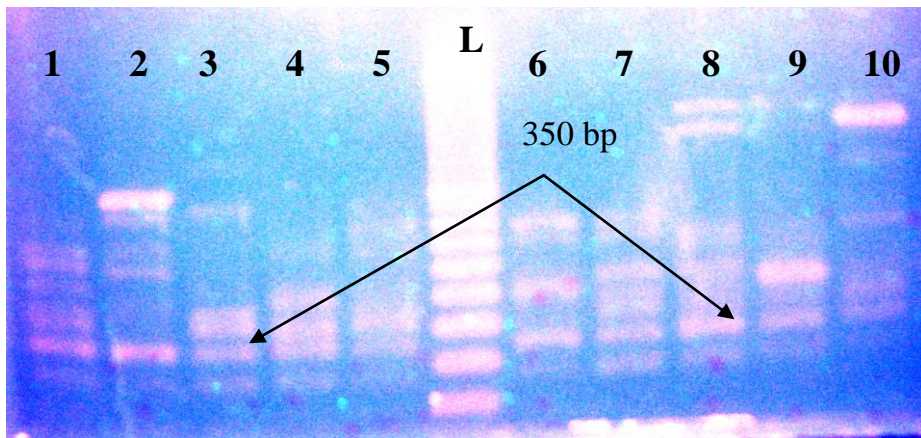


(b)

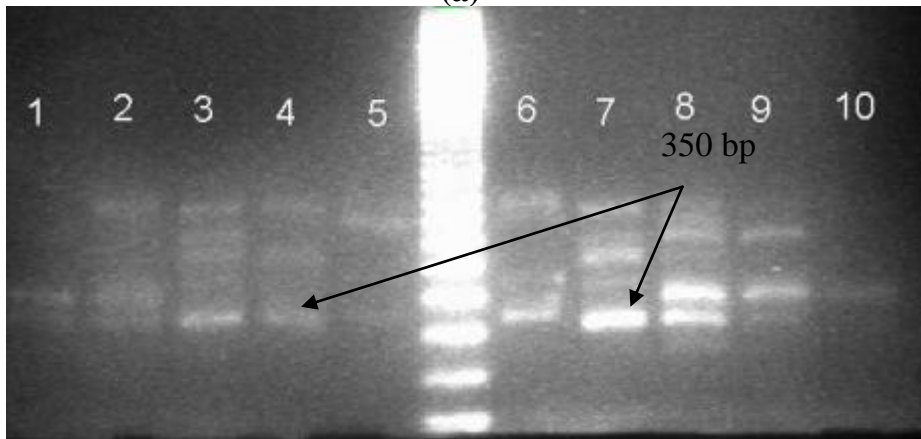
**Sản phẩm PCR với primer U693 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc
(hình a) và Bình Phước (hình b)**

Chú thích: hình b chụp bằng máy kỹ thuật số.

❖ **Primer OPAH13**



(a)



(b)

Sản phẩm PCR với primer OPAH13 của 10 mẫu lan thu thập ở Bảo Lộc (hình a) và Bình Phước (hình b)

Chú thích: hình a chụp bằng máy kỹ thuật số.

Phụ lục 2: Bảng mã hóa số liệu kết quả RAPD

❖ Primer OPAC10

kích thước (bp) Mẫu	3000	1400	1200	1000	900	750	700	650	600	500	450	350	250	180
	KĐ	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
VR	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
LT	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
GH	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
TT	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
TV	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
TTV	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
NĐH	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
TB	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LN	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
KĐ1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
VR1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
LT1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
GH1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
TT1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
TV1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
TTV1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
NĐH1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
TB1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
LN1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0

❖ **Primer S1384**

kích thước (bp) Mẫu	1500	1100	1000	900	800	650	550	450	400	290
	KĐ	0	0	0	1	0	1	1	1	0
VR	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
LT	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
GH	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
TT	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
TV	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
TTV	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
NĐH	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
TB	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
LN	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
KĐ1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
VR1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
LT1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
GH1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
TT1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
TV1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
TTV1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
NĐH1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
TB1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
LN1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0

❖ **Primer OPB08**

kích thước (bp) Mẫu	1500	1300	1200	1000	900	650	600	500	400	300
KĐ	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
VR	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LT	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
GH	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
TT	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
TV	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
TTV	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
NDH	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
TB	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
LN	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
KĐ1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
VR1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
LT1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
GH1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
TT1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TV1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TTV1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
NDH1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
TB1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
LN1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0

❖ **Primer OPB01**

kích thước (bp) Mẫu	1700	1200	1000	800	600	500	400
	KĐ	0	0	1	1	1	1
VR	0	1	0	0	0	0	0
LT	1	0	0	0	1	0	0
GH	1	0	0	0	1	0	0
TT	0	1	0	0	0	1	0
TV	0	1	0	0	0	0	0
TTV	0	1	0	0	0	0	0
NĐH	1	0	0	0	1	0	0
TB	1	0	0	0	0	0	0
LN	1	0	0	0	0	0	0
KĐ1	0	0	1	1	1	1	0
VR1	0	1	0	0	0	0	0
LT1	1	0	0	0	1	0	0
GH1	1	0	0	0	0	0	0
TT1	0	1	1	0	0	0	0
TV1	0	1	0	0	0	0	0
TTV1	0	1	0	0	0	0	0
NĐH1	1	0	0	0	1	0	0
TB1	1	0	0	0	0	0	0
LN1	1	0	1	0	1	0	0

❖ **Primer U693**

kích thước (bp) Mẫu	1000	900	750	650	490	350
	KĐ	0	0	0	1	1
VR	0	1	1	1	1	1
LT	1	1	1	1	1	1
GH	1	1	1	1	1	1
TT	1	0	1	1	1	1
TV	0	1	0	1	0	1
TTV	0	1	0	1	1	1
NĐH	0	0	0	1	1	1
TB	0	0	0	1	1	1
LN	1	0	0	1	1	1
KĐ1	0	0	1	1	0	1
VR1	0	1	1	1	0	1
LT1	0	0	1	1	0	1
GH1	0	1	1	1	0	1
TT1	0	1	0	1	0	1
TV1	1	0	0	0	0	1
TTV1	1	0	0	0	0	1
NĐH1	0	0	0	1	0	1
TB1	1	1	0	1	0	1
LN1	1	1	0	0	0	1

❖ **Primer OPAH13**

kích thước (bp) Mẫu	1500	1400	1300	900	800	600	500	400	350	290
KĐ	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
VR	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
LT	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
GH	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
TT	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
TV	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
TTV	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
NĐH	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
TB	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LN	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
KĐ1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
VR1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
LT1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
GH1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
TT1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TV1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
TTV1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
NĐH1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
TB1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
LN1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0