

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

....Ω ☼ ∞....



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**XÂY DỰNG QUI TRÌNH PCR PHÁT HIỆN NẤM *Ustilago
scitaminea* GÂY BỆNH THAN TRÊN MÍA**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2003 - 2007

Sinh viên thực hiện: HỒ BỬU THÔNG

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9/2007

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

....☞ ☼ ☛....



**XÂY DỰNG QUI TRÌNH PCR PHÁT HIỆN NẤM *Ustilago
scitaminea* GÂY BỆNH THAN TRÊN MÍA**

**Giáo viên hướng dẫn:
PGS. TS. BÙI CÁCH TUYẾN**

**Sinh viên thực hiện:
HỒ BỬU THÔNG**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2007

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

*****000*****



**ESTABLISHING A PROTOCOL PCR TO DETECT *Ustilago
scitaminea* CAUSING SUGARCANE SMUT**

Graduation thesis

Major: Biotechnology

Professor:

PhD. BUI CACH TUYEN

Student:

HO BUU THONG

Term: 2003 - 2007

HCMC, 9/2007

LỜI CẢM TẠ

Con xin thành kính ghi ơn cha mẹ. Gia đình luôn là chỗ dựa vững chắc về tinh thần và vật chất cho con.

Em vô cùng biết ơn Thầy Bùi Cách Tuyên đã tận tình hướng dẫn và truyền đạt cho em những kinh nghiệm quý báu trong suốt thời gian làm đề tài.

Em xin gửi lời cảm ơn đến

Ban giám hiệu Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, ban chủ nhiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện thuận lợi cho em trong thời gian học tập vừa qua.

Ban giám đốc Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hoá Sinh thuộc Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường - Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh cùng toàn thể các anh chị tại đây đã tạo điều kiện thuận lợi tối đa cũng như tận tình giúp đỡ em trong thời gian thực tập tốt nghiệp.

ThS. Hà Đình Tuấn cùng toàn thể cán bộ Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Mía Đường tỉnh Bình Dương đã giúp đỡ em hoàn thành tốt đề tài này.

Anh Nguyễn Đình Trường đã tận tình giúp đỡ em trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Em xin chân thành cảm ơn anh Trường, anh Khoa, anh Nam, anh Phương chị Hưng, chị Dung đã hết lòng giúp đỡ em để em có thể hoàn thành tốt khóa luận tốt nghiệp này.

Cảm ơn các bạn trong lớp Công nghệ Sinh học K29 đã luôn đồng hành, chia sẻ vui buồn, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và làm đề tài.

Thành phố Hồ Chí Minh, tháng 9 năm 2007

Hồ Bửu Thông

TÓM TẮT KHÓA LUẬN

Hồ Bửu Thông, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Tháng 8 / 2007. “Xây dựng qui trình PCR phát hiện nấm *Ustilago scitaminea* gây bệnh than trên mía.” đề tài được thực hiện từ tháng 5 đến tháng 8 năm 2007 tại Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hoá Sinh thuộc Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Giáo viên hướng dẫn: PGS. TS. Bùi Cách Tuyến.

Nội dung nghiên cứu

- ❖ Nuôi cấy, phân lập, tách đơn bào tử và nhân sinh khối nấm *Ustilago scitaminea*.
- ❖ Xây dựng qui trình PCR phát hiện trực tiếp DNA sợi nấm *Ustilago scitaminea*.

Kết quả đạt được

- ❖ Phân lập, tách đơn bào tử và nhân sinh khối 11 dòng nấm *Ustilago scitaminea* từ 11 giống mía khác nhau ở Bình Dương.
- ❖ Xây dựng được qui trình PCR phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm để phát hiện nấm *Ustilago scitaminea*.

SUMMARY

Ho Buu Thong studying at Nong Lam University and finishing the thesis on 8th, 2007. The thesis entitled “Establishing a protocol PCR to detect *Ustilago scitaminea* causing sugarcane smut”. This research was conducted from 5th, 2007 to 8th, 2007 at the laboratory of biotechnology and chemistry of Nong Lam University.

Board of scientific instruction: Prof.Dr. BUI CACH TUYEN

The content of research:

- ❖ Culturing, isolating, demorphising the spore and multiplying the living mass of *Ustilago scitaminea*.
- ❖ Establishing a protocol PCR to detect *Ustilago scitaminea*.

The results obtained from this study:

- ❖ Culturing, isolating, demorphising the spore and multiplying the living mass of 11 *Ustilago scitaminea* clones.
- ❖ A protocol PCR for detecting *Ustilago scitaminea* was established.

MỤC LỤC

PHẦN	TRANG
LỜI CẢM ƠN.....	iv
TÓM TẮT.....	v
SUMMARY.....	vi
MỤC LỤC.....	vii
DANH SÁCH CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	x
DANH SÁCH CÁC BẢNG.....	xi
DANH SÁCH CÁC HÌNH.....	xii
Chương 1: MỞ ĐẦU	1
1.1. Cơ sở tiến hành và ý nghĩa của nghiên cứu.....	1
1.2. Nội dung nghiên cứu.....	2
1.3. Yêu cầu.....	2
1.4. Giới hạn đề tài.....	2
Chương 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1. Sơ lược về cây mía.....	3
2.1.1. Lịch sử phát hiện.....	3
2.1.2. Phân loại.....	3
2.1.3. Nguồn gốc và phân bố.....	4
2.1.4. Nhân giống.....	5
2.1.5. Sản lượng.....	5
2.1.6. Chế biến và sử dụng.....	5
2.1.7. Vị trí kinh tế của cây mía.....	6
2.1.8. Sản xuất protein tái tổ hợp từ mía.....	7
2.1.9. Bệnh trên cây mía.....	7
2.2. Bệnh than.....	8
2.2.1. Nguồn gốc và phân bố.....	8
2.2.2. Triệu chứng.....	9
2.2.3. Tác nhân gây bệnh.....	9
2.2.4. Đặc điểm phát sinh phát triển bệnh.....	10

2.2.5. Thiệt hại về kinh tế	11
2.2.6. Biện pháp phòng trừ	11
2.3. Các phương pháp xác định bệnh than	11
2.3.1. Dựa vào triệu chứng	11
2.3.2. Phương pháp chẩn đoán bằng cách nhuộm mắt mầm và soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.	12
2.3.3. Phương pháp ELISA	12
2.3.4. Phương pháp PCR	12
2.4. Tình hình nghiên cứu bệnh than	21
2.4.1. Trên thế giới	21
2.4.2. Trong nước	23
Chương 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
3.1. Nội dung nghiên cứu	24
3.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	24
3.3. Vật liệu nghiên cứu.....	24
3.4. Phương pháp tiến hành	24
3.4.1. Phương pháp lấy mẫu	24
3.4.2. Phương pháp phân lập	25
3.4.3. Phương pháp tách đơn bào tử.....	25
3.4.4. Phương pháp nhân sinh khối nấm	26
3.4.5. Phương pháp ly trích DNA tổng số của nấm <i>Ustilago scitaminea</i>	26
3.4.6. Tinh sạch sản phẩm ly trích.....	28
3.4.7. Phương pháp PCR phát hiện nấm <i>Ustilago scitaminea</i>	29
Chương 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	32
4.1. Phân lập, tách đơn bào tử và nhân sinh khối nấm <i>Ustilago scitaminea</i>	32
4.1.1. Kết quả phân lập	32
4.1.2. Kết quả tách đơn bào tử.....	33
4.1.3. Kết quả nhân sinh khối	34
4.2. Kết quả ly trích và tinh sạch DNA sợi nấm.....	36
4.2.1. Kết quả ly trích	36
4.2.2. Kết quả tinh sạch	37

4.3. Phát hiện DNA của <i>Ustilago scitaminea</i> bằng kỹ thuật PCR	39
Chương 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	43
5.1. Kết luận.....	43
5.2. Đề nghị	43
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	44
PHỤ LỤC	47

DANH SÁCH CÁC TỪ VIẾT TẮT

bp	: base pair
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
ctv	: cộng tác viên
dNTP	: deoxyribonucleotide – 5 – triphosphate
EDTA	: Ethylene Diamine Tetracetic Acid
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Kb	: kilo base
μm	: micro mol
μM	: micro mol/lít
ng	: nano gram
NST	: nhiễm sắc thể
Nu	: Nucleotide.
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PGA	: Potato glucose agar
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	: Sodium dodecyl sulphate
TAE	: tris acetic EDTA
<i>Taq</i>	: <i>Thermus aquaticus</i>
TE	: tris EDTA
Tm	: melting temperature
UI	: unit international
UV	: Ultraviolet

DANH SÁCH CÁC BẢNG

BẢNG	TRANG
Bảng 2.1: Thống kê các nhóm tác nhân gây bệnh và số lượng bệnh xảy ra trên cây mía.	8
Bảng 2.2: Tỷ lệ nhiễm bệnh than của các giống mía ở Hawaii đối với nòi mới	23
Bảng 3.1: Thành phần môi trường PGA*	25
Bảng 3.2: Thành phần các chất trong phản ứng PCR và chu kỳ nhiệt	30
Bảng 4.1: Các dòng nấm được tách đơn bào tử.....	34
Bảng 4.2: Khối lượng sợi nấm sau 4 ngày lắc trong môi trường PGA* lỏng	35
Bảng 4.3: Nồng độ các yếu tố trong phản ứng PCR thay đổi.....	40

DANH SÁCH CÁC HÌNH

HÌNH	TRANG
Hình 2.1: Triệu chứng bệnh than trên mía.....	9
Hình 2.2: Bào tử nấm.....	10
Hình 4.1: Khuẩn lạc nấm <i>Ustilago scitaminea</i> sau 5 ngày nuôi cấy.....	32
Hình 4.2: Khuẩn lạc nấm <i>Ustilago scitaminea</i> sau 7 ngày nuôi cấy.....	33
Hình 4.3: Bào tử nấm <i>Ustilago scitaminea</i>	33
Hình 4.4: Bào tử nấm nảy mầm trên môi trường agar soi dưới kính hiển vi ở vật kính x 40	34
Hình 4.5: Sinh khối nấm sau 4 ngày lắc	35
Hình 4.6: Kết quả li trích DNA của 11 dòng nấm.....	36
Hình 4.7: DNA tổng số đã tinh sạch.....	38
Hình 4.8: DNA tổng số sau khi pha loãng.....	39
Hình 4.9: Sản phẩm PCR theo quy trình của Albert, H. H., và Schenck, S.,.....	39
Hình 4.10: Sản phẩm PCR sau thay đổi đầu tiên	40
Hình 4.11: Sản phẩm PCR sau khi thay đổi nồng độ hóa chất và chu kỳ nhiệt.....	41
Hình 4.12: Sản phẩm PCR theo quy trình mới.....	41

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1. Cơ sở tiến hành và ý nghĩa của nghiên cứu

Hiện nay cây mía (*Saccharum spp.*) đang là một trong những loại cây công nghiệp cho hiệu quả kinh tế cao ở nước ta cũng như nhiều nước trên thế giới như Cuba, Ấn Độ, Australia, v.v... vì vậy diện tích trồng mía cũng như sự ra đời của nhiều giống mới không ngừng gia tăng trong những năm gần đây. Tuy nhiên mía là cây trồng một lần nhưng lại có khả năng cho thu hoạch nhiều vụ, nên đây cũng là một trong những điều kiện thuận lợi cho nhiều loại sâu bệnh gây hại tồn tại và phát triển (Nguyễn Huy Ước, 1994). Hơn nữa khi cơ cấu giống mía phong phú hơn, thời tiết khí hậu có nhiều biến đổi cũng góp phần làm cho dịch bệnh đa dạng hơn. Các bệnh quan trọng ảnh hưởng đến năng suất mía hiện nay có rất nhiều, trong đó phải kể đến bệnh than (smut).

Bệnh than do nấm *Ustilago scitaminea* gây ra, đây là bệnh rất phổ biến và có ảnh hưởng lớn đến ngành sản xuất mía đường của nhiều nước trên thế giới. Do vậy việc phát hiện bệnh than trên các giống mía có vai trò rất quan trọng, nhằm thống kê tình hình nhiễm bệnh, nâng cao hiệu quả chọn lọc giống và kiểm soát bệnh.

Các phương pháp phát hiện *Ustilago scitaminea* như là nhuộm mắt mầm, phát hiện bằng phương pháp miễn dịch học, v.v.. nhưng độ chính xác và độ nhạy chưa cao. Do vậy, việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong phát hiện nhanh và chính xác bệnh là một yêu cầu cần thiết, có ý nghĩa rất quan trọng, phục vụ cho công tác chọn giống, kiểm định giống từ đó đề ra các khuyến cáo nhằm kiểm soát và quản lý bệnh có hiệu quả.

Trước tình hình trên, được sự hướng dẫn của PGS. TS. Bùi Cách Tuyến và sự hỗ trợ từ Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Mía Đường tỉnh Bình Dương, chúng tôi đã thực hiện đề tài “**Xây dựng qui trình PCR phát hiện nấm *Ustilago scitaminea* gây bệnh than trên mía**”. Đề tài được thực hiện trên 11 dòng nấm từ 11 giống mía khác nhau thuộc tỉnh Bình Dương.

1.2. Mục đích nghiên cứu

- ❖ Thu nhận khuẩn lạc nấm *Ustilago scitaminea* đồng nhất về mặt di truyền.
- ❖ Khuếch đại đoạn gen *bE* nấm *Ustilago scitaminea* gây bệnh than trên mía, từ đó đề ra phương pháp chẩn đoán sớm bệnh than bằng kỹ thuật PCR.

1.3. Yêu cầu

- ❖ Nhận dạng được triệu chứng biểu hiện của bệnh than trên mía.
- ❖ Nắm vững kỹ thuật nuôi cấy, tách đơn bào tử và nhân sinh khối nấm *Ustilago scitaminea*.
- ❖ Nắm vững kỹ thuật PCR.

1.4. Giới hạn đề tài

- ❖ Thời gian thực hiện đề tài có hạn vì vậy không thể thực hiện phản ứng RFLP – PCR để xác định tính đa dạng di truyền của các dòng nấm thu thập được.
- ❖ Chưa giải trình tự vùng gene *bE* của nấm đã được khuếch đại.

Chương 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Sơ lược về cây mía

2.1.1. Lịch sử phát hiện

Cây mía (*Saccharum* spp.) đã được biết từ rất lâu (cách đây khoảng 2.300 năm), khi quân đội của Alexander chinh phục Ấn Độ vào năm 326 trước Công Nguyên họ đã thấy được cây mía. Cây mía đến Persia vào thế kỉ thứ 6 và người Ả Rập đã mang cây mía đến Ai Cập vào năm 641 sau Công Nguyên trong quá trình chinh phục các miền đất của họ. Cây mía cũng được mở rộng phân bố bằng cách này đến Syria, Cyprus, Crete, và đến Tây Ban Nha vào khoảng những năm 714 sau công nguyên. Vào những năm 1150 ngành công nghiệp mía đường ở Tây Ban Nha rất phát triển với khoảng 30.000 ha mía được trồng. Vào khoảng năm 1420 người Bồ Đào Nha đã đưa cây mía đến Madeira nơi mà chúng ngay lập tức lan rộng sang các quần đảo Canary, Azores. Nhà máy xử lí mía hoạt động đầu tiên vào năm 1516 ở nước cộng hòa Dominica. Sản phẩm đường được đưa đến Cuba, Jamaica, Puerto Rico vào những năm cuối của thế kỷ 15 (Lê Song Dữ, Nguyễn Thị Quý Mùi, 1997. *Cây mía*).

2.1.2. Phân loại

Theo phân loại thực vật cây mía thuộc:

Ngành: Spermatophyta

Lớp: Monocotyledoneae

Họ: Gramineae

Loại: *Saccharum*

Trong loại *Saccharum* có năm loài:

- Loài nhiệt đới (*Saccharum officinarum* L.)
- Loài Trung Quốc (*Saccharum sinence* Roxb Emend. Jesw)
- Loài Ấn Độ (*Saccharum barberi* Jesw)

- Loài hoang dại thân nhỏ (*Saccharum spontaneum* L.)
- Loài hoang dại thân to (*Saccharum robustum* Brongniart và Jesw)

Cây mía thuộc họ Gramineae, giống *Saccharum* (*S*) là hỗn hợp của sáu loài cỏ lưu năm thuộc giống *Saccharum* L., trong đó có hai loài hoang dại: *S. spontaneum* L. và *S. robustum* (Brongniart và Jeswiet ex Grassl), và 4 loài cây trồng ở vườn: *S. officinarum* L., *S. barberi* Jeswiet, *S. sinense* Roxb., và *S. edule* Hassk. Bốn loài cây trồng ở vườn có sự lai giống phức tạp và luôn có thể giao phấn chéo với nhau. Tất cả các loại giống mía thương mại được trồng hiện nay đều là các giống lai giữa các loài này với nhau.

2.1.3. Nguồn gốc và phân bố

Cây mía được cho là có nguồn gốc từ vùng nam Thái Bình Dương.

- ❖ *S. spontaneum* xuất hiện trong quần thể hoang dại ở phía đông và nam Châu Phi, từ suốt vùng Trung Đông đến Ấn Độ, Trung Quốc, Triều Tiên và Malaysia, và từ suốt vùng Thái Bình Dương đến New Guinea.
- ❖ Trung tâm xuất xứ của cây mía có thể là ở miền nam Ấn Độ nơi đã xuất hiện giống *S. robustum* có số lượng NST nhỏ nhất dọc theo bờ sông ở New Guinea và một ít ở các đảo liền kề và đã trở thành cây bản xứ của khu vực này.
- ❖ *S. officinarum* còn gọi là “noble cane” giống với các cây mía nguồn gốc ở New Guinea. Loại mía này chỉ phù hợp với vùng nhiệt đới với điều kiện đất đai và khí hậu thuận lợi.
- ❖ *S. barberi* có thể có nguồn gốc ở Ấn Độ.
- ❖ *S. sinense* có xuất xứ một phần ở Ấn Độ, Indonesia, Trung Quốc, nam Trung Quốc và Triều Tiên.
- ❖ *S. edule* là loại không thể sản xuất mùa màng như *S. robustum* và chỉ tìm thấy được ở New Guinea và các đảo kế cận.

Cây mía hiện tại là cây trồng chính tại nhiều nước vùng nhiệt đới. Vĩ độ cao nhất mà cây mía được trồng là tại Natal, Argentina và tại cực nam của Australia (Phan Gia Tân, 1990. *Cây mía*).

2.1.4. Nhân giống

Để nhân giống mía người ta thường trồng bằng thân mía cắt từ cây mía chưa trưởng thành có thời gian trồng từ 6 - 8 tháng tuổi. Những đoạn thân được cho là tốt nhất nếu được lấy từ đốt thứ ba từ dưới lên của cây mía vì chồi ở đốt này còn non và ít bị khô. Đoạn thân có thể được trồng xiên theo một góc 45^0 hay cũng có thể đặt nằm ngang luôn lên trên luống. Ước tính cần 12.500 - 20.000 đoạn thân để trồng hết 1 hecta. Mía là cây trồng quanh năm với thời gian từ 3 - 6 năm trước khi được đốn bỏ và trồng lại. Vụ đầu tiên được gọi là mía tơ và thường mất khoảng 9 - 24 tháng để cây trưởng thành, nó phụ thuộc vào vùng địa lý. Các vụ mía gốc mất khoảng 1 năm để trưởng thành và thường thì sau khoảng hai vụ mía gốc là người ta đã thay bằng các ruộng mía mới, điều này phụ thuộc vào năng suất và sự chậm suy tàn của giống.

2.1.5. Sản lượng

Năng suất cao nhất của mía về chỉ số calories trên đơn vị diện tích là 10 tấn đường (sucrose) trên hecta ở Barbados. Sản lượng cao nhất đạt được ở Hawaii là 22 tấn sucrose trên hecta, nhưng giống mía này cần đến 2 năm hay hơn mới có thể đạt được trạng thái thành thực ở khu vực này. Sản lượng mía đã được cải thiện và gia tăng đáng kể trong suốt 100 năm qua nhờ quá trình cải tiến giống, đặc biệt là nhờ vào việc sử dụng phân bón, kiểm soát được côn trùng và các loại bệnh, cơ giới hóa đồng ruộng và nhà máy, và việc tạo ra nhiều giống mới cho năng suất cao.

2.1.6. Chế biến và sử dụng

Trước khi sản phẩm đường được làm ra lần đầu tiên ở Ấn Độ khoảng 1.000 năm trước Công Nguyên, nhờ vào việc đun sôi dịch chiết nước mía thì cây mía ban đầu được trồng chỉ nhằm mục đích làm thực phẩm mà thôi. Ngày nay cây mía được nhiều ngành công nghiệp sử dụng và là một trong những sản phẩm được sử dụng rộng rãi và có giá trị của mỗi quốc gia.

- Khoảng 1 tấn đường thô có thể thu được khi chế biến 8 - 9 tấn mía. Loại đường thô màu nâu này có thể được tinh chế thành đường trắng sạch hơn.
- Cây mía được sử dụng trong nhiều mục đích khác hơn nữa chứ không riêng gì việc sản xuất ra đường:

- ❖ Mật đường là sản phẩm phụ trong quá trình chế biến đường, nó là chất lắng xuống khi không còn khả năng kết tinh thành đường. Gần 2,7 % mật đường hình thành khi chiết xuất 1 tấn mía. Mật đường được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau: dùng để làm phân bón cho đất trồng mía, được vô trùng và lên men để tạo ra nhiều loại sản phẩm khác nhau như cồn vô trùng, rượu rum, hay ethyl alcohol.
- ❖ Sản phẩm còn lại sau quá trình ép nước mía đó là bã mía được dùng như là nguồn nhiên liệu chính của các nhà máy đường, nó còn được dùng để làm giấy, bìa cứng, bìa và tường bằng giấy ép cứng.

2.1.7. Vị trí kinh tế của cây mía

Hiện nay ở nước ta mía là nguyên liệu duy nhất để chế biến ra đường, nên mía là một cây trồng quan trọng trong cơ cấu cây thực phẩm. Đường là thức ăn lành tính dễ tiêu, giàu năng lượng. Một cân đường cung cấp năng lượng tương đương với 0,5 kg mỡ, 50 - 60 kg rau quả. Đường cung cấp 10 % nhu cầu năng lượng của cộng đồng. Trên thế giới năng lượng do đường cung cấp bằng 7 % năng lượng do các loại ngũ cốc cung cấp.

Đường có thị trường tiêu thụ ổn định do nhu cầu về đường trong nước ngày càng tăng cao. Đường lại là mặt hàng chế biến bằng công nghệ hiện đại nên chất lượng ổn định, dễ dàng đạt tiêu chuẩn quốc tế, cho nên nếu sản xuất nhiều sẽ xuất khẩu ra bất cứ nước nào trong khu vực. Vì vậy nên người trồng mía không có gì lo ngại về thị trường tiêu thụ.

Mía là cây xóa đói giảm nghèo cho nông dân trung du, miền núi, là cây có hiệu quả kinh tế cao. Do mía là cây hàng năm, thích hợp với nhiều loại đất, bộ rễ bám sâu nên có khả năng chịu hạn khá, có thể trồng trên đất đồi và trung du miền núi. Vì mía có khả năng lưu gốc tới vụ sau nên đỡ công và giống trồng. Mía là cây có sản lượng cao (200 - 250 tấn sinh khối/1ha/năm). Nhờ những ưu thế trên mà cây mía trở thành cây làm giàu cho nhiều gia đình, nhiều khu vực như Thanh Hóa, Nghệ An, Phú Yên, Bình Định, Quảng Ngãi, ...

Mía là cây năng lượng cuối thế kỷ XX và về sau. Do nguồn nhiên liệu địa khai ngày càng cạn kiệt trong khi nhu cầu năng lượng trên thế giới càng tăng nên việc tìm ra một nguồn nhiên liệu thay thế có ý nghĩa rất quan trọng. Nguồn năng lượng từ thực vật là hướng được nhiều quan tâm vì đây là nguồn năng lượng tái tạo được hàng năm không bao giờ cạn kiệt. Trong đó, cây mía được coi là cây năng lượng hàng đầu trong các loại thực vật có thể sản xuất năng lượng lỏng. Từ một tấn mía có thể sản xuất ra 35 - 50 lít cồn 96⁰, có thể dùng làm nhiên liệu cho động cơ. Ở Brazil từ lâu người ta đã sản xuất cồn từ mía để thay thế xăng chạy ô tô vận tải.

Mía là cây kiêm dụng, ngoài đường, cellulose trong bã mía có thể làm giấy, làm gỗ ép thay cho một phần gỗ rừng. Mía là cây ngắn ngày lại là cây đặc biệt cao sản nên rất có nhiều triển vọng trong lĩnh vực này.

Mía với thành phần hóa học rất phong phú nên ngày càng được nhiều ngành công nghiệp quan tâm khai thác. Saccarose được ngành đường khai thác để sản xuất đường trắng. Cellulose được ngành giấy và ngành gỗ ép khai thác. Mật rỉ trong quá trình lên men, chưng cất và các phương pháp hóa học khác có thể sản xuất ra rượu các loại, cồn tinh khiết, acid lactic, acid nitric, acid glutamic, men thực phẩm, ...

2.1.8. Sản xuất protein tái tổ hợp từ mía

Việc sử dụng cây trồng như một nhà máy sinh học có năng suất cao đòi hỏi cả một hệ thống chuyển biến nạp và khả năng sản xuất, tích lũy ở mức độ cao các protein tái tổ hợp có giá trị kinh tế cao. Wang và cộng sự (2001) đã tạo ra cây mía chuyển gene tạo ra protein được liệu có giá trị cao là granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). Trên một vài dòng mía đã tạo ra tới 0,03 % protein tổng số giống GM-CSF. GM-CSF được sản xuất từ mía có hoạt tính tự nhiên được chỉ ra trong thử nghiệm sự tăng sinh tế bào xương người. Dịch trích từ mía kích thích sự phân chia của tế bào tủy xương.

2.1.9. Bệnh trên cây mía

Theo thống kê ở các nước trồng mía hiện nay thì có tất cả 126 bệnh hại mía trên thế giới (Philippe Rott, 2000), trong đó có 73 bệnh hại phổ biến. Bệnh hại được gây ra bởi 8 nhóm tác nhân chính cho ở Bảng 2.1.

Bệnh do nấm gây ra có số lượng nhiều nhất cũng như là gây thiệt hại nhiều nhất như bệnh đốm vòng (Ring spot), bệnh mốc sương (Downy mildew) và bệnh than (Smut).

Bảng 2.1: Thống kê nhóm tác nhân gây bệnh và số lượng bệnh xảy ra trên cây mía.

Nhóm tác nhân gây bệnh	Số lượng bệnh gây ra
Bệnh do virus	9
Bệnh do phytoplasma	2
Bệnh do vi khuẩn	9
Bệnh do nấm	68
Tuyến trùng và chưa rõ tác nhân	24
Thực vật bán ký sinh	3
Dinh dưỡng, môi trường	9
Ảnh hưởng của thuốc trừ cỏ	2
Tổng cộng	126

(Nguồn: Hà Đình Tuấn, 2004)

2.2. Bệnh than

2.2.1. Nguồn gốc và phân bố

Bệnh được ghi nhận đầu tiên vào năm 1877 tại Natal bởi Mc Martin, bệnh cũng được báo cáo tại hiệp hội “Victoria Planters” Association vào năm 1982. Sau đó bệnh được báo cáo ở tất cả các nước trên thế giới. Bệnh gây thành dịch rất nghiêm trọng tại Cuba, Nhật và Mỹ. Tại Ấn Độ, bệnh gây thiệt hại trầm trọng cho mía vào những năm 1942 - 1943, hơn 66 % diện tích trồng mía của bang Bihar bị nhiễm bệnh. Các giống bị nhiễm nặng là Co419, Co740, Co975... Trong hơn 102 nước trồng mía trên thế giới bị bệnh than gây thiệt hại, chỉ trừ nước Úc và những hải đảo lân cận do có khí hậu khô và nóng là ít bị nhiễm bệnh này (Vũ Triệu Mân, 2003).

Ở nước ta bệnh than là một trong những bệnh nguy hiểm trên cây mía, cần phải có những biện pháp kịp thời để hạn chế thiệt hại do bệnh gây ra.

2.2.2. Triệu chứng

Khi cây mía bị nấm xâm nhập, cây trở nên còi cọc, biến dạng, mất khả năng tạo lóng, ở gốc đẻ nhiều nhánh nhỏ, các mầm mới ra hầu hết đều nhiễm bệnh, thân mía nhỏ bé lại, từ ngọn đâm lên một roi than màu đen cong xuống, có khi roi dài cả mét. Bên ngoài roi bao phủ một lớp mang đầy bào tử dạng bột, dễ bung ra, lan truyền theo gió, nước,...đi rất xa (Hình 2.1). Tính chất nguy hiểm của bệnh này là mỗi roi than mang hàng ngàn bào tử nấm, trung bình một roi than có khoảng 5.000 triệu bào tử.



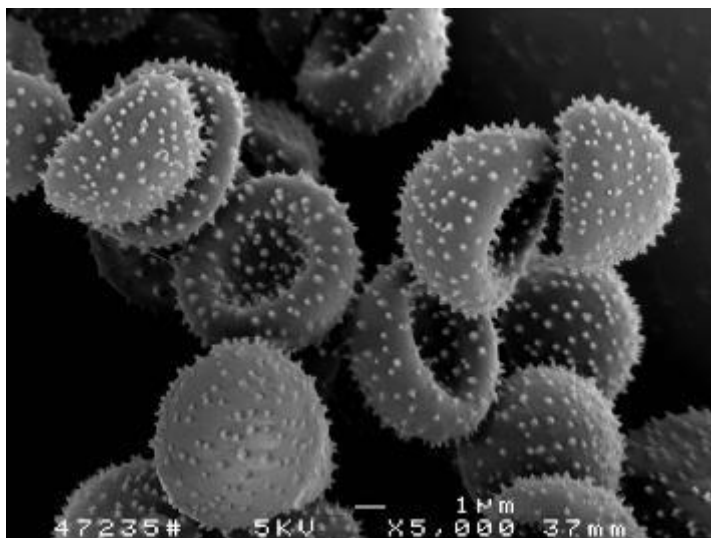
Hình 2.1: Triệu chứng bệnh than trên mía (Comstock và Lentini, 2006).

2.2.3. Tác nhân gây bệnh

Bệnh do nấm *Ustilago scitaminea* Sydow, họ *Ustilaginaceae*, bộ *Ustilaginales*, lớp *Hemibasidiomycetes*. Cơ quan sinh sản không có quả thể, sợi nấm phát triển trong toàn thân cây và có khi lan sang cả mầm thân cây. Sợi nấm hoạt động mạnh trong các tế bào non của cây, chúng phát triển giữa các tế bào và có vòi hút. Đến giai đoạn hình thành cơ quan sinh sản, chúng tập trung lại thành một khối chặt ở lóng thân cuối cùng. Các sợi nấm từng bước phân cắt theo chiều ngang và chiều dọc tạo thành các bào tử hậu (*chlamydospore*). Bào tử hậu là giai đoạn bắt buộc trong chu kỳ phát triển của nấm bệnh. Bào tử hậu có dạng hình tròn, bề mặt vỏ bào tử gợn gai nhỏ hoặc nhẵn, màu sắc thay đổi từ nâu, nâu vàng, đen, chúng có đường kính 6 – 11 μm , trung bình 8,6 μm . (Hình 2.2).

Bào tử hậu nảy mầm trong điều kiện ẩm và ấm, hình thành đám đa bào thường có 3 - 4 tế bào và một số không ổn định, các bào tử đám dài 25*3 μm sắp xếp thành từng

nhóm 2 - 3 cái. Bào tử hậu hình thành từ các sợi nấm hai nhân, phân chia tế bào tạo thành một khối bột đen bao gồm toàn bào tử nấm. Khối bào tử này có kích thước thay đổi từ 15 - 50 cm và dài hơn. Nhiệt độ thích hợp cho sự nảy mầm của bào tử nấm từ 21 – 30 °C, tối thiểu là 5 °C, tối đa là 40 °C. Tuy nhiên ở nhiệt độ 25 °C, nấm sinh sản rất nhiều bào tử, pH thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của nấm là 6,5 (Nguyễn Văn Tuất, 2002).



Hình 2.2: Bào tử nấm (Wada, 1999).

2.2.4. Đặc điểm phát sinh phát triển bệnh

- ❖ Bệnh thường xâm nhiễm vào tế bào non của cây, ở mầm cây và ở cả ngay lát cắt đầu hom mía.
- ❖ Bệnh lan truyền bằng bào tử theo gió, nước mưa, nước tưới, bào tử bám bên ngoài cơ thể côn trùng, qua dụng cụ chăm sóc, qua hom trồng và qua đất.
- ❖ Bào tử có khả năng tồn tại rất lâu trong đất, khi gặp điều kiện thuận lợi là phát triển gây hại và dễ dàng lây lan trong tự nhiên.
- ❖ Một số giống nhập nội nhiễm bệnh than nặng là: F134 (Đài Loan), Co715 (Ấn Độ), NCO310 (Nam Phi), Việt đường 77-9 (của Trung Quốc lai tạo), Roc1 (Đài Loan) (Trần Văn Sôi, 2003).

2.2.5. Thiệt hại về kinh tế

Bệnh có thể làm giảm năng suất đến trên 50 %, gây thiệt hại trong nhiều năm và ngày càng lan rộng nhanh chóng ra diện tích xung quanh (Ferreira và Comstock, 1989).

2.2.6. Biện pháp phòng trừ

- ❖ Chọn giống chống bệnh: F156, Ja60-5, MY55-14. Không trồng những giống mẫn cảm với bệnh trên những chân đất có mang mầm bệnh.
- ❖ Xử lý hom giống bằng nước nóng 54 – 60 °C trong 2 giờ hoặc dung dịch bordeaux 1 %, dung dịch HgCl₂ 0,1 % trong 5 phút, dung dịch formon 1 %, để khô ráo và ủ kín trong 2 giờ.
- ❖ Biện pháp canh tác: Vệ sinh đồng ruộng, chuẩn bị đất kỹ trước khi trồng, giảm số lần để gốc, đối với mía để gốc cần phải vệ sinh, xử lý loại trừ mầm bệnh sau khi thu hoạch.
- ❖ Trong quá trình chăm sóc mía, cần kiểm tra đồng ruộng thường xuyên, khi phát hiện cây bị nhiễm bệnh, cần phải nhổ bỏ đem đốt hoặc chôn sâu, không để các bào tử nấm lây lan.
- ❖ Áp dụng luân canh đất trồng mía với cây trồng khác (chủ yếu cây họ đậu) để làm giảm và loại trừ mầm bệnh đồng thời cải thiện độ màu cho đất.
- ❖ Phòng trừ tốt sâu đục thân mía là biện pháp hữu hiệu vì từ vết đục của sâu tạo điều kiện cho nấm bệnh xâm nhập, phát triển.
- ❖ Biện pháp hoá học: có thể dùng Score 250ND pha ở nồng độ 0,1 - 0,15 % phun phòng trừ bệnh (Phan Gia Tân, 1990).

2.3. Các phương pháp xác định bệnh than

2.3.1. Dựa vào triệu chứng

Cây mía còi cọc, biến dạng, mất khả năng tạo lóng, ở gốc đẻ nhiều nhánh nhỏ, các mầm mới ra hầu hết đều nhiễm bệnh, thân mía nhỏ bé lại, từ ngọn đâm lên một roi than màu đen cong xuống, có khi roi dài cả mét. Bên ngoài roi bao phủ một lớp mang

đầy bào tử dạng bột, dễ bung ra, mỗi roi than mang hàng ngàn bào tử nấm, trung bình một roi than có khoảng 5.000 triệu bào tử.

2.3.2. Phương pháp chẩn đoán bằng cách nhuộm mắt mầm và soi dưới kính hiển vi huỳnh quang (Shinha và ctv, 1982).

Nhuộm mắt mầm với thuốc nhuộm Trypanblue (0,1 %) + Sodium hydroxide (6 %), hoà theo tỉ lệ 1:1. Hệ sợi nấm sẽ bắt màu với thuốc nhuộm nên có màu xanh.

Các bước tiến hành

- ✓ Gọt mỏng dần cho đến khi xuất hiện đỉnh sinh trưởng.
- ✓ Bóp nhẹ: Thu được đỉnh sinh trưởng bỏ vào nước cất.
- ✓ Ngâm đỉnh sinh trưởng trong thuốc nhuộm 3,5 giờ.
- ✓ Rửa qua nước cất.
- ✓ Chuyển qua dung dịch cồn 80 % trong thời gian 2 phút.
- ✓ Chuyển qua ống nghiệm thuỷ tinh chứa 1 ml Lactophenol, đun sôi 2 phút.
- ✓ Soi ở độ phóng đại 40 lần.

2.3.3. Phương pháp ELISA

Nguyên lý ELISA

Kỹ thuật ELISA gồm ba thành phần tham gia phản ứng: Kháng nguyên, kháng thể và cơ chất tạo màu, gồm hai bước:

- Phản ứng miễn dịch học: Sự kết hợp kháng nguyên – kháng thể.
- Phản ứng hóa học: Nhờ hoạt tính của enzyme để giải phóng oxy nguyên tử và chính oxy nguyên tử này oxy hóa cơ chất tạo màu. Cơ chất tạo màu thay đổi màu chứng tỏ sự có mặt của enzyme và chứng minh sự kết hợp kháng nguyên với kháng thể.

2.3.4. Phương pháp PCR

Giới thiệu sơ lược về PCR

Kỹ thuật PCR là một phương pháp *in vitro* để tổng hợp DNA dựa trên khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này

thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và một cặp primer đặc hiệu cho đoạn DNA này. Hiện nay, kỹ thuật này được sử dụng rộng rãi để phát hiện, tạo ra các đột biến gen, chẩn đoán bệnh, biện pháp cắt mầm bệnh trên người, vật nuôi và thực phẩm.

Phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm ba bước như sau:

- Bước 1 (tách sợi đơn DNA, denaturation): ở điều kiện nhiệt độ cao phân tử DNA từ mạch đôi tách ra thành dạng mạch đơn, thường là $94^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$ trong vòng 30 giây – 4 phút.
- Bước 2 (bước lai, annealing): trong bước này, ở nhiệt độ nhỏ hơn T_m (nhiệt độ nóng chảy) của các primer cho phép các mồi bắt cặp với mạch khuôn. Trong thực nghiệm nhiệt độ này dao động trong khoảng $40^{\circ}\text{C} - 70^{\circ}\text{C}$ tùy thuộc T_m của các mồi sử dụng và kéo dài từ 30 – 60 giây tùy thuộc vào kích thước sản phẩm khuếch đại.
- Bước 3 (bước kéo dài, elongation): dưới tác động của DNA polymerase, các nucleotide lần lượt gắn vào mồi theo nguyên tắc bổ sung với mạch khuôn. Mạch mới được tạo thành từ mồi được nối dài. Nhiệt độ phản ứng là 72°C .

Trong phản ứng PCR một chu kỳ bao gồm 3 bước trên sẽ được lặp lại nhiều lần, làm gia tăng số lượng sản phẩm theo cấp số nhân. Theo tính toán sau 30 đến 40 chu kỳ, sự khuếch đại sẽ cho ra khoảng 10^6 bản sao. Sau phản ứng PCR, các DNA sản phẩm được nhuộm bởi Ethidium Bromide và có thể quan sát thấy thông qua việc điện di sản phẩm PCR trong gel agarose và quan sát dưới tia UV (bước sóng 312 nm).

Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phản ứng PCR

◆ DNA khuôn

DNA khuôn dùng trong phản ứng PCR phải thật tinh sạch nhưng đôi khi kỹ thuật này cũng cho phép khuếch đại DNA thu nhận trực tiếp từ dịch chiết tế bào mà vẫn cho kết quả tốt, thông thường phương pháp này được áp dụng trong chẩn đoán. Lượng DNA khuôn dùng trong phản ứng PCR là một lượng thật nhỏ khoảng 1 μg ,

ngoài ra, nếu sử dụng các enzyme polymerase cho hiệu quả cao còn có thể giảm lượng DNA khuôn xuống còn 100 ng. Nếu lượng DNA khuôn quá cao có thể tạo ra những sản phẩm phụ không mong muốn hay còn gọi là dương tính giả. Khuôn DNA có thể được thu nhận từ các mẫu không được bảo quản tốt, đã bị phân hủy từng phần như trong tế bào máu lâu ngày, tinh dịch đã khô, hóa thạch, tóc, móng tay của người đã chết.

◆ Enzyme

Thông thường DNA polymerase dùng trong phản ứng PCR phải là men chịu nhiệt cao. Enzyme thường được sử dụng hiện nay là *Taq* polymerase tách chiết từ vi khuẩn suối nước nóng *Thermus aquaticus*.

Ngày nay, nhiều loại men polymerase chịu nhiệt khác đã được phát hiện và đưa ra thị trường với chức năng hoàn thiện hơn và chuyên biệt hơn. Như enzyme *Tth* polymerase được tách từ *Thermus thermophilus*, enzyme này hoạt động như một enzyme phiên mã ngược thông qua sự hình thành cDNA trong điều kiện có RNA khuôn và ion Mg^{2+} , *Tth* polymerase lại xúc tác phản ứng khuếch đại DNA.

◆ Primer và nhiệt độ

Việc thiết kế và chọn primer phải đáp ứng đủ các yêu cầu sau

- ❖ Trình tự của primer được chọn sao cho không có sự bắt cặp bổ sung giữa primer “xuôi” và primer “ngược”, không có những cấu trúc “primer dimer” do sự bắt cặp bổ sung giữa các thành phần khác nhau của một primer.
- ❖ “Nhiệt độ nóng chảy” (T_m) của primer xuôi và primer ngược không được cách biệt quá xa. Thành phần nucleotide của các primer phải cân bằng tránh lặp đi lặp lại nhiều lần.
- ❖ Các primer phải đặc trưng cho trình tự DNA cần khuếch đại, không trùng với trình tự lặp lại trên gen.
- ❖ Trình tự nằm giữa hai primer xuôi và ngược không quá lớn, phản ứng PCR tối ưu nhất cho những trình tự nhỏ hơn 1 kb.

♦ Các thành phần khác trong phản ứng PCR

- ❖ Bốn loại nucleotide (dNTP) thường được sử dụng ở nồng độ là 200 μM /mỗi loại nucleotide. Nếu nồng độ cao hơn dễ dẫn đến sự khuếch đại sản phẩm dương tính giả hay tạp nhiễm. Sự mất cân bằng trong thành phần các nucleotide lại làm tăng các lỗi sao chép của polymerase.
- ❖ Nồng độ Mg^{2+} cũng là một nhân tố ảnh hưởng đến quá trình khuếch đại, nồng độ MgCl_2 càng cao càng làm giảm độ đặc hiệu của *Taq* DNA polymerase. Nồng độ tối ưu của ion này không tuân theo một quy luật chung, thông thường nồng độ tối ưu này phải được xác định riêng cho từng phản ứng.

♦ Số lượng chu kỳ phản ứng

Số lượng chu kỳ trong một phản ứng PCR thông thường không vượt quá 40 chu kỳ. Do phản ứng PCR diễn tiến qua hai giai đoạn, trong giai đoạn đầu số lượng bản sao tăng theo cấp số nhân tỉ lệ với lượng mẫu ban đầu, sau đó hiệu quả khuếch đại giảm hẳn vì những nguyên nhân sau: sự phân hủy và cạn kiệt các thành phần của phản ứng; sự xuất hiện những sản phẩm phụ làm ức chế phản ứng khuếch đại; các bản sao vừa được tổng hợp không bắt cặp với môi mà chúng tự bắt cặp với nhau. Số chu kỳ cho một phản ứng còn phụ thuộc vào số lượng bản mẫu ban đầu.

♦ Thiết bị và dụng cụ cho phản ứng

- ❖ Thiết bị cho phản ứng PCR như máy PCR cần đáp ứng được yêu cầu thay đổi nhiệt độ thật nhanh và chính xác, tránh tối đa sự bốc hơi nước trong quá trình phản ứng.
- ❖ Eppendorf dùng cho phản ứng PCR phải là một loại có vách mỏng và có khả năng truyền nhiệt tốt.

Các ứng dụng của phương pháp PCR

Phương pháp PCR có nhiều ứng dụng rộng lớn kể cả trong lĩnh vực nghiên cứu và đời sống. Dưới đây là một số ứng dụng tiêu biểu của phương pháp này:

Trong lĩnh vực công nghệ sinh học, kỹ thuật PCR được sử dụng trong việc lập bản đồ gen, dòng hoá gen, giải trình tự DNA và phát hiện gen. Trong đời sống, kỹ thuật PCR nhằm tạo ra một lượng lớn bản sao DNA mục tiêu trong ống nghiệm từ một lượng khuôn DNA rất nhỏ.

Người ta có thể lấy một lượng nhỏ DNA khuôn từ một giọt máu, một sợi tóc và sử dụng kỹ thuật PCR để tạo ra hàng triệu bản sao DNA mong muốn nhằm phục vụ cho các khảo sát trong pháp y, trong điều tra hoặc tính di truyền. Trong khi đó với một lượng DNA nhỏ như vậy thì không thể sử dụng trong pháp y hoặc di truyền nếu không sử dụng PCR. Do vậy, ưu điểm của công cụ PCR là khả năng khuếch đại chính xác một trình tự DNA mong muốn với một lượng lớn. Hiện nay, phương pháp PCR còn được sử dụng trong phát hiện các virus, vi khuẩn gây bệnh cho người và động vật cũng như việc kiểm nghiệm vi sinh gây bệnh trong thực phẩm, mỹ phẩm, trong nước.

Sử dụng phương pháp PCR tổng hợp mẫu dò cho các thử nghiệm S₁ nuclease

Phương pháp S₁ nuclease dựa trên sự lai của mẫu dò DNA mạch đơn với RNA, tiếp theo hỗn hợp lai được xử lý với enzyme S₁ nuclease để phân cắt các RNA mạch đơn không bắt cặp với mẫu dò. Cuối cùng phương pháp lai sẽ được phát hiện bằng phương pháp phóng xạ dò tự ghi hay đo mật độ quang. Thử nghiệm S₁ nuclease có ưu điểm là độ nhạy cao, cho kết quả nhanh hơn Northern blot. Các mẫu dò DNA cho phương pháp này được tổng hợp đơn giản bằng phương pháp PCR.

Sử dụng PCR để sàng lọc

Sàng lọc các gen trong thư viện gen

Việc phân lập một dòng từ thư viện bộ gen hay cDNA được thực hiện bằng phương pháp lai đĩa và màng lọc (plating and filter hybridization) lặp lại nhiều lần. Tuy nhiên, phương pháp này không chỉ tốn thời gian và nhân lực mà còn không chính xác như cho dương tính giả trong lai màng lọc. Các vấn đề này có thể khắc phục khi sử dụng PCR ở những lần sàng lọc đầu tiên trước khi lai bằng màng lọc. Việc sàng lọc bằng PCR có những thuận lợi sau:

- Các dòng dương tính được xác định dựa vào các vạch có kích thước chính xác trên gel, do đó loại bỏ được những điểm dương tính giả của lai bằng màng lọc.
- Tiết kiệm thời gian.

Sàng lọc chuột chuyển gen

Hiện nay, việc sản xuất chuột chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm trực tiếp các DNA vào phôi chuột là một kỹ thuật chuẩn dành cho phân tích phân tử và phát triển. Phương pháp truyền thống dùng sàng lọc chuột chuyển gen là Southern blot dùng mẫu dò đánh dấu bắt đặc hiệu với các DNA đã tiêm vào chuột. Tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi lượng mẫu lớn, tinh sạch (mẫu mô) và tốn nhiều thời gian (ít nhất 5 ngày). Trong khi đó phương pháp PCR cho kết quả nhanh (vài giờ) và chỉ cần lượng mẫu ít do đó ít làm tổn thương chuột chuyển gen nhất là với chuột non.

Sử dụng PCR cho việc thiết kế nhanh các gene tổng hợp

Thông thường các gen của tế bào eukaryote biểu hiện kém trong các hệ thống biểu hiện ở vi khuẩn (prokaryote). Một nguyên nhân gây ra sự biểu hiện kém này là do các codon trên bộ gen của tế bào eukaryote không được “ưa thích” ở tế bào vi khuẩn. Do đó người ta thiết kế một gen tổng hợp được dùng để biểu hiện protein của eukaryote mà nó có mang các codon “ưa thích” ở vi sinh vật. Điều này được thực hiện nhanh chóng bằng PCR hai bước (two - step PCR). Trong phương pháp này, cần biết trước trình tự gen cần tổng hợp, tổng hợp các cặp mồi có trình tự tương ứng với gen cần tổng hợp và có khả năng bắt cặp với nhau trong khoảng từ 20 nucleotide. Hai phản ứng PCR được thực hiện liên tiếp, phản ứng thứ nhất tạo ra DNA bản mẫu đúng với gen tổng hợp mà sau đó được khuếch đại trong phản ứng thứ hai. Phương pháp này là một công cụ rất hữu ích cho việc thao tác trên nucleotide acid và thiết kế các gen tổng hợp.

Sử dụng PCR trong việc kiểm nghiệm

Hiện nay, có nhiều ứng dụng của phản ứng PCR trong các bộ kit thương mại dùng để phát hiện đặc hiệu các chủng vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm, bệnh phẩm hoặc những loài khó nuôi cấy.

Trong kiểm nghiệm bệnh phẩm

Bằng phản ứng PCR, có thể phát hiện virus, vi khuẩn gây bệnh cho người và vật nuôi. Gen đặc trưng của virus hoặc vi khuẩn gây bệnh được khuếch đại, sau khi khuếch đại được một lượng lớn gen đặc trưng, kiểm tra khuếch đại bằng điện di trên gel agarose, rút ra kết quả có hoặc không có nhiễm virus hoặc vi khuẩn gây bệnh trên mẫu bệnh phẩm cần kiểm tra.

Trong kiểm nghiệm thực phẩm, mỹ phẩm, nước

Việc phát hiện vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm, mỹ phẩm, nước bằng phương pháp PCR cũng tương tự như việc phát hiện virus và vi sinh vật gây bệnh trên bệnh phẩm. Nhưng đôi khi cần phải qua bước nuôi cấy tăng sinh chọn lọc vi sinh vật cần phát hiện trước khi tách chiết DNA để thực hiện cho phản ứng PCR. Sau khi nuôi cấy tăng sinh, tiến hành thu tế bào vi sinh vật từ dịch tăng sinh để tách chiết DNA làm khuôn cho phản ứng PCR. Phương pháp này rất đơn giản, dễ thao tác, có thể thực hiện được những vi sinh vật khó nuôi cấy, ít tốn kém về mặt nhân sự, chi phí thấp, độ chính xác và độ nhạy cao và một ưu điểm lớn nhất đó là cho kết quả trong thời gian ngắn.

Định lượng bằng phương pháp PCR

PCR thường được sử dụng để nghiên cứu các trình tự (DNA hay RNA) có số lượng bản sao thấp, không thể định lượng bằng các phương pháp lai phân tử cổ điển. Về nguyên tắc người ta có thể xác định số lượng bản mẫu ban đầu qua tính toán dựa vào sản phẩm cuối cùng, số chu kỳ đã thực hiện, nhưng trong thực tế người ta chỉ có thể định lượng tương đối một trình tự đích, tức so sánh hàm lượng của nó trong nhiều nguồn khác nhau, ví dụ như khi muốn so sánh mức độ biểu hiện của gen $THR\beta$ (Thyroid Hormone Redeptor β) vốn là một gen có biểu hiện rất yếu trong các loại mô khác nhau. Trong thực nghiệm, người ta tiến hành khuếch đại đồng thời trình tự đích và một trình tự đối chứng có nồng độ đã biết. Trình tự đích và một lượng xác định trình tự đối chứng được khuếch đại trong cùng một ống nghiệm, tốt nhất là với cùng một cặp môi. Điều đó có nghĩa là hai trình tự phải có hai đầu nối bắt cặp với môi giống nhau nhưng phần trung tâm có độ dài khác nhau (do sự gắn thêm vào hay cắt bớt đi một đoạn trên trình tự đối chứng). Như vậy, sau phản ứng, người ta có thể phân biệt

hai trình tự này dựa vào kích thước bằng phương pháp điện di. Nếu sản phẩm khuếch đại của trình tự đối chứng không thay đổi trong các phản ứng (chứng tỏ hiệu quả khuếch đại là như nhau trong tất cả các phản ứng) thì người ta có thể so sánh hàm lượng sản phẩm của trình tự đích, từ đó so sánh được số lượng bản mẫu ban đầu. Điều quan trọng là số chu kỳ khuếch đại không được vượt quá giai đoạn đầu của phản ứng PCR khi mà số lượng bản sao còn tỷ lệ thuận với số lượng mẫu ban đầu.

Một số ứng dụng khác của kỹ thuật PCR

Ở các nước phát triển, PCR đã được sử dụng rộng rãi như công cụ chẩn đoán trong y học để phát hiện những bệnh di truyền, được sử dụng trong điều tra tội phạm để xác định những người bị tình nghi ở cấp độ phân tử, được sử dụng trong xác định quan hệ huyết thống và là một công cụ hữu hiệu trong việc giải trình tự các bộ gen người.

Những hạn chế của phương pháp PCR

Do độ nhạy rất cao của PCR đồng thời với thao tác đơn giản, người ta có khuynh hướng sử dụng phương pháp này để giải quyết nhiều vấn đề. Tuy nhiên ta không thể quên rằng 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 kể ba vấn đề lớn khi sử dụng 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 3 kb. Việc sử dụng PCR đối với các độ dài dưới 1,5 kb 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 đặt ra lớn nhất đối với PCR, gắn liền với khả năng khuếch đại bản sao của phương pháp này

Vấn đề đặt biệt cấp thiết trong những ứng dụng về chẩn đoán, dự phòng vì hậu quả có thể rất nghiêm trọng. Nguồn ngoại nhiễm lớn nhất thường là các sản phẩm khuếch đại của những lần thao tác trước. Người ta đã chứng minh được rằng việc mở nắp các

ống nghiệm sau mỗi lần khuếch đại trong một khoảng không gian của phòng thí nghiệm sẽ khiến cho các phân tử đã được khuếch đại thoát ra khỏi ống nghiệm bay lơ lửng trong không khí và bám vào tường, cửa, thiết bị, dụng cụ, rồi nhiễm 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 như thiết lập phản ứng PCR và phân tích các sản phẩm khuếch đại phải được tiến hành ở các địa điểm cách xa nhau.
- ❖ Dụng cụ dùng để thiết lập phản ứng (micropipette) không sử dụng vào các thao tác khác. Đầu tip sử dụng với micropipette phải có lớp lọc tránh sự nhiễm đầu micropipette bởi các phân tử khuếch đại khi hút dung dịch phản ứng.
- ❖ Dùng tia tử ngoại để loại bỏ các phân tử còn lại từ các lần khuếch đại trước.
- ❖ Tất cả mọi thành phần của phản ứng đều được chia thành những lượng nhỏ, tính toán sao cho đủ 1,2 lần thao tác.
- ❖ Ngoài ra, các hãng sản xuất còn tung ra thị trường nhiều hệ thống cho phép loại bỏ hoàn toàn sự ngoại nhiễm. Ví dụ hãng Perkin-Elmer-Cetus đề xuất sử dụng dUTP thay vì dTTP; việc thay thế này không ảnh hưởng đến phản ứng. Trước mỗi lần phản ứng kế tiếp, người ta cho thêm vào dung dịch phản ứng uracylglycosylase; enzyme sẽ phân hủy tất cả các DNA có mang dUTP nhiễm từ lần trước. Đồng thời enzyme sẽ bị phân hủy bởi nhiệt ngay từ lần biến tính đầu tiên. Bất lợi của hệ thống này là giá thành cao.

◆ Các sai sót gây ra do *Taq* polymerase

Sự sao chép bởi *Taq* polymerase cho tỷ lệ sai khá cao (cứ 10.000 nucleotide thì enzyme gắn sai 1 nucleotide (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 1998)). Đặc tính này không nghiêm trọng nếu ta chỉ cần xem xét kích thước hay sự có mặt của một sản phẩm khuếch đại, nhưng có ý nghĩa lớn nếu cần xác định chính xác trình tự nucleotide của DNA. Ta không thể loại bỏ hoàn toàn các sai sót này mà chỉ có thể giảm bớt; ví dụ như đảm bảo sự cân bằng nồng độ các nucleotide trong phản ứng, xác định trình tự của nhiều sản phẩm khuếch đại từ nhiều thao tác riêng biệt, so sánh trước khi đi đến trình tự chính thức (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 1998).

2.4. Tình hình nghiên cứu bệnh than

2.4.1. Trên thế giới:

- ❖ Tạo tính kháng của mía bằng cách nhiễm với *Ustilago scitaminea* (Burner; Grisham và Legendre, 1993).
- ❖ Biện pháp quản lý sự xâm nhập bệnh than vào Australia (Croft và Braithwaite, 2006).
- ❖ Bệnh than trên mía (Comstock và Lentini, 2006).
- ❖ Đánh giá tính miễn cảm bệnh than trong ống nghiệm (Singh và ctv., 2005).
- ❖ Tính đa dạng di truyền của *Ustilago scitaminea* ở lục địa Trung Quốc (Xu; Que và ctv., 2004).
- ❖ Phương pháp chẩn đoán bệnh than (Muñiz; Martínez và ctv., 2004).
- ❖ Sự biến đổi di truyền của *Ustilago scitaminea* (Braithwaite; Bakkeren và ctv., 2004).
- ❖ Khống chế bệnh than ở Nigeria bằng thuốc diệt nấm (Wada, 2003).
- ❖ Loài mới của bệnh than ở Maui (Schenck, 2003).
- ❖ Giảm năng suất ở những giống có tính kháng bệnh than khác nhau (Kumar; Misra và ctv., 2003).
- ❖ Bước đầu nghiên cứu tác động của chất điều hoà sinh trưởng trên mía nhiễm bệnh than (Péros, 2002).
- ❖ Xác định sớm sự nhiễm bệnh than bằng kỹ thuật ELISA (Naik; Jayaraj, 2002).
- ❖ Hình thái và đặc tính của các giống mía miễn cảm và kháng với bệnh than (Da Gloria, 2000).
- ❖ Đánh giá 5 thuốc diệt nấm khác nhau trong việc khống chế bệnh than ở Iran (Sharififar và Kazemi, 1999).
- ❖ Nhuộm mô, một phương pháp hiệu quả để chẩn đoán bệnh than (Nallathambi; Padmanaban và ctv., 1998).

- ❖ Tác động của bệnh than lên năng suất mía (Natarajan và Kalaimani, 1996).
- ❖ Cấu trúc, hình thái của mắt mầm với mức độ kháng khác nhau đối với bệnh than (Da Gloria; Albernas, 1995).
- ❖ Đánh giá một vài thuốc diệt nấm mới trong việc khống chế bệnh than (Olufolaji, 1993).
- ❖ Khống chế bệnh than bằng phương pháp vật lý và hoá học (Vala; Joshi và ctv., 1992).
- ❖ Tác động của nước nóng và thuốc diệt nấm trong khống chế bệnh than (Elrasoul; Mohamed và ctv., 1991).
- ❖ Cơ chế kháng bệnh than ở mía (Padmanaban; Alexander, 1988).
- ❖ Bệnh than, so sánh sự nhiễm tự nhiên và nhiễm nhân tạo (Comstock; Wu và ctv., 1987).
- ❖ Sự phát tán bào tử của nấm *Ustilago scitaminea* (Sreeramulu và Vittal, 1972).
- ❖ Theo Wada (2003), các thuốc sau đây có tác dụng chống lại nấm *Ustilago scitaminea*: Mancozeb, carbendazim + maneb, metalaxyl + carboxin + furathiocarb, pyroquilon, benomyl và chlorothalonil. Tuy nhiên kiểm soát tốt nhất lần lượt là pyroquilon, carbendazim + maneb, metalaxyl + carboxin + furathiocarb.
- ❖ Theo Shingte và More (1982), Kiểm soát bệnh than với hỗn hợp thuốc diệt nấm Bavistin và Bayleton. Dùng nước nóng 50 °C + 0,1 % Bavistin [carbendazim] hoặc + 0,1 % Bayleton [triadimefon] ngâm trong 2 giờ giúp khống chế 100 % bệnh than và kết quả là năng suất mía tăng 24,627 tấn/ha. Khi chỉ dùng với nước nóng thì năng suất chỉ 11 tấn/ha.
- ❖ Theo Schenck (2003), xuất hiện nòi gây bệnh than mới ở Hawaii, giống mía H78-7750 là giống kháng và chưa bao giờ nhiễm với bệnh than. Tuy nhiên, năm 2001 nhiều cánh đồng mía ở Hawaii đã xuất hiện bệnh than trên giống này, giống này nhiễm với nòi mới nhưng vẫn còn kháng với nòi nấm than cũ.

Ustilago scitaminea sẵn sàng lai giữa các nòi, ngay cả giữa các loài để tạo nên nòi mới. Tính miễn cảm của các giống mía ở Hawaii đối với nòi mới (Bảng 2.2).

Bảng 2.2: Tỷ lệ nhiễm bệnh than của các giống mía ở Hawaii đối với nòi mới.

Giống mía	% nhiễm	
	Mía gốc	Mía tơ
H65-7052	15,9	7,7
H77-4643	7,7	7,7
H78-3567	0	0
H78-4153	7,1	7,1
H78-7750	9,0	27,3
H83-7061	33,3	16,7
H87-4319	0	0
H87-5794	0	0
H88-2953	27,3	27,3
H90-7492	0	0

2.4.2. Trong nước

Theo nghiên cứu của Hà Đình Tuấn (2004), thì tỷ lệ nhiễm bệnh than phát sinh và phát triển tăng theo các giai đoạn sinh trưởng của cây mía. Một số giống ngoài sản xuất biểu hiện triệu chứng với tỷ lệ bụi bị bệnh khá cao như giống ROC16 (11,38 %), F156 (2,93 %). Đặc biệt giống ROC10 không xuất hiện triệu chứng ngoài đồng nhưng qua kiểm tra xuất hiện 4,0 % mẫu có tác nhân gây bệnh tiềm ẩn bên trong mắt mầm. Năng suất trên các giống chủng bệnh than thấp hơn đối chứng từ 1,8 – 30,19 %, sự khác biệt về năng suất là do các giống chủng bệnh than có mật độ cây hữu hiệu thấp hơn đối chứng mặc dù đường kính thân và trọng lượng cây không khác biệt.

So sánh hiệu quả một số biện pháp xử lý hom giống phòng trừ bệnh than hại mía (Đỗ Ngọc Diệp và ctv., 2000).

Đánh giá khả năng kháng bệnh than trên một số giống mía có triển vọng (Nguyễn Văn Hoan, 1999).

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Nội dung nghiên cứu

Đề tài thực hiện gồm có 2 nội dung chính:

- ❖ Nuôi cấy, phân lập, tách đơn bào tử và nhân sinh khối nấm *Ustilago scitaminea*.
- ❖ Xây dựng qui trình PCR phát hiện trực tiếp DNA sợi nấm *Ustilago scitaminea* gây bệnh than trên mía.

3.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- ❖ Đề tài được thực hiện từ tháng 05 đến tháng 08 năm 2007.
- ❖ Địa điểm thực hiện: Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hoá Sinh thuộc Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

3.3. Vật liệu nghiên cứu

11 dòng nấm *Ustilago scitaminea* thu thập được từ 11 giống mía khác nhau ở tỉnh Bình Dương, đó là các giống: Comus, F156, H39 – 3633, Ja60 – 5, K84 – 200, My55 – 14, VD86 – 368, R570, ROC10, ROC16, VN84 – 4137.

3.4. Phương pháp tiến hành

3.4.1. Phương pháp lấy mẫu

Dùng kéo cắt các roi than từ mía bệnh cho vào bịch nhựa vô trùng, ghi tên giống mía lên bịch, rồi đặt vào thùng xốp giữ lạnh, đem về trữ ở Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hoá Sinh thuộc Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

3.4.2. Phương pháp phân lập

Dụng cụ: Bình tam giác, đĩa petri, que cấy, đèn cồn, kẹp, cân, ống đong, giấy thấm, nồi hấp, tủ ủ, tủ sấy, bút lông, máy đo pH...

Hoá chất: Môi trường PGA có bổ sung (PGA*) (Bảng 3.1).

Bảng 3.1: Thành phần môi trường PGA*.

Thành phần	Môi trường PGA*
Khoai tây	200 g
Glucose	20 g
CaCO ₃	3 g
Streptomycin sulfat	0,5 g
Agar	20 g
Nước cất	Vừa đủ 1 lít

Cách pha môi trường PGA*:

Khoai tây đã được gọt vỏ rửa sạch, cân đủ 200 g, thái nhỏ, thêm 500 ml nước cất đun sôi trong 20 phút, lọc lấy nước trong cho vào bình tam giác, thêm 20 g agar, 3 g CaCO₃, bổ sung nước cất cho đủ 1 lít, chuẩn pH 7,2, đem hấp khử trùng ở 121 °C/ 15 phút, để nhiệt độ hạ xuống khoảng 60 °C cho vào 0,5 g Streptomycin sulfat lắc nhẹ đều, sau đó phân vào mỗi đĩa petri vô trùng 15 ml môi trường.

Phương pháp phân lập: Lấy bào tử nấm từ các roi than, rửa chúng 3 lần trong nước vô trùng chứa 500 ppm streptomycin sulfat, cho bào tử vào nước vô trùng, dùng que cấy lấy bào tử, cấy ria lên đĩa môi trường PGA*, đem ủ ở nhiệt độ 28 °C trong thời gian 24 giờ, sau đó cấy khuẩn lạc sang môi trường mới và tiếp tục cấy truyền đến khi thu được giống nấm thuần chủng.

3.4.3. Phương pháp tách đơn bào tử

Dụng cụ: kim mũi mác, đèn cồn, pipette, lame, kính hiển vi, tủ ủ, giấy thấm, bút lông, máy đo pH...

Sau khi phân lập được dòng nấm *Ustilago scitaminea* thuần chủng, ta tiến hành tách đơn bào tử. Quy trình tách đơn bào tử được thực hiện như sau:

- ❖ Dùng kim mũi mác cạo nhẹ trên bề mặt khuẩn lạc của nấm.
- ❖ Cho bào tử từ kim mũi mác vào cốc chứa nước cất khử trùng.
- ❖ Hút 0,5 ml dung dịch bào tử nhỏ lên lame có trải một lớp mỏng agar.
- ❖ Ủ ở nhiệt độ phòng 12 giờ.
- ❖ Tiến hành quan sát trên kính hiển vi, tìm những bào tử nào nảy mầm riêng lẻ và mọc tách riêng lẻ. Đánh dấu, sau đó tiến hành cắt vùng đánh dấu, cấy vào đĩa petri chứa môi trường PGA*.
- ❖ Dem ủ ở nhiệt độ phòng 3 ngày, để bào tử mọc thành khuẩn lạc.

3.4.4. Phương pháp nhân sinh khối nấm

Dụng cụ: kim mũi mác, nồi hấp, bình tam giác, máy lắc, vải lọc, đèn cồn, tủ lạnh - 20 °C.

Hóa chất: chuẩn bị môi trường PGA* lỏng, cách pha giống với môi trường PGA* nhưng không bỏ agar.

Sau khi thu được khuẩn lạc ta tiến hành nhân sinh khối trong môi trường PGA* lỏng, nhân sinh khối nấm bằng cách lắc trên máy lắc (160 vòng/phút, ở 28 °C). Sau 4 ngày, tiến hành thu sinh khối sợi nấm bằng cách lọc trên vải lọc tiệt trùng. Sau đó làm khô sinh khối, giữ ở nhiệt độ -20 °C.

3.4.5. Phương pháp ly trích DNA tổng số của nấm *Ustilago scitaminea*

Các dụng cụ và thiết bị dùng để ly trích DNA

- Eppendorf 1,5 ml.
- Micropipette các loại.
- Bồn ủ nhiệt (water bath).
- Máy vortex.
- Máy ly tâm lạnh.
- Tủ 4 °C và -20 °C
- Cối và chày để nghiền mẫu
- Đầu típ các loại
- Giấy bạc
- Găng tay

Các hoá chất được sử dụng để ly trích DNA

- ❖ Nitơ lỏng.
- ❖ Lysis buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 50 mM EDTA, 3 % SDS, 1 % β _mercaptoethanol.
- ❖ Hỗn hợp: phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1).
- ❖ Hỗn hợp: chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1).
- ❖ Isopropanol 100 %.
- ❖ Ethanol 70 %.
- ❖ TE 1X: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.

Phương pháp ly trích: DNA nấm được ly trích theo phương pháp của Lee và Taylor (1990).

Quy trình cụ thể:

- ❖ Lấy 1 g sợi nấm khô kiệt nghiền trong nitơ lỏng.
- ❖ Chuyển bột nghiền vào eppendorf 1,5 ml.
- ❖ Thêm 400 μ l lysis buffer, trộn đều. Nếu hỗn hợp quá đặc thì cho thêm lysis buffer. Ủ ở 65 $^{\circ}$ C trong 1 giờ. Di chuyển eppendorf ra khỏi bồn ổn nhiệt.
- ❖ Thêm 300 μ l phenol : chlorophorm : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) lắc nhẹ.
- ❖ Ly tâm 14.000 vòng trong 1 phút ở nhiệt độ 28 $^{\circ}$ C.
- ❖ Chuyển dịch nổi (khoảng 500 μ l) vào eppendorf mới.
- ❖ Thêm vào 300 μ l chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) lắc nhẹ.
- ❖ Ly tâm 14.000 vòng trong 1 phút ở nhiệt độ 28 $^{\circ}$ C.
- ❖ Chuyển dịch nổi (khoảng 300 μ l) vào eppendorf mới.
- ❖ Kết tủa DNA bằng cách thêm vào một phần hai thể tích isopropanol, trộn nhẹ.
- ❖ Ly tâm 14.000 vòng trong 1 phút ở 4 $^{\circ}$ C.
- ❖ Loại bỏ dịch lỏng. Dùng ethanol 70 % rửa sạch nhiều lần.
- ❖ Làm khô DNA, hòa tan trong 50 μ l dung dịch TE 1X và tồn trữ ở -20 $^{\circ}$ C.

Kiểm tra chất lượng DNA: Yêu cầu DNA được tách chiết có chất lượng tốt (tương đối sạch và không bị gãy nhiều).

Định tính DNA bằng phương pháp điện di. Phương pháp này cho phép ta đánh giá chất lượng DNA (có bị gãy nhiều hay không, có tạp không, v.v.). Tuy nhiên không cho biết nồng độ của DNA thu được hay độ sạch của dung dịch DNA một cách chính xác. Quá trình điện di kiểm tra chất lượng được thực hiện như sau:

- ❖ Chuẩn bị gel agrose 0,8 %.
- ❖ Dùng 4 µl mẫu DNA trộn đều với 2 µl loading dye, cho vào giếng gel.
- ❖ Điện di ở hiệu điện thế 100 V, cường độ dòng điện 400 mA, trong 20 phút.
- ❖ Nhuộm Ethidium Bromide 15 phút. Chụp ảnh.
- ❖ Dựa trên băng hình DNA đánh giá chất lượng.
- ❖ Pha dung dịch DNA bằng TE.

Định lượng DNA bằng quang phổ kế:

- ❖ Phương pháp này cho phép ước lượng tương đối chính xác lượng DNA cũng như chất lượng DNA có trong mẫu kết quả thu được.
- ❖ Hàm lượng DNA được tính theo công thức:

$$\text{DNA (ng/}\mu\text{l)} = [(62,9 * \text{OD}_{260\text{nm}}) - (36 * \text{OD}_{280\text{nm}})] * \text{Độ pha loãng}$$

Gồm hai bước:

- ❖ Xây dựng đường chuẩn: Dùng dung dịch TE 1X để tạo đường chuẩn.
- ❖ Pha loãng dung dịch DNA đến nồng độ thích hợp để đo (thường pha loãng 100 lần) với dung dịch TE 1X: Hút 10 µl dung dịch DNA hòa tan với 990 µl TE 1X. Cho vào Curvette. Tiến hành đo OD.

DNA sau khi tách chiết và kiểm tra định tính, định lượng sẽ được bảo quản ở -20 °C.

3.4.6. Tinh sạch sản phẩm ly trích

Sản phẩm DNA tổng số được ly trích có nhiều tạp do nhiều nguyên nhân như protein khử không hết, RNA tạp nhiễm, DNA bị gãy v.v., sẽ được tinh sạch trước khi đem phản ứng PCR. Quy trình tinh sạch sản phẩm DNA tổng số được thực hiện như sau:

Bước 1: Pha loãng mẫu ly trích, 100 µl DNA mẫu với 200 µl TE 1X.

Bước 2: Cho vào eppendorf chứa mẫu 200 µl phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) lắc nhẹ.

Bước 3: Đem ly tâm hỗn hợp ở 12.000 vòng, trong thời gian 1 phút. Tiến hành hút dịch nổi cho vào eppendorf khác. Bước 2 và 3 được thực hiện lại một lần nữa.

Bước 4: Cho vào eppendorf chứa dịch nổi 600 µl ethanol 100 % và 20 µl sodium acetate ủ ở -20 °C, trong 20 phút.

Bước 5: Ly tâm hỗn hợp ở 13.500 vòng, trong thời gian 1 phút.

Bước 6: Loại bỏ dịch nổi. Dùng ethanol 70 % rửa sạch nhiều lần. Làm khô DNA, hòa tan trong 50 µl dung dịch TE 1X và tồn trữ ở -20 °C.

3.4.7. Phương pháp PCR phát hiện nấm *Ustilago scitaminea*

Dụng cụ thí nghiệm:

- Eppendorf các loại.
- Micropipette và đầu típ các loại.
- Máy luân nhiệt

Hóa chất thí nghiệm:

PCR phát hiện dựa vào cặp mồi và quy trình của Albert và Schenck (1996), gồm các thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt cho ở Bảng 3.2.

Cặp mồi được sử dụng là:

bE4: (5'– CGC TCT GGT TCA TCA ACG – 3')

bE8: (5'– TGC TGT CGA TGG AAG GTG T – 3')

- Sản phẩm PCR sau phản ứng được điện di trên gel agarose 1 %, trong dung dịch đệm TAE 1X, hiệu điện thế là 90 V, cường độ dòng điện là 250 mA, trong 20 phút.
- Chỉ tiêu đánh giá: Sự xuất hiện băng DNA khuếch đại chuyên biệt vùng gene *bE* của nấm *Ustilago scitaminea* trên gel điện di có kích thước là 442 bp.

Bảng 3.2: Thành phần các chất trong phản ứng PCR và chu kỳ nhiệt

Hóa chất	Nồng độ đầu	Nồng độ cuối	Thể tích/ phản ứng (μ l)	Chu kỳ nhiệt
Buffer	5 X	1 X	10	
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	5	Khởi động: 94 ⁰ C – 3 phút.
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1	
Primer F	10 pmol/ μ l	1 pmol/ μ l	5	94 ⁰ C – 30 giây } 52 ⁰ C – 30 giây } 30 chu kỳ 72 ⁰ C – 30 giây }
Primer R	10 pmol/ μ l	1 pmol/ μ l	5	
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U/ μ l	2,5 U	0,5	
DNA mẫu		20ng	1	
H ₂ O			22,5	
Tổng thể tích			50 μ l	

Điện di và đọc kết quả PCR trên gel agarose

Các hóa chất được sử dụng để điện di và đọc kết quả:

- Agarose
- TAE 0,5X
- Loading dye 6X
- Ethidium bromide

Các dụng cụ và thiết bị được sử dụng để điện di và đọc kết quả:

- Cân kỹ thuật 4 số
- Lò viba
- Khay đổ gel
- Bồn và máy điện di
- Giấy parafin
- Máy chụp hình gel
- Ống đong

Phương pháp đổ gel agarose điện di:

Bước 1: Chuẩn bị gel agarose 1 % (Cho 0,125 g agarose vào 12,5 ml dung dịch TAE 0,5X, đun sôi hỗn hợp trên khoảng hai phút trong lò viba).

Bước 2: Làm nguội agarose đã được nấu chín đến 60 °C, sau đó đổ vào khuôn đã được đặt lược vào trước.

Bước 3: Lấy lược ra, cho gel vào bồn điện di.

Bước 4: Hút 2 µl loading dye trộn với 4 µl mẫu.

Bước 5: Bơm vào các giếng một cách cẩn thận 4 µl mẫu + dung dịch đệm.

Bước 6: Chạy điện di ở hiệu điện thế 90 V/20 phút, cho đến khi thuốc nhuộm cách đầu tận cùng của gel là 1 cm.

Bước 7: Lấy gel ra và ngâm vào dung dịch ethidium bromide (0,5 µg/ml) trong 20 phút.

Bước 8: Rửa nhẹ gel dưới vòi nước chuyên dụng.

Bước 9: Đọc kết quả dưới tia UV.

Bước 10: Chụp bản gel để lưu lại kết quả.

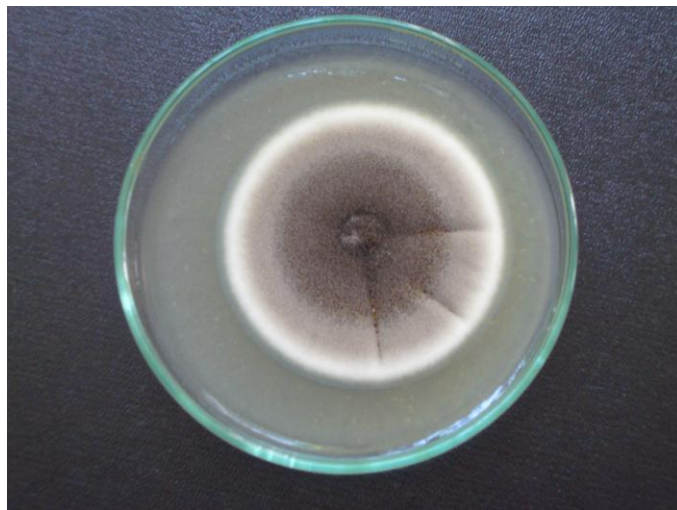
Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

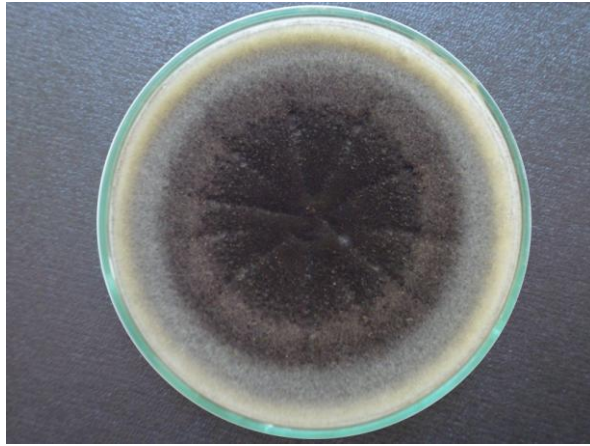
4.1. Phân lập, tách đơn bào tử và nhân sinh khối nấm *Ustilago scitaminea*

4.1.1. Kết quả phân lập

Sau khi thu được các mẫu bệnh từ 11 giống lúa khác nhau, chúng tôi đã tiến hành phân lập nấm trên môi trường PGA*, chọn những khuẩn lạc đặc trưng như màu nâu xám, hình dạng khuẩn lạc là tập hợp những vòng tròn đồng tâm, cấy chuyển nhiều lần. Sau 5 ngày nuôi cấy thì chúng tôi thấy xuất hiện những vết nứt từ tâm khuẩn lạc thẳng ra ngoài (Hình 4.1). Theo chúng tôi thì những vết nứt này là do môi trường bị mất nhiều nước do ủ ở nhiệt độ 30 °C làm cho môi trường bị khô. Những ngày đầu sự tăng trưởng về đường kính của khuẩn lạc rất chậm và sau 7 ngày nuôi cấy thì khuẩn lạc lan ra hết đường kính đĩa petri (Hình 4.2).



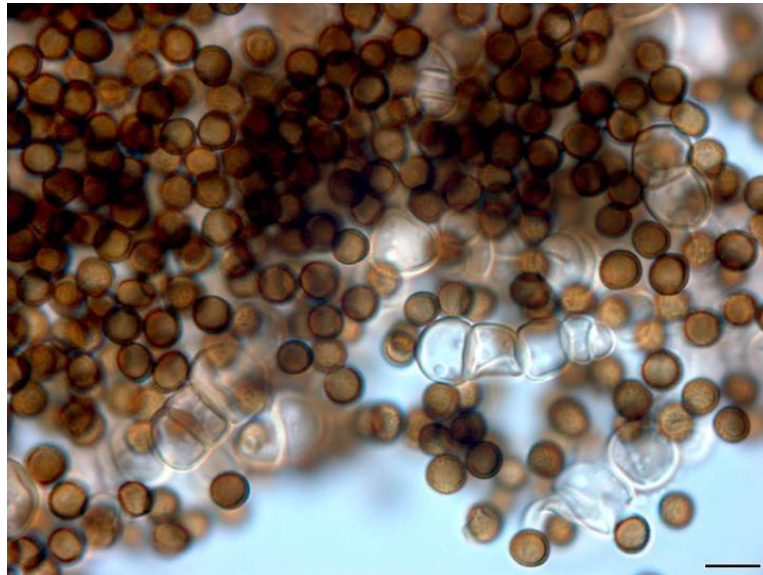
Hình 4.1: Khuẩn lạc nấm *Ustilago scitaminea* sau 5 ngày nuôi cấy.



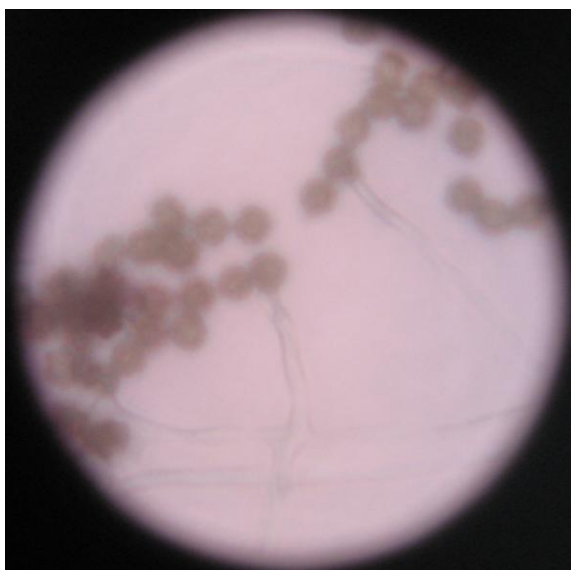
Hình 4.2: Khuẩn lạc nấm *Ustilago scitaminea* sau 7 ngày nuôi cấy.

4.1.2. Kết quả tách đơn bào tử

Để chuẩn bị tốt nguồn nấm cho các thí nghiệm kế tiếp, tôi đã tiến hành tách đơn bào tử với mục đích tạo ra khuẩn lạc đồng nhất về mặt di truyền. Do bào tử của nấm *Ustilago scitaminea* có kích thước lớn nên có thể quan sát và tiến hành tách đơn bào tử rất dễ dàng trên kính hiển vi quang học (Hình 4.3 và Hình 4.4).



Hình 4.3: Bào tử nấm *Ustilago scitaminea* (Gupta, 2006).



Hình 4.4: Bào tử nấm nảy mầm trên môi trường agar soi dưới kính hiển vi ở vật kính x 40.

Kết quả: Chúng tôi đã tách đơn bào tử được 11 dòng nấm *Ustilago scitaminea* từ 11 giống mía khác nhau (Bảng 4.1).

Bảng 4.1: Các dòng nấm được tách đơn bào tử.

Dòng nấm được mã hóa	Tên các giống mía
Us1	Comus
Us2	F 156
Us3	H 39 - 3633
Us4	Ja 60 - 5
Us5	K 84 - 200
Us6	My 55 - 14
Us7	VĐ 86 - 368
Us8	R 570
Us9	ROC 10
Us10	ROC 16
Us11	VN 84 - 4137

4.1.3. Kết quả nhân sinh khối

Bào tử thu được sau khi tách đơn bào tử sẽ phát triển thành khuẩn lạc. Tiến hành chuyển sinh khối sợi nấm từ đĩa petri sang bình tam giác để tăng nhanh sinh khối. Các

bình tam giác này chứa môi trường PGA* lỏng và được lắc ở 160 vòng/phút, ở nhiệt độ 28 °C. Sau 4 ngày, khi sinh khối đã đạt được lượng cần thiết ta tiến hành thu sinh khối (Hình 4.5).



Hình 4.5: Sinh khối nấm sau 4 ngày lắc.

Tuy theo dõi từng ngày trong quá trình lắc nhưng do lắc liên tục nên rất khó phát hiện bị nhiễm khuẩn trong khi lắc. Để đảm bảo không bị nhiễm khuẩn, trước khi thu sinh khối ta tiến hành quan sát dịch lỏng trên kính hiển vi quang học để kiểm tra sự có mặt của vi khuẩn (chỉ là phương pháp tương đối). Thông thường, mẫu bị nhiễm khuẩn sẽ bị đục trong khi lắc. Kết quả nhân sinh khối được thể hiện ở Bảng 4.2.

Bảng 4.2: Khối lượng sợi nấm sau 4 ngày lắc trong môi trường PGA* lỏng.

Dòng nấm	Nguồn	Khối lượng (g)
Us1	Comus	3,24
Us2	F 156	2,86
Us3	H 39 – 3633	2,57
Us4	Ja 60 – 5	3,31
Us5	K 84 – 200	2,87
Us6	My 55 – 14	2,64
Us7	VĐ 86 – 368	2,14
Us8	R 570	3,02
Us9	ROC 10	2,43
Us10	ROC 16	2,53
Us11	VN 84 – 4137	2,65

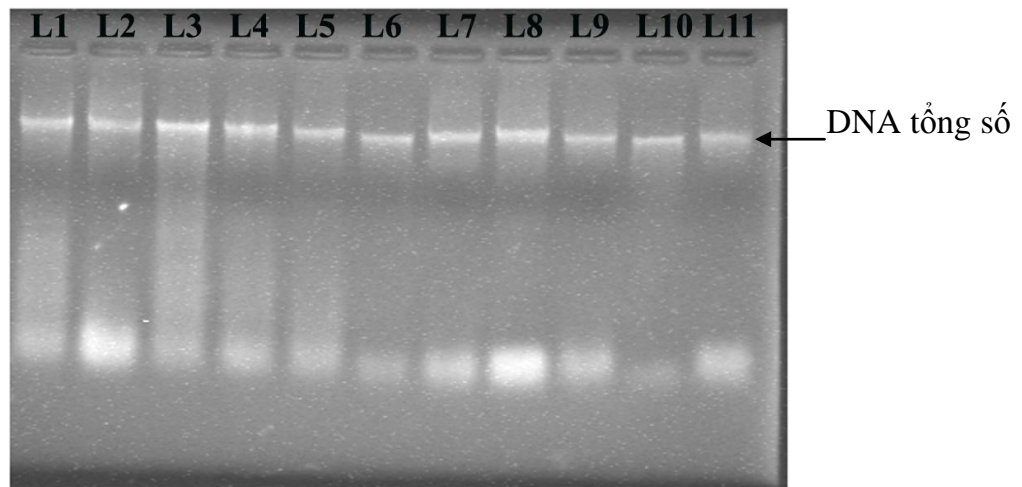
Nhận xét:

- Qua Bảng 4.2 cho thấy tất cả các dòng nấm thí nghiệm đều có khả năng tạo sợi nấm trong môi trường PGA* lỏng.
- Dòng nấm Us4 cho sinh khối cao nhất với khối lượng là 3,31 g.
- Dòng nấm Us7 cho sinh khối thấp nhất với khối lượng là 2,14 g.

4.2. Kết quả ly trích và tinh sạch DNA sợi nấm

4.2.1. Kết quả ly trích

Các dòng nấm *Ustilago scitaminea* sau khi nhân sinh khối sẽ thu nhận sợi nấm và tiến hành ly trích DNA tổng số. DNA của sợi nấm được ly trích theo qui trình của Lee và Taylor (1990). DNA tổng số được kiểm tra chất lượng bằng cách điện di trên gel agarose 0,8 %. Kết quả ly trích DNA tổng số được thể hiện ở Hình 4.6.



Hình 4.6: Kết quả ly trích DNA của 11 dòng nấm.

Ghi chú:

L1: Us1	L4: Us4	L7: Us7	L10: Us10
L2: Us2	L5: Us5	L8: Us8	L11: Us11
L3: Us3	L6: Us6	L9: Us9	

Kết quả ly trích cho thấy DNA tổng số không tinh sạch hoàn toàn. Ngoài DNA tổng số còn có thêm những đoạn DNA bị đứt gãy, RNA và protein mà quá trình ly trích không thể loại bỏ được.

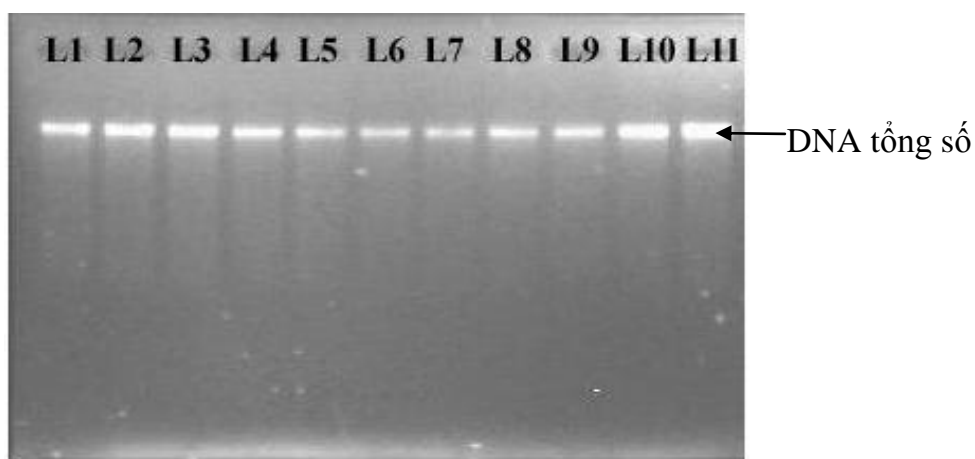
Nguyên nhân tạo ra những sản phẩm tạp là do

- Quá trình nghiền chưa tốt hoặc do hóa chất như phenol, chloroform.
- Thời gian cho phenol để phá hủy lớp vỏ, lớp màng nhân, loại bỏ protein. Nếu như thời gian quá dài sẽ gây nên sự đứt gãy DNA một lượng rất đáng kể.
- Ly tâm (tốc độ, thời gian, thao tác):
 - Ly tâm với thời gian ngắn, tốc độ thấp thì sự phân lớp chưa tốt giữa phần dịch chứa DNA, lớp xác tế bào, lớp phenol.
 - Ly tâm với thời gian quá dài thì phenol phá hủy nhiều DNA hơn gây ra nhiều đoạn đứt gãy
 - Ly tâm với tốc độ quá cao và thời gian dài thì DNA sẽ bị gãy rất nhiều.

4.2.2. Kết quả tinh sạch

Để phản ứng PCR được tối ưu thì sản phẩm DNA li trích cần phải tương đối sạch các tạp chất. Khi DNA khuôn còn lẫn protein, DNA gãy, hiệu quả của phản ứng PCR giảm tỉ lệ thuận với độ tinh sạch của DNA khuôn (Khuất Hữu Thanh, 2003). Vì vậy, để có DNA khuôn tốt hơn, chúng tôi đã tiến hành tinh sạch DNA tổng số.

Kết quả tinh sạch được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0,8 % (Hình 4.7)



Hình 4.7: DNA tổng số đã tinh sạch.

Ghi chú:

L1: Us1

L4: Us4

L7: Us7

L10: Us10

L2: Us2

L5: Us5

L8: Us8

L11: Us11

L3: Us3

L6: Us6

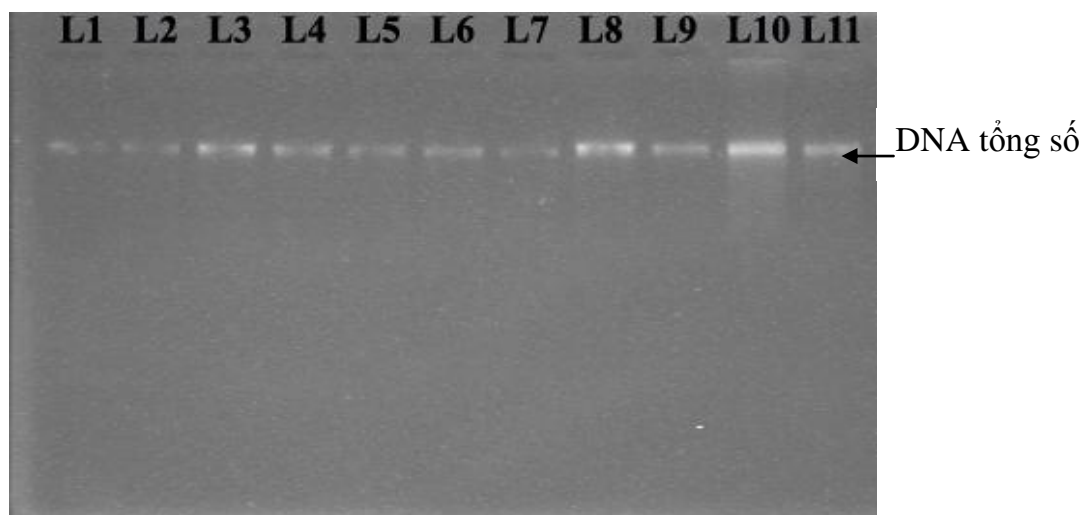
L9: Us9

Sau khi tiến hành tinh sạch, chúng tôi đã thu được DNA tổng số tương đối tốt, lượng tạp nhiễm giảm đi rất nhiều. DNA tổng số thu được từ qui trình tinh sạch này sẽ được sử dụng để làm khuôn cho phản ứng PCR.

Pha loãng DNA tổng số

Khi dùng để khuếch đại vùng mục tiêu từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR, lượng DNA được sử dụng thường khoảng từ 10 – 100 ng cho một phản ứng. Nếu lượng DNA sử dụng quá ít thì sẽ không đủ số lượng khuôn DNA cho quá trình tổng hợp. Kết quả là sản phẩm PCR rất ít không đủ số lượng mong muốn. Còn nếu số lượng DNA khuôn quá nhiều thì sẽ tạo ra nhiều sản phẩm phụ không mong muốn (Khuất Hữu Thanh, 2003). Nhưng DNA tổng số li trích được có hàm lượng rất lớn. Vì vậy, trước khi thực hiện phản ứng PCR, chúng tôi tiến hành pha loãng DNA gốc trong TE 1X.

Tùy vào lượng DNA tổng số mà các mẫu được pha loãng theo các nồng độ khác nhau. DNA khuôn mẫu sau khi pha loãng được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8 % và ghi nhận hình ảnh điện di thông qua máy chụp DNA bằng phần mềm Gel doc (Hình 4.8).



Hình 4.8: DNA tổng số sau khi pha loãng.

Ghi chú:

L1: Us1

L4: Us4

L7: Us7

L10: Us10

L2: Us2

L5: Us5

L8: Us8

L11: Us11

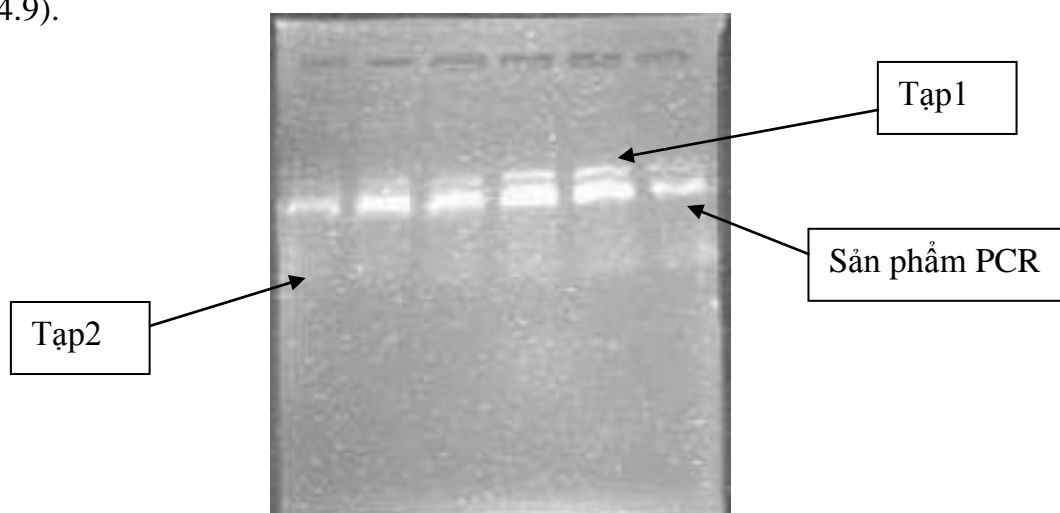
L3: Us3

L6: Us6

L9: Us9

4.3. Phát hiện DNA của *Ustilago scitaminea* bằng kỹ thuật PCR

Sử dụng 2 primer *bE4* và *bE8* do Albert, H. H. và Schenck, S. (1996) thiết kế cho vùng gene *bE* của nấm *Ustilago scitaminea*, sản phẩm khuếch đại có kích thước khoảng 442 bp. Dùng quy trình nhiệt và cặp primer do Albert, H. H. và Schenck, S. (1996) thiết kế, chúng tôi đã khuếch đại được đoạn DNA có kích thước khoảng 442 bp (Hình 4.9).



Hình 4.9: Sản phẩm PCR theo quy trình của Albert, H. H. và Schenck, S.

Tuy nhiên, theo Hình 4.9 thì lượng sản phẩm tạp là tương đối lớn. Sản phẩm tạp này có thể do nhiều nguyên nhân:

Tạp 1: Là sản phẩm PCR không đặc hiệu, sản phẩm này có kích thước lớn hơn sản phẩm PCR cần khuếch đại, nguyên nhân là do: primer, DNA mẫu, dNTPs, thời gian kéo dài chuỗi, hay *Taq* DNA polymerase cho một phản ứng quá nhiều. Để giảm sản phẩm tạp này ta có thể thay đổi một hoặc kết hợp một vài yếu tố sau:

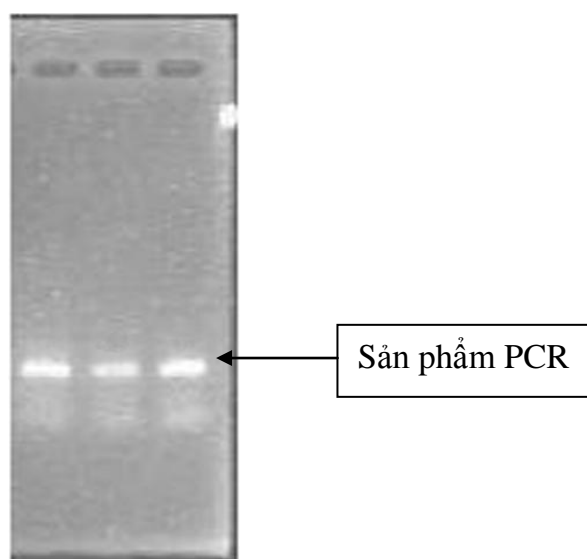
- ❖ Giảm thời gian bắt cặp.
- ❖ Tăng nhiệt độ bắt cặp.
- ❖ Giảm thời gian kéo dài.
- ❖ Giảm nhiệt độ kéo dài.
- ❖ Giảm primer, giảm DNA mẫu, giảm *Taq* DNA polymerase.

Tạp 2: Có thể là do lượng primer, *Taq* DNA polymerase, DNA mẫu cho một phản ứng quá nhiều. DNA mẫu biến tính không tốt do thời gian biến tính ngắn hoặc nhiệt độ biến tính thấp.

Chúng tôi đã tiến hành thay đổi một vài yếu tố trong phản ứng PCR để thu được sản phẩm đặc hiệu, không có tạp.

Trường hợp tăng nhiệt độ bắt cặp không thể được, vì nhiệt độ nóng chảy của mỗi xuôi là 53,6 °C và mỗi ngược là 54,5 °C, còn nhiệt độ bắt cặp theo chu kỳ nhiệt là 52 °C.

Thay đổi đầu tiên: Chúng tôi giảm lượng DNA mẫu đưa vào, kết hợp với giảm *Taq* DNA polymerase (1,5 U/phản ứng), giảm primer (0,5 pmol/μl), các thành phần phản ứng khác và chu kỳ nhiệt không đổi, kết quả là đã giảm bớt tạp (phần tạp 1 không còn nữa) (Hình 4.10).



Hình 4.10: Sản phẩm PCR sau thay đổi đầu tiên.

Những thay đổi sau: Chúng tôi giảm các yếu tố *Taq* DNA polymerase, primer, dNTPs, MgCl₂, thay đổi chu kỳ nhiệt và cuối cùng đã thiết lập được nồng độ các hóa chất và chu kỳ nhiệt tối ưu để khuếch đại đặc hiệu sản phẩm trên vùng gene *bE* của nấm *Ustilago scitaminea* (Bảng 4.3).

Bảng 4.3: Nồng độ các yếu tố trong phản ứng PCR thay đổi.

Hóa chất	Nồng độ đầu	Nồng độ cuối	Nồng độ cuối thay đổi
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2 mM
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,15 mM
Primer F	10 pmol/μl	1 pmol/μl	0,4 pmol/μl
Primer R	10 pmol/μl	1 pmol/μl	0,4 pmol/μl
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U/μl	2,5 U	1 U

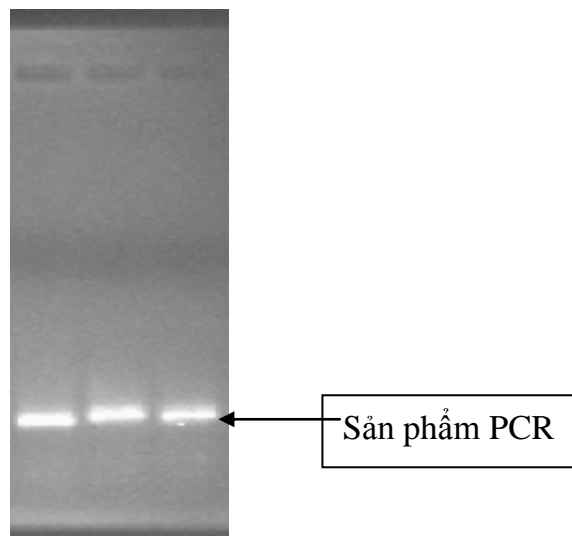
Chu kỳ nhiệt thay đổi:

Khởi động: 94 °C – 5 phút.

94 °C – 45 giây }
52 °C – 30 giây } 30 chu kỳ.
72 °C – 30 giây }

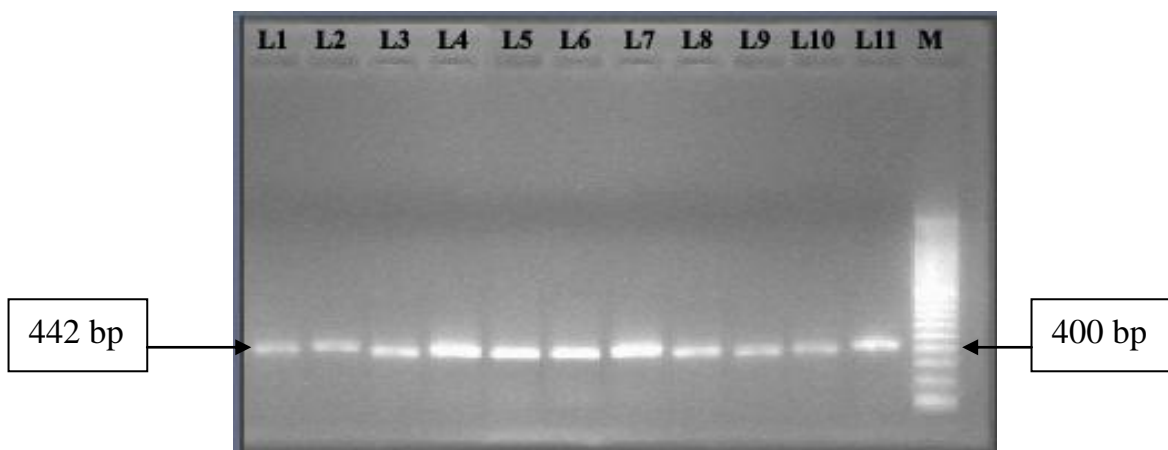
Kết thúc: 72 °C – 3 phút.

Cuối cùng chúng tôi đã thu được sản phẩm PCR rất đặc hiệu và không còn tạp (Hình 4.11).



Hình 4.11: Sản phẩm PCR sau khi thay đổi nồng độ hóa chất và chu kỳ nhiệt.

Sau khi xây dựng được quy trình tối ưu, chúng tôi tiến hành khuếch đại DNA của 11 dòng nấm đã phân lập được. Sản phẩm được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,2 %. Kết quả cho thấy ở Hình 4.12.



Hình 4.12: Sản phẩm PCR theo quy trình mới.

Ghi chú:

L1: Us1

L4: Us4

L7: Us7

L10: Us10

L2: Us2

L5: Us5

L8: Us8

L11: Us11

L3: Us3

L6: Us6

L9: Us9

M: Ladder 100 bp

Như vậy theo quy trình mới thì vừa tiết kiệm được hóa chất, đặc biệt là *Taq* DNA polymerase là hóa chất đắt tiền, từ 2,5 U cho 1 phản ứng giảm xuống còn 1 U cho 1 phản ứng, lại cho sản phẩm khuếch đại rất tốt. Chúng tôi đã BLAST được trình tự khuếch đại trên cơ sở dữ liệu GenBank (phụ lục 1).

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

- ❖ Đã phân lập và tách đơn bào tử được 11 dòng nấm *Ustilago scitaminea* từ 11 giống mía khác nhau ở Bình Dương.
- ❖ Nấm *Ustilago scitaminea* tăng sinh khối rất nhanh trên môi trường PGA* lỏng.
- ❖ Có thể áp dụng các quy trình ly trích DNA tổng số nấm đang phổ biến trên thế giới để tiến hành ly trích DNA tổng số của nấm *Ustilago scitaminea*.
- ❖ Áp dụng quy trình tinh sạch (mục 3.4.6) để thu được DNA tổng số của nấm sau khi ly trích được tốt hơn.
- ❖ Qua nghiên cứu chúng tôi đã xây dựng được quy trình PCR tương đối tốt, phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm để khuếch đại đoạn gen *bE* của nấm *Ustilago scitaminea*.

5.2. Đề nghị

- ❖ Xây dựng qui trình PCR để phát hiện trực tiếp nấm *Ustilago scitaminea* xâm nhiễm vào cây mía, từ đó có thể chẩn đoán sớm bệnh than.
- ❖ Cần có những nghiên cứu rộng hơn về hình thái, đặc điểm sinh lý, sinh hóa của nấm *Ustilago scitaminea* để có thể đánh giá chính xác hơn về tình trạng nhiễm bệnh của cây mía tại Việt Nam.
- ❖ Nghiên cứu sâu hơn bằng các sử dụng các phương pháp như RFLP, RAPD, AFLP... để đánh giá mức độ khác biệt di truyền của các dòng nấm *Ustilago scitaminea* tại Việt Nam.
- ❖ Tiến hành giải trình tự vùng gene *bE* và so sánh để đánh giá chính xác sự khác biệt trong bộ gene của nấm.

- ❖ Tiến hành nghiên cứu về độc tố của nấm để có thể đề ra các biện pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 1999. *Di truyền phân tử*. Nhà xuất bản nông nghiệp.
2. Lê Song Dự, Nguyễn Thị Quý Mùi, 1997. *Cây mía*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Tp. Hồ Chí Minh.
3. Vũ Triệu Mân, 2003. *Chẩn đoán bệnh hại thực vật*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
4. Nguyễn Thị Lang, 2002. *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh.
5. Trần Văn Sỏi, 2003. *Cây mía*.
6. Hà Đình Tuấn, 2004. *Điều tra thành phần hại mía trên một số giống mới nhập nội và khảo sát diễn biến bệnh hại quan trọng ở vùng mía nguyên liệu vùng Đông Nam Bộ*. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp. Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
7. Phan Gia Tân, 1990. *Cây mía*. Tủ sách ĐH Nông Lâm.
8. Nguyễn Văn Tuất, 2002. *Kỹ thuật chẩn đoán và giám định bệnh hại cây trồng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

TÀI LIỆU TIẾNG NƯỚC NGOÀI.

9. Albert, H. H., Schenck, S., 1996. **PCR amplification from a homolog of the *bE* mating – type gene as a sensitive the presence of *Ustilago scitaminea* DNA.** *Plant Dis* **80**: 1189 – 1192
10. Braithwaite K. S., Bakkeren G., et al., 2004. **Genetic variation in a worldwide collection of the sugarcane smut fungus *Ustilago scitaminea*.** *Australian Society of Sugar Cane Technologists* **47**: 233 – 235.

11. Comstock J. C., and Lentini R.S., 2006. **Sugarcane Smut Disease.**
<http://edis.ifas.ufl.edu/SC008>
12. Croft B. J., and Braithwaite K. S., 2006. **Management of an incursion of sugarcane smut in Australia.** *Australasian Plant Pathology* **35**: 113 - 122.
13. Engelke J. H., Egan B. T., et al., 2001. **Sugarcane smut: successful management in the Ord.** *Crop Protection* **22**: 45 – 49.
14. Grisham M. P., 2001. **An international project on genetic variability within sugarcane smut.** *International Society of Sugar Cane Technologists* **45**: 459 - 461.
15. Gupta V.P., 2006. **Sugarcane smut.**
<http://www.apsnet.org/online/Archive/2003/IW000024.asp>
16. Martinez M. I., Medina, et al., 2000. **Changes of some chemical parameters, involved in sucrose recovery from sugarcane juices, related to the susceptibility or resistance of sugarcane plants to smut (*Ustilago scitaminea*).** *International Sugar Journal* **102**: 445 - 448.
17. Muñiz Y., Martínez B., et al., 2004. **Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea* Sydow): diagnostic methods.** *Revista de Protección Vegetal* **19**: 16.
18. Naik G. R., Jayaraj Y. M., et al., 2002. **Early detection of sugarcane smut infection by serological (ELISA) technique.** *Indian Sugar* **51**: 801 - 805.
19. Nallathambi P., Padmanaban P., et al., 2001. **Standardization of an indirect ELISA technique for detection of *Ustilago scitaminea* Syd., causal agent of sugarcane smut disease.** *Journal of Mycology and Plant Pathology* **31**: 76 - 78.
20. Riley I. T., Jubb T. F., et al., 1999. **First outbreak of sugarcane smut in Australia.** *Proceedings of the XXIII ISSCT Congress* **2**: 333 - 337.
21. Schenck S., 2003. **New race of sugarcane Smut on Maui.** *Pathology Report* **69**:13.
22. Sharififar and Kazemi Q., 1999. **Evaluation of five different fungicides on control of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Iran.** *Sugar Technologists' Association of India* **79**: 125 – 129.
23. Singh N., Somai B.M., et al., 2005. **In vitro screening of sugarcane to evaluate smut susceptibility.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **80**: 259 - 266.

24. Singh N., Somai B.M., et al., 2004. **Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars.** *Plant Science* **167** : 987 - 994.
25. Sinky K. V., 2000. **The smut fungi on Saccharum and related grasses.** *Australasian Plant Pathology* **29**: 3.
26. Solas M. T., Piñon D., et al., 1999. **Ultrastructural aspects of sugarcane bud infection by *Ustilago scitaminea* teliospores.** *Sugar Cane* **2**: 14 - 18.
27. Wada A. C., 2003. **Control of sugarcane smut disease in Nigeria with fungicides.** *Crop Protection* **22**: 45 - 49.
28. Wada A. C., Mian M. W., et al., 1999. **Control of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea* Syd) disease in Nigeria and suggestions for an integrated pest management approach.** *Sugar Tech* **3**: 48 - 53.
29. Xu L., Que Y., et al., 2004. **Genetic diversity of *Ustilago scitaminea* in Mainland China.** *Sugar Tech* **6**: 267 - 271.
30. Yadahalli K. B., 2002. **Evaluation of artificial inoculation techniques of sugarcane smut *Ustilago scitaminea* Syd.** *Cooperative Sugar* **34**: 33 - 35.

ĐỊA CHỈ TRÊN WEB

31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Trình tự đoạn khuếch đại trên gene *bE* của nấm *Ustilago scitaminea* khi dùng cặp mồi *bE4* và *bE8* trên cơ sở dữ liệu GenBank.

```
LOCUS           USU61291                442 bp    DNA        linear    PLN 23-JUL-1996
DEFINITION     Ustilago scitaminea b East mating-type gene, partial cds.
ACCESSION     U61291
VERSION       U61291.1  GI:1438940
KEYWORDS      .
SOURCE        Sporisorium scitamineum
  ORGANISM    Sporisorium scitamineum
              Eukaryota; Fungi; Basidiomycota; Ustilaginomycetes;
              Ustilaginomycetidae; Ustilaginales; Ustilaginaceae;
              Sporisorium.
REFERENCE     1 (bases 1 to 442)
  AUTHORS     Albert,H.H. and Schenck,S.
  TITLE       PCR amplification from a homolog of the bE mating-type gene as
              a sensitive assay for the presence of Ustilago scitaminea DNA
  JOURNAL     Unpublished
REFERENCE     2 (bases 1 to 442)
  AUTHORS     Albert,H.H. and Schenck,S.
  TITLE       Direct Submission
  JOURNAL     Submitted (19-JUN-1996) USDA ARS, Hawaii Agriculture Research
              Center, 99-193 Aiea Heights Dr., Aiea, HI 96701, USA
FEATURES     Location/Qualifiers
  source      1..442
              /organism="Sporisorium scitamineum"
              /mol_type="genomic DNA"
              /db_xref="taxon:49012"
              /note="plus mating-type"
  gene        1..442
              /gene="b East mating-type gene"
  CDS         <1..>442
              /gene="b East mating-type gene"
              /codon_start=2
              /protein_id="AAB04128.1"
              /db_xref="GI:1438941"

/translation="FINARRRSGWSNILREFARGDRSRMKVLMQAKMSSCGLSVPLHP
GCSTPIRSVDDILCDNLRPLTAADKKGFEEEWSSMISWIRYGVKEKIGDWVYDLVAA
SKKPRKTGQARPVTPVKRTPARKAATTQQAKPGRAKQRXSATPS"
ORIGIN
  1  gttcatcaac  gcgcgccgcc  gttccggctg  gtccaacatt  ctccgcgaat  ttgcacgggg
  61  cgatcgttca  cgaatgaaag  ttctcatgca  agccaagatg  agctcttgcg  gcttgtcctg
  121  tcctttgcac  ccgggctgct  cgacgccaat  tcggagcgtg  gacgatatcc  tttgcgacaa
  181  cctcaatcga  cctctcacag  cagcagacaa  gaaagggttc  gaagaagaat  ggagcagcat
  241  gatcagctgg  atcagatatg  gcgtcaagga  aaagatcgga  gactgggtct  acgatctcgt
  301  tgcggcaagc  aagaagccgc  ggaaaactgg  tcaagcgcgc  ccagtcacca  ctctgtgaa
  361  gcgcacacca  gcacgcaaag  cagccacgac  tcagcaggcc  aagcctggga  gggctaagca
  421  gagarcaagc  gcgacacctt  cc
```

Phụ lục 2: Cách pha một số hóa chất

1. Pha lysis buffer

Lysis buffer có các thành phần cụ thể như sau: Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 3 %, β - mercaptoethanol 1 %.

- ❖ Cho vào becher một thể tích nước khử ion gần bằng với thể tích dung dịch buffer mong muốn.
- ❖ Lần lượt cho các thành phần khác: Tris HCl, EDTA và SDS vào dung dịch với một lượng sao cho đảm bảo nồng độ cuối cùng như mong muốn.
- ❖ Khuấy đều cho hỗn hợp hòa tan, sau đó cho β - mercaptoethanol vào.
- ❖ Khuấy đều và chuẩn độ cho dung dịch lysis buffer đạt pH = 8. Nếu sau khi chuẩn độ thể tích cuối cùng chưa đạt như mong muốn cần thêm nước khử ion vào cho đạt thể tích mong muốn.

2. Pha Phenol

- ❖ Làm tan 100 g phenol (tinh thể) bằng cách đặt trong bồn ủ nhiệt ở 65 °C (phải bịt kín dụng cụ đựng phenol khi hòa tan).
- ❖ Sau khi phenol đã tan hoàn toàn, thêm vào 100 ml dung dịch Tris bazơ 0,5 M, pH = 8.
- ❖ Khuấy từ 10 phút, để yên ở nhiệt độ phòng cho đến khi hỗn hợp tách thành hai pha, hút bỏ phần dung dịch bên trên một cách cẩn thận. Lưu ý các thao tác này nên thực hiện ở trong tủ hood và phải luôn giữ phenol trong tối để tránh oxy hóa và nguy hiểm đến sức khỏe.
- ❖ Tiếp tục cho vào 100 ml dung dịch Tris HCl 0,5 M, pH 8.
- ❖ Khuấy từ 10 phút, để yên ở nhiệt độ phòng cho đến khi dung dịch tách làm hai pha, hút bỏ phần dung dịch bên trên.
- ❖ Lập lại chu kỳ này một lần nữa. Sau đó phủ lên trên dung dịch phenol thu được một lớp TE 1X (50 ml).

- ❖ Lưu ý là phải bảo quản dung dịch phenol trong tối (dùng bình đựng có màu tối hoặc bịt kín bình bằng giấy bạc).

3. Pha dung dịch TE 1X

- ❖ Thành phần gồm: 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.
- ❖ Trước hết pha dung dịch Tris HCl stock, pH 8.
- ❖ Cho dung dịch Tris HCl và EDTA vào nước khử ion.
- ❖ Khuấy đều và chuẩn độ pH đến 8.