

ĐA DẠNG SINH HỌC CỦA GIỐNG CÂY CÓ MÙI Ở HUYỆN GÒ QUAO, TỈNH KIÊN GIANG

Nguyễn Hữu Hiệp¹, Trần Nhân Dũng¹,
Đặng Thanh Sơn² và Nguyễn Văn Được³

ABSTRACT

Citrus cultivars grown at Go Quao district, Kiên Giang province were collected for the study of genetical diversity based on phenotypes characteristics and RAPD technique.

Based on phenotypes characteristics, citrus cultivars were divided into 5 groups, pomelo, lemon, orange, tangerine and kim quat.

Four arbitrary primers used in RAPD technique gave good results in all of the citrus cultivars tested. The phylogenetic tree showed that citrus cultivars of Go Quao, Kien Giang were divided into 4 groups, pomelo, orange-tangerine, lemon and kim quat. The genetical distance of these cultivars varied from 0 to 43%. Among 49 markers used, 11 markers were present in all cultivars. 26 markers were present in more than 90% of the cultivars. 4 markers were present in more than 80% of the cultivars. 2 markers were present in more than 70% and 6 markers were present in less than 70% of the cultivars. 1 marker was only present at the frequency of less than 45% of the cultivars.

The results of the detection of greening pathogen showed that the ratio of this disease in tangerine, orange, pomelo and lemon were at the rate of 50%, 25,4%, 9,6% and 1,14%, respectively. Especially, no greening pathogen was found in kim quat cultivar.

Key words: *citrus, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), primer, biodiversity, greening disease, marker*

Title: *Biodiversity of citrus cultivated at Go Quao district, Kien Giang province, Viet nam*

TÓM TẮT

Cây có múi trồng tại Gò Quao Kiên Giang được thu thập để phân loại dựa vào hình thái học và bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

Các đặc điểm về hình thái học cho thấy cây có múi tại Gò Quao, Kiên Giang chia làm 5 nhóm bao gồm: bưởi, cam, quít, chanh và hạnh

Sử dụng 4 mồi (primer) là A-02, A-04, A-11 và A-13 trong phân tích đa dạng di truyền bằng phương pháp RAPD cho kết quả 49 dấu phân tử (marker) được ghi nhận. Giản đồ phả hệ cho thấy cây có múi của Gò Quao, Kiên Giang chia thành 4 nhóm: bưởi, cam-quít, chanh và hạnh. Kết quả phân tích cho thấy khoảng cách di truyền giữa các nhóm biến động từ 0-43%. Trong 49 dấu phân tử có 11 dấu xuất hiện ở 100% số cá thể, 26 dấu trên 90%, 4 dấu trên 80%, 2 dấu trên 70% và 6 dấu dưới 70%. Trong đó, thấp nhất có 1 dấu là 45%. Ngoài ra, kiểm tra bệnh vàng lá gân xanh bằng PCR cho kết quả tỉ lệ nhiễm bệnh của cây có múi ở Gò Quao, Kiên Giang là Quít : 50%, cam 25,4%, bưởi 9,6%, chanh 1,14%. Đặc biệt, không thấy dấu hiệu bệnh vàng lá gân xanh ở hạnh.

Từ khóa: *cây có múi, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), mồi (primer), đa dạng di truyền, bệnh vàng lá gân xanh, dấu phân tử (marker)*

¹ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ

² Trung tâm Xúc tiến Thương mại, Kiên Giang

³ Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường, Kiên Giang

1 GIỚI THIỆU

Cây ăn quả có múi là cây ăn quả có giá trị quan trọng ở Việt Nam, sản lượng 301.308 tấn năm 1994. Diện tích canh tác cây có múi ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) chiếm 68% tổng diện tích cây có múi của cả nước, và chiếm 79,4% sản lượng của Việt Nam (Nhà xuất bản Thống kê, 1996; Lê Thị Thu Hồng, 1996). Tại Kiên Giang hiện nay diện tích cây có múi toàn tỉnh là 1447 ha, riêng tại Huyện Gò Quao, Tỉnh Kiên Giang diện tích cam quýt năm 2000 là 1.022 ha với sản lượng là 5.110 tấn.

Cây cam quýt (*Citrus*) phân bố rộng từ Ấn Độ và Nam Trung Quốc đến Bắc Úc Châu và Tân Caledonia. Tại đây có thể tìm thấy cây cam quýt ở tình trạng hoang dại *Citrus indicata* Tanaka và *Citrus halimii* B.C. Ở Malaysia và Indonesia có nhóm "Papada" đặc biệt là loài *Citrus macroptera*. Ở quần đảo Bornéo có quần thể *Citrus maxima*. Việt Nam, Đông Nam Á và Trung Quốc là vùng trồng cam quýt đầu tiên trên trái đất, khoảng 2200 năm trước công nguyên. Sau đó chúng mới được di chuyển sang Địa Trung Hải và sang Châu Mỹ (Verheij và cộng tác viên (ctv), 1991).

Các loài cây có múi thuộc 2 giống *Citrus*, và *Fortunella* họ Rutaceae và những cây lai của 2 giống trên như *Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands (hạnh) hoặc các cây chưa được định danh rõ rệt như tangelo (quýt x bưởi), orangelo (quýt x cam ngọt) v.v. Ở ĐBSCL cây có múi thông dụng thuộc giống *Citrus* gồm: *Citrus grandis* (L.) Osb. var. *grandis* (Bưởi), *Citrus sinensis* (L.) Osb. (Cam), *Citrus deliciosa* Ten (Quýt xiêm), *Citrus nobilis* Lour. var. *nobilis* (Cam sành), *Citrus nobilis* var. *microcarpa* Hassk (Sảnh), *Citrus aurantiifolia* (Chritm.) Sw. (Chanh), *Citrus hystrix* DC. (Trúc), *Citrus medica* var. *sarcodactylis* (Sieb.) Sw. (Phật thủ), v. v... (Phạm Hoàng Hộ, 1992).

Tập đoàn cây có múi ở Kiên Giang và ĐBSCL rất phong phú và đa dạng. Nhưng kiến thức về tập đoàn giống này còn ít. Công tác phân loại cây có múi chưa được nghiên cứu kỹ. Người dân thường sử dụng tên thông dụng như: cam mật, cam dây, cam sành, sành, cam soàn, quýt xiêm, quýt đường, quýt ta, quýt tiêu, quýt tàu, quýt hồng, bưởi năm roi, bưởi thanh trà, bưởi đường, bưởi Biên hòa, chanh ta, chanh tàu, chanh giấy, chanh nùm v.v.. (Lê Thanh Phong và ctv., (1996). Ngoài các giống địa phương, có khoảng 20 giống cam quýt du nhập từ Pháp, Tây Ban Nha, Mỹ để làm gốc ghép hoặc lai tạo. Có giống cây có múi khác nhau nhưng mang cùng một tên, hoặc ngược lại, nhiều tên giống khác nhau nhưng thực chất chỉ là một giống (Nguyễn Đông Quan, 1998; Vũ Công Hậu, 1996). Đến nay đa dạng sinh học của các giống cây có múi ở ĐBSCL chưa được nghiên cứu có hệ thống. Có những giống cây có múi hoang dại rải rác ở Hà Tiên và ở vùng đất phù sa ven sông ĐBSCL cho năng suất cao và nông dân tương truyền không bao giờ bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh (Simoens, 1999) một bệnh đang gây thiệt hại lớn về kinh tế ở ĐBSCL. Điều này cần phải được nghiên cứu kiểm định.

Từ khi Linné xếp loại các loài thực vật theo cấu tạo của cơ quan sinh dục (hoa) và nhóm cây có múi được phân loại vào giống *Citrus* (Phạm Hoàng Hộ, 1992). Ngày nay, người ta phân loại các loài thực vật dựa thêm vào các kỹ thuật sinh học phân tử:

Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) là kỹ thuật khuếch đại trình tự ADN chuyên biệt. Kỹ thuật PCR được phát minh và đặt tên bởi Mullis và ctv., năm 1987 tuy nguyên tắc này đã được mô tả chi tiết trước đó bởi Khorana và ctv., (Kleppe và ctv., 1971; Panet và ctv., 1974). Kỹ thuật PCR đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lãnh vực để chẩn đoán mầm bệnh.

Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) là một kỹ thuật sinh học phân tử để xác định tính đa dạng sinh học của các loài với ưu điểm nổi bật là không cần sử dụng các chất đồng vị phóng xạ, chỉ cần một lượng cực nhỏ ADN, kỹ thuật đơn giản, ít tốn

kém so với các kỹ thuật khác như RFLP, allozymes (Robinson & Harris, 1999) và có thể áp dụng cho nhiều loài sinh vật khác nhau. Kỹ thuật RAPD bao gồm các bước sau: (1) Phân lập ADN của cây (2) ADN của cây sẽ được cắt ra bằng các enzym giới hạn và nối lại bằng các đoạn oligonucleotide ngắn có trình tự ngẫu nhiên (3) Các đoạn ADN trên gel sẽ được phân tích và ước lượng độ đa dạng di truyền giữa những quần thể với nhau.

2 VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

2.1.1 Dụng cụ, thiết bị

Các máy móc, thiết bị của Phòng Thí Nghiệm Sinh học phân tử của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học và Phòng Thí Nghiệm Trung tâm của Trường Đại Học Cần Thơ sử dụng trong nghiên cứu gồm: máy PCR Perkin Elmer 9700 (Mỹ), hệ thống chụp và phân tích gel Image master VDS system (Mỹ), máy quang phổ Beckman Coulter DU 640B(Đức), bộ điện di 1 chiều BioRad, bộ điện di nhanh Run-one, lò vi sóng, máy ly tâm Eppendorf 5417(Đức), máy nghiền mẫu MM 200 (Đức), máy hút chân không 5301 (Đức), tủ sấy SHEL LAB (Mỹ), máy đo độ Brix Atago (Mỹ).

2.1.2 Hóa chất

Hóa chất gồm: nitor lỏng, Extraction buffer (EB), Taq ADN polymerase, dNTPs, PCR buffer Gibco, CTAB buffer, Tris - HCl (pH 8), EDTA (TE 1), Iso-propanol, MgCl₂, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄, Agarose tinh khiết, β-mercapthoethanol, ARNase, Chloroform, Amyl alcohol, Ethanol 700,950, Loading buffer, Lader 1 Kb, PCR buffer, d-NTP, các mẫu ngẫu nhiên A-02; A-04; A-11; A-13(của Genset, Singapor), Ethidium bromid, λ-ADN

2.1.3 Vật liệu

Mẫu lá cây có múi thu thập từ Gò Quao để trích ADN.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thu thập mẫu

Chọn ngẫu nhiên các vườn cam quýt theo tỉ lệ diện tích, xã nhiều chọn nhiều vườn. Trong mỗi vườn, có bao nhiêu giống/dòng cây có múi đều lấy mẫu. Mỗi giống lấy hai mẫu ở hai cây khác nhau. Chọn những cây phát triển tốt, ít sâu bệnh, (những cây có triệu chứng greening rõ rệt thì không chọn) đem về Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học để trích ADN ngay ngày hôm sau. Nếu để lâu phải trữ trong tủ lạnh. Mỗi cây lấy mẫu lá từ 5-12 lá non. Ghi nhận chiều cao cây, tán lá, hoa, trái... Chụp hình một số giống tiêu biểu, giống mới.

2.2.2 Trích ADN mẫu lá

Trích ADN lá cây có múi theo phương pháp được mô tả bởi Rogers và ctv (1988).

Cắt nhỏ lá (1mm) cho vào tuýp, cho viên bi đá vào và làm lạnh bằng Nitor lỏng trong 5 phút. Nghiền mẫu bằng máy nghiền 3-4 lần, mỗi lần 1,5 phút. Cho vào mỗi ống 1ml Extraction buffer (EB) + 50 µl SDS. Ủ 650C, 30'. Ly tâm 13.200 vòng/phút, 10'. Lấy phần nước trong cho sang tuýp khác. Cho vào một lượng Iso-propanol tương đương 900µl, lắc nhẹ, để trầm hiện ADN. Ủ trong tủ lạnh -200C trong 2 giờ. Ly tâm 13.200 vòng/phút, 10', lấy phần trầm hiện. Cho TE 0,1 400µl để hoà tan ADN. Cho 10µl ARNaz, ủ ở 370C, 20' để phá huỷ ARN có trong mẫu. Cho CTAB buffer 400µl, ủ ở 650C, 15'. Cho 800µl chloroform/iso amylalcohol (24:1). Ly tâm 13.200 vòng/phút, 5'. Lấy phần lỏng ở trên cùng 700µl. Cho ethanol 950 gấp đôi (1400µl) để trầm hiện ADN,

15'. Ly tâm 13.200 vòng/phút, 10', lấy phần trầm hiện. Rửa ADN trầm hiện bằng ethanol 700 2 lần, ly tâm 5' lấy phần trầm hiện. Sấy khô bằng máy sấy chân không 450C, 10'. Hoà tan mẫu với 200µl TE 0,1. Trữ lạnh -200C. Đo nồng độ ADN bằng máy quang phổ. Chạy điện di nhanh để kiểm tra ADN bằng gel 0,8 % trong 15 phút.

2.2.3 Chạy PCR phát hiện mẫu bị bệnh vàng lá gân xanh

Phản ứng PCR để xác định bệnh VLGX được thực hiện trong thể tích 50µl, như sau: nước cất 2 lần : 39,5µl, PCR buffer(A): 5µl, d NTPs: 2µl, mỗi Bi: 0,5µl, taq DNA polymeraz: 0,5µl. Tất cả được cho vào tuýp với thể tích gấp 10 lần, lắc đều nhẹ, sau đó chia ra 10 tuýp để chạy PCR. Cuối cùng cho vào mỗi tuýp PCR 2,5µl dung dịch trích ADN mẫu lá. Cho vào máy PCR chạy 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ 920C 40", 550C 40", 720C 1 phút 30 giây. Sản phẩm PCR chạy điện di trên gel agaroz 2% và chụp hình gel. Những mẫu ADN nhiễm bệnh greening sẽ có băng 1000bp và 800bp hiện diện trên gel. Từ đó tính tỉ lệ cây nhiễm bệnh.

2.2.4 Chạy PCR với phương pháp RAPD

Phản ứng khuếch đại PCR được thực hiện trong thể tích 50µl, gồm: nước cất 2 lần: 39,5µl, PCR buffer (B): 5µl, d NTPs: 2µl, mỗi RAPD: 0,5µl, taq DNA polymerase: 0,5µl. Tất cả được cho vào tuýp với thể tích gấp 10 lần, lắc đều nhẹ, sau đó chia ra 10 tuýp để chạy PCR. Cuối cùng cho vào mỗi tuýp PCR 2,5µl dung dịch trích ADN mẫu lá. Cho vào máy PCR chạy 45 chu kỳ (15" ở 940C, 15" ở 360C, và 1phút 20" ở 720C). Các môi được chọn dùng trong phản ứng PCR RAPD gồm:

A-02: 5'- TGCCGAGCTG- 3'; A-04: 5'- AATCGGGCTG- 3'.

A-11: 5'- CAATCGCCGT- 3'; A-13: 5'- CAGCACCCAC-3'.

2.2.5 Chạy điện di trên gel agaroz 2%.

Gel agaroz 2% được pha trong TE 1X, cho thêm vào Ethidium bromid (2µl/100ml dung dịch) lắc đều trước khi đổ gel. Sản phẩm PCR RAPD được trộn với loading buffer và bơm vào các giếng trên gel agaroz. Sử dụng thang chuẩn 1Kb. Chạy điện di ở hiệu điện thế 100V trong 180', trong môi trường TE 1. Chụp hình bằng máy chụp và phân tích gel Image master VDS system.

2.2.6 Phân tích số liệu

Các dãy băng trên gel được ghi nhận bởi phần mềm VDS Image Master 1.0. Sự có mặt hoặc không có mặt của một băng nào đó trên gel sẽ được ghi nhận là 1 và 0. Số liệu thu thập được lưu trữ trên phần mềm Excel. Phân tích cluster, vẽ biểu đồ hình răng cho thấy mối quan hệ giữa các giống/dòng cây có múi bằng phần mềm NTSYSpc 2.11a theo phương pháp UPGMA (Unweighted pair-group method, arithmetic average) (Sneath và Sokal, 1973).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Điều tra thu thập mẫu

Bảng 1: Tổng số mẫu thu được ở huyện Gò Quao, tỉnh Kiên Giang

STT	Tên Xã	Số mẫu	Bưởi	Cam	Quýt	Chanh	Hạnh
1	Vĩnh Hoà Hưng Bắc	68	18	22	10	12	6
2	Vĩnh Hoà Hưng Nam	63	15	18	14	9	7
3	Định An	33	11	10	6	6	-
4	Vĩnh Tuy	18	5	5	4	4	-
5	Vĩnh Phước B	21	4	9	4	2	2
6	Thủy Liễu	13	8	4	1	-	-
7	Thị Trấn	10	-	2	4	2	2
Tổng cộng		226	61	70	43	35	17

3.2 Mô tả đặc tính hình thái cây có múi theo phân loại thực vật

Dựa vào các đặc tính hình thái ghi nhận được và đối chiếu với phân loại của Phạm Hoàng Hộ (1992) tạm thời chúng tôi phân loại các mẫu thu thập được như sau:

3.2.1 Các giống Bưởi: *Citrus grandis* (L) Osb. Var. *grandis*.

Chỉ chung nhóm bưởi gồm các giống/dòng theo tên địa phương như: Bưởi Năm Roi, Bưởi Biên Hoà, Bưởi Thanh Kiều, Bưởi Hồng, Bưởi Ôi và các giống/dòng bưởi không xác định tên khác. Các giống bưởi này có một số điểm khác biệt như: Bưởi Hồng, trái tròn, ruột đỏ; Bưởi Biên Hoà, vỏ trái xanh đậm hơn, trái tròn, không nùm, hoặc nùm rất nhỏ; Bưởi Thanh Trà, trái tròn, to, vỏ trái có lông mịn; Bưởi Ôi, trái nhỏ, tròn; Bưởi Long, trái tương tự bưởi Năm Roi, nhưng ít nước, vị ít the hơn; Bưởi Năm Roi, trái thường có nùm dạng trái quả lê, ít hạt đến không hạt và các giống bưởi còn lại đều tương tự Năm Roi (Hình 1)



Hình 1: Lá, hoa, trái và múi bưởi

3.2.2 Các giống cam

Cam Mật: *Citrus sinensis* (L) Osb., trái gần tròn, to, khi non màu xanh, khi chín màu vàng cam. Quả bì dày 3-5mm. Nạc quanh hạt màu vàng đến vàng cam, múi có nhiều nước; Cam Sảnh: *Citrus nobilis* Lour var. *nobilis*, trái tròn hoặc gần tròn, da có u nần, trái non màu xanh đậm, chín màu vàng cam. Quả bì dày, hơi dễ lột, rất thơm. Nạc màu vàng cam, vị ngọt ít chua; Cam Sen *Citrus sinensis* (L) Osb, Cam Sen có trái rất to, đường kính đến 20cm, như trái Bưởi Ôi, bì quả mỏng khó bóc. Múi nhiều nước, vị chua, ít ngọt; Sảnh: *Citrus nobilis* var. *microcarpa*. Hassk, trái to, tròn, hơi bẹt, quả bì mỏng, màu xanh hay vàng, hơi khó bóc. Múi có nạc quanh hạt màu vàng cam, vị ngon (Hình 2 và 3).



Hình 2: Lá và trái, Sảnh C3), Cam Sen (4) và Cam Soàn (C5)



Hình 3: Lá, hoa, trái, và múi cam mật (C1) và cam sành (C2)

3.2.3 Các loại quýt

Bao gồm có Quýt Tiêu: *Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*. Launk, trái có đầu hơi bẹp, đáy có u cao và lõm, lúc chín màu vàng cam sậm. Bì quả mỏng, ít nước nhưng ngọt hơn Quýt Xiêm. Nạc có nhiều múi (10-12), hạt nhỏ, mầm hạt màu lục và Quýt Xiêm: *Citrus deliciosa* Ten, trái hơi bẹp, đầu bằng hoặc lõm, đáy tròn hơi có núm. Quả bì khi non màu xanh, khi chín hơi vàng sáng (Hình 4).

Vỏ mỏng, dễ bóc, trái có nhiều múi (9-13), nạc màu hơi vàng, vị ngọt, hạt có mầm lục. Ngoài ra, theo mô tả của nông dân, còn có loại Quýt Xiêm đen (Q3), màu vỏ quả xanh đậm hơn, trái có múi to hơn. Tuy nhiên, vẫn xếp chung với Quýt Xiêm.



Hình 4: Lá, hoa, trái và múi Quýt xiêm

3.2.4 Các loại chanh gồm

Chanh Tây: *Citrus limon* (L) Burm, còn được gọi là Chanh Núm, trái hình bông vụ, có núm to, vỏ quả dày, nạc trắng, chua, hạt màu trắng và Chanh Ta: *Citrus aurantiifolia* (Christm) Sw, còn được gọi là Chanh Vỏ mỏng, Chanh Giấy. Trái nhỏ 3-5cm, còn non màu xanh, khi thật chín mới ngã màu vàng. Quả bì mỏng, dính khó bóc, nạc quả trong, nhiều nước, rất chua. Hạt nhỏ, có tử điệp trắng. Ngoài ra, còn có loại Chanh Tàu (L3), Chanh Thái (L4), qua ghi nhận hình thái tạm thời xếp vào nhóm Chanh Vỏ mỏng. Tuy nhiên, trái to hơn, lá cũng to hơn (Hình 5 và 6)



L2



Hình 5: Chanh Tàu (L3), Chanh Tàu (L3) và Chanh Tàu (L4)

3.2.5 Hạch: *Citrofortunella microcarpa* (Bunge). Wijnands, còn gọi là tắc, quất.

Trái tròn, gần tròn, nhỏ 1,5-3,5cm. Vỏ quả khi chín màu vàng tươi đến vàng cam sáng. Nạc màu vàng, từ 6-10 múi, rất chua. Hạt nhỏ, tròn, mỗi trái từ 0-11 hạt, hạt có màu lục, thường đa phôi (Hình 6)



Hình 6: Trái chanh Núm (L1), Chanh Giấy (L2) và Hạch (H1)

3.2.6 Độ Brix và độ pH

Bưởi Năm Roi có độ Brix và độ pH cao nhất theo thứ tự là 9,66 và 3,97. Kế đến là quít Xiêm (8,66 và 3,91), cam Sành (8,56 và 3,88), cam Mật (7,2 và 3,55), cam Sen (7,1 và 3,53), Hạch (7,0 và 2,65), chanh Giấy (6,6 và 2,68) và thấp nhất là chanh Tàu (5,93 và 2,46).

3.3 Phân tích đa dạng sinh học cây có múi bằng phương pháp RAPD

3.3.1 Trích ADN mẫu lá cây có múi

Tất cả 226 mẫu cây thu thập được. Sau khi trích ADN tiến hành đo nồng độ ADN bằng máy quang phổ với 2 bước sóng 260nm và 280nm đồng thời tiến hành kiểm tra trên gel agaroz 0,8%. Kết quả có 211 mẫu ADN tốt có thể sử dụng và 24 mẫu không có ADN hoặc lẫn tạp chất.

3.3.2 Xác định bệnh vàng lá gân xanh (VLGX)

Tỉ lệ nhiễm bệnh VLGX cao nhất ở quít (50%), kế đến là cam (25,4%), bưởi (9,6%), chanh (1,14%). Không phát hiện thấy bệnh ở hạch.

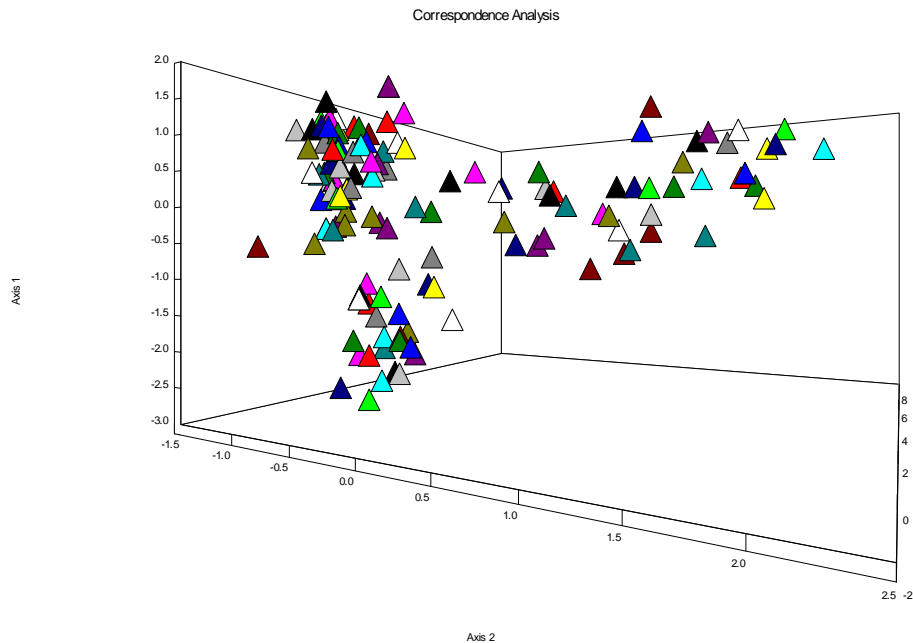
Chạy PCR RAPD với các môi A-02, A-04, A-07, A-11, A-13, E-01 và F-02

Kết quả cho thấy có 4 môi là A-02, A-04, A-07, A-11 và A-13 cho sản phẩm PCR RAPD tương đối ổn định với các băng rõ nên các môi này được chọn để nghiên cứu đa dạng sinh học cây có múi ở Gò Quao, tỉnh Kiên Giang.

3.3.3 Ghi nhận băng đa hình bằng phổ điện di

Tổng cộng có 49 dấu phân tử ghi nhận được. Trong đó có 11 dấu phân tử có tần số xuất hiện 100%, 26 dấu phân tử từ 90% đến dưới 100%, 4 dấu phân tử từ 80% đến dưới 90%, 2 dấu phân tử từ 70% đến dưới 80% và có 6 dấu phân tử có tần số xuất hiện dưới 70%. Qua phân tích giản đồ phả hệ cây có múi ở Gò Quao, Kiên Giang cho thấy chúng chia ra

làm 4 nhóm, nhóm 1 là bưởi, nhóm 2 gồm cam và quýt, nhóm 3 là chanh và nhóm 4 là hạnh. Khoảng cách di truyền giữa các nhóm biến động từ 0-43% (Hình 7).



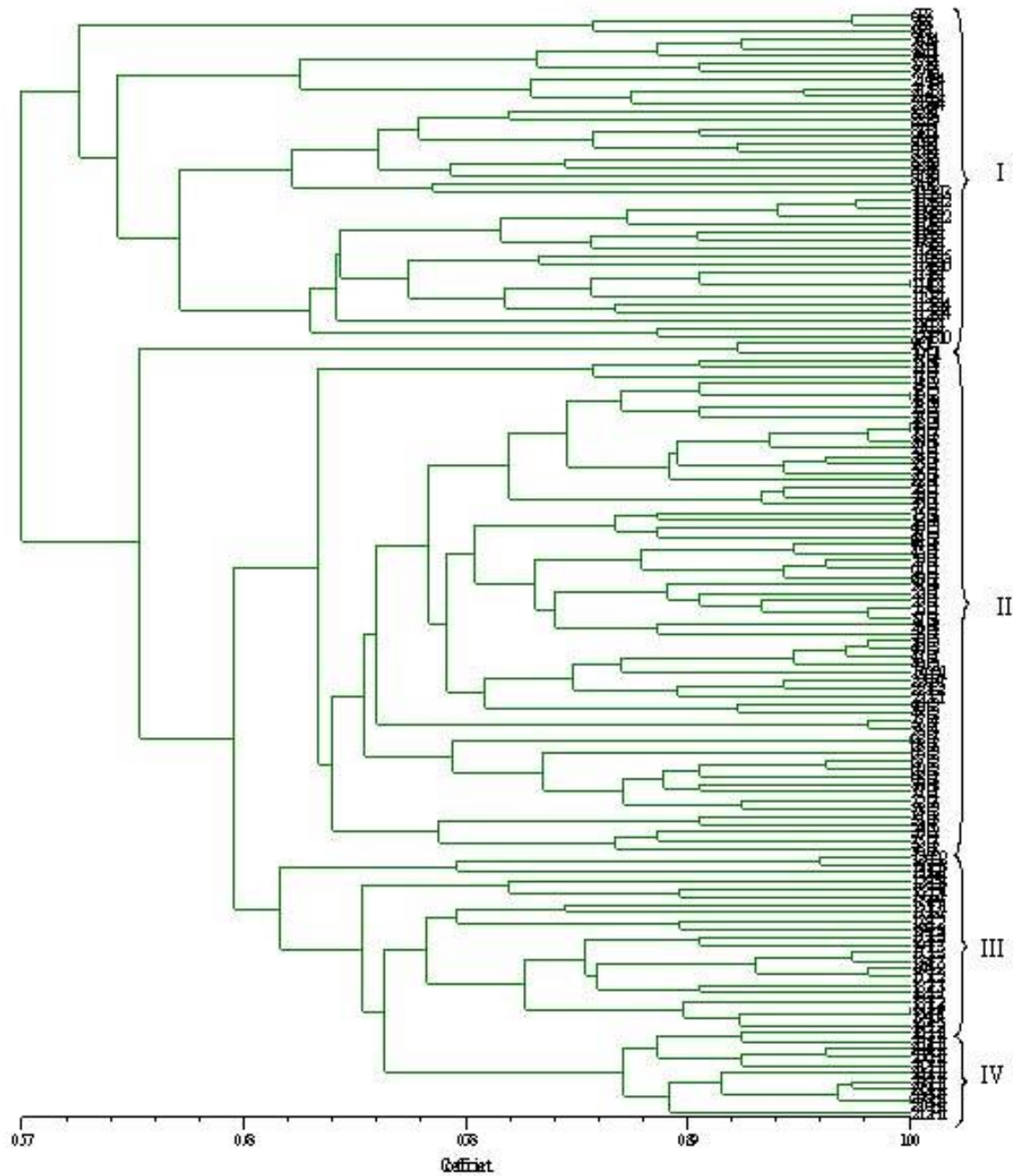
**Hình 7: Giản đồ phân nhóm của cây có múi ở Gò Quao, Kiên Giang
(Phân tích bằng phần mềm BioPro)**

Qua giản đồ phả hệ cho thấy sự đa dạng giữa các giống/dòng cây có múi. Kết quả này phù hợp với sự phân loại của nhiều tác giả (Vũ Công Hậu, 2000, Tôn Thất Trình, 2000). Theo nhiều tác giả thì hạnh thuộc chi *Fortunella* nhưng theo Phạm Hoàng Hộ (1992), hạnh là loài lai giữa chi *Citrus* và *Fortunella*. Kết quả của đề tài phù hợp với cách phân loại của Phạm Hoàng Hộ.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Từ kết quả thu được chúng tôi có các kết luận và đề nghị sau:

- Cây có múi ở Gò Quao, Kiên Giang có sự đa dạng sinh học với khoảng cách di truyền biến động từ 0-43%
- Tỷ lệ nhiễm bệnh VLGX trên cây có múi ở Gò Quao khá cao, quýt (50%), cam (25,4%), bưởi (9,6%) và chanh (1,14%). Chưa phát hiện dấu hiệu bệnh trên hạnh.
- Đề nghị tiếp tục sử dụng nhiều môi đơn khác để nghiên cứu đa dạng sinh học cây có múi bằng phương pháp RAPD từ đó góp phần xác định nguồn gen cây có múi phục vụ cho công tác phát triển cây ăn quả trong khu vực và ĐBSCL.



Hình 8. Giản đồ phả hệ (phylogenetic tree) đầy đủ các giống/dòng cây có mùi ở huyện Gò Quao tỉnh Kiên Giang

CẢM TẠ

Chân thành cảm tạ Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường Tỉnh Kiên Giang, Phòng NN và PTNN huyện Gò Quao và Trung tâm Khuyến Nông Tỉnh Kiên Giang và Viện NC và PT Công nghệ Sinh học và Phòng Thí nghiệm Chuyên sâu Trường Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ kinh phí, giúp thu mẫu và cung cấp thiết bị vật tư để thực hiện thành công đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aubert, B.1994. Điều tra về cây có múi ở Việt Nam- Báo cáo công tác của chuyên gia Pháp B.Aubert đợt công tác 12-28/11/1994.
- Báo cáo rà soát điều chỉnh quy hoạch nông lâm nghiệp, nuôi trồng thủy sản tỉnh Kiên Giang thời kỳ 2001-2010 (Ủy ban Nhân dân tỉnh Kiên Giang, 2001).
- Caetano-Anolles, G., G.J Bassam and P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting : A strategy for genom analysis. *Plant Mol Bio.* Rptr 4:294-307.
- Caetano-Anolles, G., G.J Bassam and P.M. Gresshoff. 1991b. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary Oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9:553-557.
- Nguyễn Minh Châu, Phạm Ngọc Liễu, Nguyễn Ngọc Thi, Phan Đình Pháp, Nguyễn Văn Hùng, Trần Thị Oanh Yến, Lê Quốc Điền và Đào Thị Bé Bảy. 2001. Điều tra, thu thập bảo tồn đánh giá và sử dụng nguồn gen Cây ăn quả ở miền nam Việt Nam. Trong: Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ Cây ăn quả 2000-2001. Nxb Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh (TP HCM) Việt Nam
- Vũ Công Hậu. 2000. Trồng cây ăn quả ở Việt Nam. Tái bản lần 3. Nxb Nông nghiệp TP HCM Việt Nam
- He, S., H.Ohm and S.Mackenzie. 1992. Delection of DNA sequance polymorphism among wheat varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 84:573-8
- Phạm Hoàng Hộ. 1992. Cây cỏ Việt Nam. Mekong printing, USA. Quyển II tập 1 trang 509-548.
- Lê Thị Thu Hồng. 1996. Ngăn ngừa và kiểm soát những bệnh quan trọng trên cam quýt tại Đồng bằng sông Cửu Long. Nxb Nông nghiệp (TP HCM)Việt Nam.
- Hu, J., and C.F Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflowers cultivars with RAPD marker. *Plant cell Reports* 10:505-11.
- Nguyễn Thanh Phong, Võ Thanh Hoàng và Dương Minh. 1996. Cây cam quýt.Nxb Nông nghiệp TP HCM Việt Nam.
- Nguyễn Đông Quan. 1998. Kinh nghiệm và kỹ thuật trồng quýt hồng. Nxb Tổng hợp Đồng Tháp Việt Nam.
- Simoens, C. 1999. VLIR/CTU-B3 subproject.
- Hoàng Ngọc Thuận. 1999. Kỹ thuật chọn giống và trồng cây cam quýt.Nxb Nông nghiệp TP HCM Việt Nam.
- Tinker, N.A., M.G.Fortin and D.E.Mother. 1993. Random a and pedigree relationships in spring barley,mplified polymorphic DNA. *Theoretical and Applied Genetics.* 85:976-84.
- Tôn Thất Trình. 2000. Tìm hiểu về các loại Cây ăn trái có triển vọng xuất khẩu. Nxb Nông nghiệp TP HCM Việt Nam.
- Verheij, E.W, R.F. Coronel, Nwulijarni-Soetjipto, J.S. Siemonsma. 1991. Edible fruits and nuts. Publisher: Pudoc. Pages: 117-141.
- William et al. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Res* 18: 6531-6535.