

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

000



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA QUẦN THỂ NẤM
***Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei GÂY BỆNH TRÊN**
CÂY CAO SU (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) TẠI TRẠI THỰC
NGHIỆM LAI KHÊ, VIỆN NGHIÊN CỨU CAO SU VIỆT NAM
BẰNG KỸ THUẬT RAPD

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2002-2006

Sinh viên thực hiện: LÊ VĂN HUY

Thành phố Hồ Chí Minh

-2006-

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
000**

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA QUẦN THỂ NẤM
Corynespora cassicola (Berk & Curt) Wei GÂY BỆNH TRÊN CÂY
CAO SU (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) TẠI TRẠI THỰC
NGHIỆM LAI KHÊ, VIỆN NGHIÊN CỨU CAO SU VIỆT NAM
BẰNG KỸ THUẬT RAPD.**

**GVHD:
PGS.TS. BÙI CÁCH TUYẾN
ThS. PHAN THÀNH DŨNG**

**Sinh viên thực hiện:
LÊ VĂN HUY**

Thành phố Hồ Chí Minh
8 - 2006

LỜI CẢM TẠ

❖ Con xin thành kính ghi ơn Cha Mẹ đã sinh thành, dưỡng dục con nên người.

Con xin cảm ơn gia đình đã luôn là chỗ dựa vững chắc cho con bước qua những khó khăn.

❖ Tôi xin chân thành cảm ơn:

- Ban Giám Hiệu trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, Ban Chủ Nhiệm Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, cùng tất cả quý Thầy - Cô đã truyền đạt những kiến thức quý báu cho tôi trong suốt thời gian học tại trường.
- PGS.TS Bùi Cách Tuyến và ThS. Phan Thành Dũng đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ tôi hoàn thành khóa luận.
- Ban giám đốc Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi thực tập và hoàn thành tốt khóa luận tốt nghiệp.
- TS. Bùi Minh Trí đã có những chỉ dẫn, động viên giúp tôi thực hiện tốt khóa luận này.
- KS. Vũ Thị Quỳnh Chi cùng các cô chú, anh chị là cán bộ công nhân viên Bộ Môn Bảo Vệ Thực Vật - Viện Nghiên Cứu Cao Su đã nhiệt tình giúp đỡ và hướng dẫn tôi trong suốt thời gian thực tập tại Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam.
- Các anh chị trực thuộc Trung Tâm Phân Tích – Thí Nghiệm Hóa Sinh Trường Đại Học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh đã hướng dẫn và chia sẻ cùng tôi những khó khăn trong thời gian thực hiện khóa luận.
- Các bạn bè thân yêu lớp Công Nghệ Sinh Học 28 đã giúp đỡ và chia sẻ cùng tôi những vui buồn trong suốt những năm học cũng như thời gian thực tập tốt nghiệp.

Thành Phố Hồ Chí Minh, ngày 15 tháng 8 năm 2006.

Lê Văn Huy.

TÓM TẮT

LÊ VĂN HUY, Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Tháng 8/2006. “ Nghiên cứu đa dạng di truyền của quần thể nấm *C.cassiicola*(Burt &Curt) Wei gây bệnh cho cây cao su tại trại thực nghiệm cao su Lai Khê, Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam bằng kỹ thuật RAPD”.

Bệnh rụng lá *Corynespora* gây ra bởi nấm *C. cassiicola* đang được xem là bệnh lá nguy hiểm nhất cho các vùng trồng cao su trên thế giới. Ở Việt Nam, bệnh xuất hiện lần đầu vào tháng 8 năm 1999 tại trại thực nghiệm cao su Lai Khê, Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam. Hiện nay bệnh đang trong giai đoạn tích lũy và có thể bùng phát trong tương lai. Sự quan tâm hiện nay là xác định sự đa dạng di truyền của nguồn bệnh.

Do đó 11 nguồn nấm gây bệnh cho các dòng vô tính cao su khác nhau được phân lập, tách đơn bào tử, nhân sinh khối, ly trích DNA. Kỹ thuật RAPD sử dụng 3 primer (OPL-08, OPM-O5,OPD - 18) đã được áp dụng để phát hiện sự đa dạng di truyền trên 11 nguồn nấm trên. Phân tích dữ liệu RAPD của 11 nguồn nấm trên đã chia các nguồn nấm thành hai nhóm lớn. Cây phả hệ (dendrogram) được có hệ số đồng dạng di truyền từ 0,43 – 0,94. Điều này cho thấy có sự đa dạng di truyền giữa các nguồn nấm được nghiên cứu. Tuy nhiên, sự khác biệt về hình thái thì dường như không liên quan đến các nhóm RAPD trong nghiên cứu này. Thông tin thu được từ nghiên cứu này có thể giúp hiểu biết sâu hơn về sự bùng phát của nguồn bệnh, tiên đoán về sự phát triển của nguồn bệnh và phát triển các chiến lược lai giống tạo các dòng vô tính kháng bệnh một cách hiệu quả hơn. Kết quả cũng chỉ ra rằng kỹ thuật RAPD có thể mở rộng để đánh giá đa dạng di truyền của nấm *Corynespora cassiicola* ở Việt Nam.

SUMMARY

LE VAN HUY, Nong Lam University, Ho Chi Minh City. August, 2006.

“Studying genetic variation of *Corynespora cassiicola* population, destructive fungal pathogen of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg in Lai Khe rubber experimental station of Rubber Research Institute of Vietnam (RRIV), was carried out by using RAPD technique.”

Corynespora leaf fall disease caused by *C. cassiicola* was considered as one of the most harmful leaf diseases in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

In Vietnam, the disease was first detected in August, 1999 in Lai Khe rubber experimental station of Rubber Research Institute of Vietnam (RRIV). At present, the disease is spreading and can develop into epidemics in future. A special attention has been made to determine the extent of genetic variation of the pathogen.

Therefore, 11 isolates collected from various clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg were purified to single spore. Fungal isolates were inoculated in broth culture and total DNA extracted. Three RAPD markers (OPL-08, OPM-05 and OPD-18) were used to investigate the genetic diversity of these isolates. Cluster analysis of 35 amplified DNA fragments (RAPD data) showed that 11 isolates could be placed into two groups. Genetic similarity of these analyzed isolates was a range from 0.43 to 0.94. The result indicated that there is a significant genetic variation among these isolates. It seems that morphological differences did not associate with molecular characters.

This preliminary study would be useful for a better understanding of disease outbreaks, predicting future disease development and developing effective strategy in breeding for disease resistant clones. It is indicated that RAPD will be extended to assess intra-specific variation in *C. cassiicola* isolates from rubber trees in Vietnam.

MỤC LỤC

PHẦN	TRANG
Trang tựa	
Lời cảm tạ	iii
Tóm tắt	iv
Summary	v
Mục lục	vi
Danh sách các chữ viết tắt	ix
Danh sách các hình	x
Danh sách các bảng	xi
PHẦN 1. MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề	1
1.2. Mục đích	2
1.3. Yêu cầu	2
1.4. Nội dung công việc	2
PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1. Sơ lược về cây cao su <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg	3
2.1.1. Phân loại học	3
2.1.2. Nguồn gốc	3
2.1.3. Đặc điểm thực vật học	3
2.1.4. Vai trò và tình hình sản xuất.....	3
2.1.5. Sâu bệnh	4
2.2. Đặc tính sinh học của nấm <i>C. cassiicola</i> trên cây cao su.	5
2.2.1. Phân loại học	5
2.2.2. Giới thiệu về khuẩn ty, khuẩn lạc, bào tử.....	5
2.2.3. Phổ kí chủ, sự xâm nhiễm, lan truyền của nấm <i>C. cassiicola</i>	7
2.2.4. Điều kiện nuôi cấy.....	7
2.3. Bệnh rụng lá <i>Corynespora</i> trên cây cao su <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg	8

2.3.1.	Nguyên nhân, triệu chứng, hậu quả và cách phòng trị của bệnh rụng lá <i>Corynespora</i>	8
2.3.2.	Yếu tố phát sinh bệnh trên cây cao su và sự hình thành nòi mới của nấm <i>C. cassiicola</i>	10
2.4.	Giới thiệu về thông tin di truyền, tính đa dạng di truyền và chỉ thị.....	11
2.4.1.	Thông tin di truyền	11
2.4.2.	Tính đa dạng di truyền.....	12
2.4.3.	Chỉ thị	12
2.5.	Kỹ Thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms).....	13
2.6.	Kỹ thuật PCR	14
2.6.1.	Giới thiệu kỹ thuật PCR	14
2.6.2.	Các bước cơ bản quy trình chuẩn của PCR.....	14
2.6.3.	Thành phần cơ bản của phản ứng PCR và các yếu tố ảnh hưởng	15
2.7.	Kỹ thuật SSCP (Single – Strand Conformation Polymorphism).....	19
2.8.	Kỹ thuật STS (Sequence – Target Sites)	20
2.9.	Kỹ thuật Microsatellites (SSR – Simple Sequences Repeat).....	20
2.10.	Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	20
2.10.1.	Giới thiệu về kỹ thuật RAPD	20
2.10.2.	Một số vấn đề trong thực tế khi thực hiện phản ứng RAPD thường gặp phải	22
2.10.3.	Những ưu điểm của kỹ thuật RAPD.....	22
2.10.4.	Những hạn chế của kỹ thuật RAPD.....	23
2.10.5.	Ứng dụng của kỹ thuật RAPD.....	23
2.10.6.	Sự cách tân của kỹ thuật RAPD	24
2.11.	Kỹ thuật AFLP.....	24
2.12.	Nghiên cứu trong và ngoài nước	25
2.12.1.	Những nghiên cứu về <i>C. cassiicola</i> ngoài nước	25
2.12.2.	Những nghiên cứu về <i>C. cassiicola</i> trong nước	28
PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....		29
3.1.	Thời gian và địa điểm tiến hành	29
3.1.1.	Giai đoạn 1	29
3.1.2.	Giai đoạn 2	29
3.2.	Đối tượng nghiên cứu	29
3.3.	Nội dung và phương pháp.....	29
3.3.1.	Phương pháp lấy mẫu	29

3.3.2. Phân lập	30
3.3.3. Nhân sinh khối.....	32
3.3.4. Tách chiết DNA.....	33
3.3.5. Thực hiện phản ứng RAPD	35
PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	43
4.1. Kết quả lấy mẫu, phân lập và nhân sinh khối	43
4.1.1. Kết quả lấy mẫu, phân lập	43
4.1.2. Kết quả nhân sinh khối	47
4.2. Kết quả ly trích	48
4.3. Thiết lập qui trình RAPD và đánh giá độ đa dạng di truyền của các chủng nấm <i>C. cassiicola</i> phân lập được từ vườn tuyển non Lai Khê thuộc Bộ Môn Giống –trại thực nghiệm Lai Khê–VNCCSVN (Bình Dương).	51
4.3.1. Thí nghiệm 1: khảo sát qui trình RAPD của Silva và cộng sự, 2003.....	51
4.3.2. Thí nghiệm 2: khảo sát ảnh hưởng của yếu tố chu kỳ đến phản ứng RAPD.....	53
4.3.3. Thí nghiệm 3 Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố MgCl ₂ , dNTP, primer, DNA, Taq - polymerase (Promega) lên phản ứng RAPD.	54
4.3.4. Đánh giá độ đa dạng di truyền của các chủng nấm <i>C. cassiicola</i> phân lập được từ vườn tuyển non Lai Khê thuộc Bộ Môn Giống tại trại thực nghiệm Lai Khê – VNCCSVN (Bình Dương).....	55
4.3.5. Phân tích kết quả phản ứng RAPD bằng phần mềm NTSYS.....	59
PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	63
5.1. Kết luận.....	63
5.2. Đề nghị.....	63
5.3. Hạn chế của đề tài.....	64
PHẦN 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	65
PHỤ LỤC	65

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PSA: Potato Saccharose Agar.

EtBr: Ethidium Bromide.

TE: Tris EDTA.

TAE: Tris Glacial Acetic Acid EDTA.

RFLP: Restriction Fragments Length Polymorphism.

ITS: Internal Transcribed Spacer.

RAPD: Random Amplified Polymorphism DNA.

Bp: base pairs

rRNA: ribosomal RNA.

dvt : Dòng vô tính

BVTV: bảo vệ thực vật

VNCCSCN: Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam

KTCB : Kiến Thiết Căn Bản

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1 Một đợt dịch bệnh do <i>C. cassiicola</i> gây ra trên cây cao su ở Việt Nam.	9
Hình 2.2 Sơ đồ các bước phản ứng chuỗi polymerase	15
Hình 2.3 Sự bắt cặp và khuếch đại trong phản ứng RAPD – PCR	20
Hình 4.1 Triệu chứng đặc trưng của bệnh rụng lá <i>Corynespora</i>	44
Hình 4.2 Triệu chứng biến thiên của bệnh rụng lá <i>Corynespora</i>	44
Hình 4.3 Triệu chứng của bệnh héo đen đầu lá	45
Hình 4.4 Bào tử của nấm <i>C. cassiicola</i>	45
Hình 4.5 Khuẩn lạc nấm <i>C. cassiicola</i>	46
Hình 4.6 Màu sắc sợi nấm trên môi trường lỏng.....	47
Hình 4.4 Kết quả li trích DNA tổng số theo qui trình của Lee và Taylor.....	48
Hình 4.8 DNA tổng số của 11 nguồn nấm li trích theo qui trình mới.....	50
Hình 4.9 Các mẫu DNA sau khi tiến hành pha loãng	51
Hình 4.10 Kết quả PCR ở thí nghiệm 1, primer OPM-O5, nguồn nấm 4, 5, 6.....	52
Hình 4.11 Sản phẩm PCR của thí 2 nghiệm khi thực hiện với primer.....	53
Hình 4.12 Kết quả điện di sản phẩm RAPD của thí nghiệm 3	54
Hình 4.13 Kết quả điện di sản phẩm RAPD của 11 nguồn nấm <i>C. cassiicola</i> 5	7
Hình 4.14 Phát hiện băng bằng chức năng detect băng.....	58
Hình 4.15 Kết quả đánh giá đa dạng di truyền dạng số liệu NTSYS	60
Hình 4.16 Cây phả hệ (dendrogram) của 11 nguồn nấm <i>C. cassiicola</i>	61

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 3.1 Thành phần phần môi trường PSA, PDA.....	30
Bảng 3.2 Các primer dùng cho phản ứng RAPD	35
Bảng 3.3 Thành phần hóa chất cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1	37
Bảng 3.4 Chương trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1	37
Bảng 3.5 Chương trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 2.....	37
Bảng 3.6 Thành phần hóa chất cho phản ứng RAPD của nghiệm thức 1 – 6.....	38
Bảng 3.7 Thành phần hóa chất cho phản ứng RAPD của nghiệm thức 7 – 10	40
Bảng 4.1 Danh sách các nguồn nấm <i>C. cassicola</i> phân lập được	46
Bảng 4.2 Kết quả sau khi nhân sinh khối nấm trong môi trường lỏng.....	47
Bảng 4.3 Chương trình nhiệt được xây dựng ở thí nghiệm1	52
Bảng 4.4 Thành phần hóa chất phản ứng RAPD thu được sau thí nghiệm 1, 2, 3.....	55
Bảng 4.5 Chương trình nhiệt được xây dựng sau thí nghiệm 1, 2, 3	55

PHẦN 1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Cũng như nhiều loại cây trồng khác cây cao su bị nhiễm nhiều loại bệnh. Trong đó đáng kể nhất là bệnh rụng lá *Corynespora* gây ra bởi nấm *C. cassiicola* đang được xem là bệnh chính ở các vùng trồng cao su trên thế giới (P. romruensukharom và cộng sự, 2005; Silva và cộng sự, 2003, 2004).

Ở Việt Nam hiện nay số lượng dvt bị nhiễm bệnh tăng lên nhiều và cũng đã xuất hiện tại một số công ty cao su tại Đông Nam Bộ. Hiện nay bệnh đang trong giai đoạn tích lũy và có thể bùng phát trong tương lai (Phan Thành Dũng, 2006). Nguy cơ còn cao hơn nữa do tác động của sự thương mại hóa các sản phẩm nông nghiệp, các chương trình hợp tác trao đổi giống, sự đe dọa của khủng bố sinh học. Sự quan tâm hiện nay là xác định sự đa dạng của nguồn bệnh.

Mặc dù những phương pháp truyền thống như: quan sát hình thái đặc điểm phát triển, hình thái bào tử, cây chỉ thị.v.v. đã được sử dụng để phát hiện sự đa dạng di truyền của nguồn bệnh. Nhưng những khảo nghiệm này gặp phải hạn chế lớn là lệ thuộc vào sự thay đổi của môi trường (P. romruensukharom và cộng sự, 2005).

Trên thế giới kỹ thuật RAPD đã được áp dụng để nghiên cứu về đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola*. Ở Việt Nam việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán bệnh và nghiên cứu về nấm *C. cassiicola* chưa nhiều trong khi bệnh rụng lá *Corynespora* đang có nguy cơ bùng phát. Do đó chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu đa dạng di truyền của quần thể nấm *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei gây bệnh trên cây cao su (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) tại trại thực nghiệm Lai Khê, Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam bằng kỹ thuật RAPD” là vấn đề mang tính cấp bách, rất phù hợp với tình hình khách quan. Thông tin thu được từ đề tài sẽ làm cơ sở cho các chiến lược quản lý, phòng trừ bệnh và các nghiên cứu tiếp theo.

1.2. Mục đích

Mục đích của đề tài là phân tích đa dạng di truyền của các dòng nấm *C. cassiicola*, làm cơ sở cho các chiến lược phòng trừ bệnh và các nghiên cứu tiếp theo

Từ mục đích trên, nghiên cứu được hiện với mục tiêu cụ thể sau:

- Phân lập, tách đơn bào tử nấm *C. cassiicola*.
- Tối ưu hóa qui trình RAPD phù hợp với nấm *C. cassiicola*.
- Thực hiện phản ứng RAPD trên các dòng nấm thu thập được.
- Đánh giá được độ đa dạng di truyền của các dòng nấm *C. cassiicola* làm cơ sở cho việc xây dựng các chiến lược phòng trừ bệnh và các nghiên cứu sau này.

1.3. Yêu cầu

- Hiểu biết căn bản về bệnh cây cao su, bệnh rụng lá *Corynespora* nhận diện được triệu chứng đặc trưng của bệnh.
- Nắm vững quy trình phân lập, tách đơn bào tử, nhân sinh khối nấm *C. cassiicola*
- Nắm vững kỹ thuật RAPD.
- Nắm vững cách sử dụng phần mềm NTSYSpc2.1.
- Vận hành các máy móc thiết bị hiện có, củng cố tiến tới nắm vững kiến thức đã học.

1.4. Nội dung công việc

- Phân lập nguồn nấm *C. cassiicola*.
- Nuôi cấy, tách đơn bào tử, nhân sinh khối các nguồn nấm đã phân lập.
- Tách chiết DNA từ các dòng nấm thu được sau quá trình nhân giống.
- Khảo sát qui trình RAPD.
- Thực hiện kỹ thuật RAPD sử dụng 3 primer.
- Phân tích kết quả RAPD bằng phần mềm NTSYSpc2.1.

PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Sơ lược về cây cao su *Hevea brasiliensis* Muell. Arg

2.1.1. Phân loại học

Cây cao su trên thế giới thuộc vào năm họ thực vật sau: *Euphorbiaceae*, *Moraceae*, *Apocynaceae*, *Aslepiadaceae*, *Compositae*. Trong đó mỗi họ lại có nhiều giống, mỗi giống có nhiều loại. Nhưng cây cao su thuộc loại *Hevea brasiliensis* (giống *Hevea*, họ *Euphorbiaceae*) là cây duy nhất được chọn để canh tác đại qui mô (Nguyễn Hữu Trí, 2004).

2.1.2. Nguồn gốc

Cây cao su có nguồn gốc từ vùng rừng nhiệt đới, lưu vực sông Amazone Nam Mỹ. Được du nhập vào Việt Nam năm 1897. Đến đầu thế kỷ 20 được trồng thành đồn điền tại Đông Nam Bộ. Đầu thập niên 50 một số diện tích cao su cùng định hình tại Tây Nguyên và miền Trung.

2.1.3. Đặc điểm thực vật học

Cây cao su (cây tạo mủ) thuộc loại thân gỗ, to, cao. Ở nhưng cây lâu năm có thể cao từ 20 đến 30 mét.

Cấu tạo của thân cao su có phần quan trọng là vỏ thân, đây là bộ phận sản sinh ra nhựa mủ quyết định đến năng suất sản lượng mủ.

Lá cao su mọc cách, có ba lá chét nhỏ cuống dài, có hình bầu dục, đuôi nhọn, mặt nhẵn gân song song. Đối với cây cao su thì lá có vai trò rất quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến sản lượng mủ.

Về phương diện sinh thái cây cao su phát triển tốt ở vùng xích đạo. Đòi hỏi nhiệt độ trung bình 25⁰C, lượng mưa 1500 ml mỗi năm, có thể chịu được hạn nhiều tháng, ít đòi hỏi về chất lượng đất, ở nước ta cây cao su được trồng từ Bắc đến Nam (Nguyễn Hữu Trí, 2004).

2.1.4. Vai trò và tình hình sản xuất

Cây cao su là loại cây công nghiệp dài ngày, cung cấp mủ và gỗ cho rất nhiều ngành công nghiệp. Đây cũng là loại cây có giá trị kinh tế cao trong các

lĩnh vực nông – lâm – công nghiệp. Trong những năm gần đây, sản lượng mủ không ngừng được nâng cao nhờ những cải tiến về giống, kỹ thuật nông nghiệp, quy trình khai thác.v.v Đến năm 2004 thì tổng diện tích cao su cả nước đạt 454.000 ha. Sản lượng 402.700 tấn, năng suất 1370 kg/ha/năm. Năm 2005 toàn ngành cao su xuất khẩu 587.000 tấn đạt kim ngạch xuất khẩu 804 triệu USD, là nông sản đứng thứ 2 về kim ngạch xuất khẩu sau lúa. Nếu tính cả đồ gỗ thì tổng kim ngạch xuất khẩu của toàn ngành cao su Việt Nam năm 2005 ước lượng trên 1 tỉ USD. Hơn nữa những nghiên cứu gần đây về ảnh hưởng của vườn cây cao su với môi trường đã nêu lên khả năng đóng góp về sinh khối và dưỡng chất của cây cao su sau một chu kỳ trồng, khai thác tương đương với rừng nhiệt đới ở vùng nhiệt đới ẩm, giúp cho đất trồng cây cao su được cải thiện về lý và hóa tính (Trần Thị Thúy Hoa, 2006). Trong tương lai khi nghị định thư Kyoto được thông qua thì việc bán hạn ngạch về khí thải sẽ mang lại cho người trồng cao su thêm một khoản thu nhập đáng kể (Trần Văn Cảnh, 2006).

2.1.5. Sâu bệnh

Cùng với sự phát triển mạnh cây cao su thì những thiệt hại do bệnh gây ra cũng gia tăng đáng kể. Một phần do việc chọn lọc theo hướng sản lượng cao, sinh trưởng nhanh đã làm thất thoát gen kháng bệnh. Mặt khác, do tình hình thời tiết – khí hậu có nhiều thay đổi và diễn biến phức tạp. Hơn nữa việc phát triển và chuyên canh cây trồng trên diện rộng trong vùng khí hậu nóng ẩm, mưa nhiều đã dẫn đến sự phát sinh – phát triển mạnh về cả chủng loại cũng như mức độ bệnh, gây ảnh hưởng không nhỏ đến vấn đề canh tác và hiệu quả kinh tế của nó, thiệt hại sản lượng và gia tăng chi phí sản xuất. Hiện nay, cao su được phát triển mạnh dưới dạng tiểu điền, nên thiệt hại do bệnh gây ra đã ảnh hưởng trực tiếp đến đời sống của những người trồng cao su.

Theo Chee (1976), cây cao su bị trên 550 loài sinh vật tấn công, trong đó có 24 loài có tầm quan trọng về kinh tế. Theo Nguyễn Hải Đường (1997), có 24 loại bệnh gây hại trên cây cao su tại Việt Nam. Đến năm 2003, Phan Thành Dũng và ctv cho biết có 8 loại bệnh cao su chính gây ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng

và sản lượng cây cao su trong nước, trong đó có 4 loại bệnh lá, 2 bệnh thân cành, 1 bệnh mặt cạo và 1 bệnh rễ. Đáng kể trong các loại trên, bệnh rụng lá *Corynespora* là bệnh mới xuất hiện năm 1999 và đang có chiều hướng mở rộng phạm vi gây hại cho các dvt cao su mới.

2.2. Đặc tính sinh học của nấm *C. cassiicola* trên cây cao su.

Tương tự nấm *C. cassiicola* trên các kí chủ khác. Nấm *C. cassiicola* trên cây cao su cũng có các đặc điểm sinh học sau.

2.2.1. Phân loại học

Bệnh này được ghi nhận xuất hiện lần đầu tiên trên cây cao thực sinh tại Sierra Leone (Châu Phi) năm 1949. Năm 1954 Wei tổng hợp và đặt tên *Corynespora cassiicola* (Berk.&Curt.) Wei.

Theo nghiên cứu phân loại gần đây nhất (Kirk, Paul M, 2004) thì nấm *C. cassiicola* được phân loại như sau:

Giới nấm (Fungi).

Ngành (Phylum): Ascomycota.

Lớp (Class): Ascomycetes.

Bộ (Order): Pleosporales.

Họ (Family): Corynesporascaceae.

Giống (Genus): *Corynespora*.

(Nguồn: <http://www.SpeciesFungorum.org/>).

2.2.2. Giới thiệu về khuẩn ty, khuẩn lạc, bào tử

Khuẩn ty của nấm có màu xám đến nâu. Có thể tồn tại trong điều kiện khô hạn đến 2 tháng mà vẫn giữ được độc tính gây bệnh (Soe Kirman, 1987).

Về khuẩn lạc biến thiên rất lớn về tốc độ sinh trưởng, hình thái, độ dày, độ mịn, màu sắc khuẩn lạc cho dù được phân lập từ một bào tử duy nhất (RRIM, 1986 ; Dũng, 1995). Trong một số trường hợp thì màu sắc của sợi nấm, khuẩn lạc thay đổi theo tuổi trên môi trường nuôi cấy (Darussamin A. và Pawirosoemardjo S., 1996). Trên môi trường PDA, PSA khuẩn lạc có màu xám đến nâu (Liyana và Jayasinghe, 1987).

Về hình thái và sự hình thành bào tử và phát triển của nấm biến thiên rộng trên kí chủ sống và môi trường nhân tạo. Bào tử trên lá có màu nâu nhạt với dạng hình lưới liềm chứa nhiều vết ngăn với chiều dài biến thiên, đôi khi đạt 700 μm . Bào tử dạng đơn, đôi khi dạng chuỗi dính với nhau ở hai đầu gọi là hilum. Bào tử phát tán nhờ gió và hạt mưa, phóng thích vào ban ngày (Liyanage và Jacob, 1992) và tại Việt Nam cao điểm từ 8 – 11 giờ sáng (Phan Thành Dũng, 2004). Sau thời gian mưa nhiều và tiếp theo nắng ráo, số lượng bào tử phóng thích nhiều nhất do nấm cần ẩm độ cao để hình thành bào tử.

Dưới điều kiện tối ưu: phạm vi nhiệt độ từ 25 – 30°C, ẩm độ 100% bào tử nảy mầm trong 3 giờ (Liyanage và Jayasinghe, 1988) và phát triển ống mầm ở vị trí nằm giữa hai vách, nhưng phổ biến nhất ở hai đầu của bào tử. Sau khi bào tử nảy mầm chúng xâm nhập vào vị trí vách ngăn của các tế bào đậu, sau đó khuẩn ty phân nhánh xâm nhiễm vào tế bào và hình thành bào tử 96 giờ sau đó. Tuy nhiên bào tử có khả năng tồn tại trên các vết bệnh cũng như trong đất với thời gian kéo dài, trên lá cao su khô nấm vẫn tồn tại và giữ nguyên khả năng gây bệnh đến 3 năm (Chee, 1988).

Trên vết bệnh, số lượng bào tử có khi lên đến 1.200 bào tử/cm². Nấm *C. cassiicola* rất ít hình bào tử trên môi trường nhân tạo, số lượng bào tử cũng thay đổi tùy dvt. Có dvt sản xuất trên 100.000 bào tử trên 1 đĩa petri trong khi chủng khác lại không tạo bào tử (Liyanage, A.deS., Jayasinghe, 1986). Nếu dùng các biện pháp kích thích như: chiếu sáng bằng tia cực tím trong thời gian ngắn hay liên tục bằng ánh sáng huỳnh quang.v.v. sẽ làm tăng số lượng bào tử.

Tuy nhiên đa dạng về đặc điểm hình thái đường như không liên quan đến độc tính của bệnh (Shamsul và Samsuri, 1996; Darussamin A. và Pawirosoemardjo S., 1996).

2.2.3. Phổ kí chủ, sự xâm nhâm, lan truyền của nấm *C. cassiicola*

Nấm *C. cassiicola* có phổ kí chủ rộng có khoảng 160 loài ký chủ thuộc các nhóm cây ăn quả, cây công nghiệp, cây lâm nghiệp, cây ngũ cốc, cây rau màu và nhiều loại cây cảnh khác.

Những nghiên cứu tại Malaysia (Phan Thành Dũng, 1995), tại Indonesia (Sinulingga và cộng sự, 1990) đã cho thấy nấm *C. cassiicola* trên cây cao su là ký sinh chuyên biệt. Tuy nhiên tại Srilanka lại có khả năng gây bệnh trên lá cây đu đủ và *Mikania scandens* (Lianage & Jacob, 1992).

Nấm xâm nhập chủ yếu ở mặt dưới lá qua lớp biểu bì và khí khổng, ngoài ra còn tiết ra enzyme cellulase giúp phân huỷ màng tế bào. Trong suốt quá trình sinh trưởng, nấm còn tiết ra độc tố CC toxin (là cassicoline chứa các amino acid) gây độc cho cây cao su, cho nên chỉ với một lượng nhỏ ở gân chính của lá cũng đủ gây rụng lá (Chee, 1988; Dũng, 1995). Theo Onesirosan (1974) thì đây là loại độc tính chuyên biệt có tác động đến hiện tượng chết mô lá, vỏ và kích thích lá hình thành tầng rời hậu quả là gây rụng lá, nếu chỉ một vết bệnh nhỏ trên cuống lá cũng có thể gây rụng các lá chết dù không có bất kì một triệu chứng nào trên tán lá. Nấm có khả năng tồn tại và phát triển trong phạm vi nhiệt độ lớn từ 16 – 36 °C, thích hợp nhất ở 28 ± 2 °C và ẩm độ bão hòa (Chee, 1988; Jayasinghe, 2000). Mầm bệnh lan truyền chủ yếu nhờ gió và mưa.

2.2.4. Điều kiện nuôi cấy

Nấm có thể nuôi cấy trên nhiều môi trường khác nhau, với pH thay đổi tùy môi trường: PDA (potato dextrose agar, pH 6,8-7), PSA (Potato Sucrose Agar, pH 6,8 – 7,0): Rose Ben Agar (pH : 5,5); Czapek Dox Agar (pH : 6,8 -7,2); Core Meal Agar (pH 6,8- 7,0). Richard's medium (pH:5,4). Nhưng PSA hay dịch chiết cao su + dextrose + agar là hai môi trường thích hợp nhất cho sự hình thành bào tử (Liyanage và cộng sự, 1986; Chee, 1988). Tuy nhiên theo Jayasinghe, 1988 thì môi trường PDA là môi trường tối ưu cho sự hình thành bào tử và phát triển của

nấm. Nhiệt độ 28 ± 2 °C và ẩm độ bão hòa là thích hợp nhất cho sự phân lập và phát triển của nấm (Chee, 1987 & 1988; Jayashinghe, 2000).

2.3. Bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su *Hevea brasiliensis* Muell.

Arg

2.3.1. Nguyên nhân, triệu chứng, hậu quả và cách phòng trị của bệnh rụng lá *Corynespora*

2.3.1.1. Nguyên nhân

Cũng như nhiều loại cây trồng khác cây cao su bị nhiễm nhiều loại bệnh. Trong đó đáng kể nhất là bệnh rụng lá *Corynespora* đã và đang gây hại nặng từ thập niên 90 đến nay. Bệnh do nấm *Corynespora cassiicola* (Burt & Curt) Wei gây nên.

2.3.1.2. Triệu chứng

Bệnh xuất hiện trên lá, cuống lá và chồi với các triệu chứng biểu hiện rất khác nhau.

– Trên lá: Vết bệnh màu đen với hình dạng xương cá dọc theo gân lá, vết bệnh lan rộng nếu điều kiện thuận lợi, gây chết từng phần, sau đó lá đổi màu vàng cam và rụng từng lá một. Trên lá non vết bệnh hình tròn màu xám đến nâu với vòng màu vàng xung quanh, có khi hình thành lỗ. Lá quăn và biến dạng, sau đó rụng toàn bộ.

– Trên chồi và cuống lá: Các chồi xanh dễ nhiễm bệnh, đôi khi nấm bệnh cũng gây hại chồi đã hóa nâu. Dấu hiệu đầu tiên với vết nứt dọc theo cuống và chồi có dạng hình thoi, có mũ rỉ ra sau đó hóa đen, vết bệnh có thể phát triển dài đến 20 cm gây chết chồi, đôi khi chết cả cây. Nếu dùng dao cắt bỏ lớp vỏ ngoài sẽ xuất hiện những sọc đen ăn sâu trên gỗ, chạy dọc theo vết bệnh. Trên cuống lá với vết nứt màu đen có chiều dài 0,5 – 3,0 mm. Nếu cuống lá bị hại, toàn bộ lá chết bị rụng khi còn xanh mặc dù không có một triệu chứng nào xuất hiện trên phiến lá.

2.3.1.3. Hậu quả và cách phòng trị

- Hậu quả
 - Mức nguy hại của bệnh tùy thuộc vào mức độ kháng của dvt, giai đoạn tuổi. Tùy theo sự tương thích giữa kí sinh, kí chủ và môi trường. Bệnh gây hại quanh năm vào mọi giai đoạn sinh trưởng của cây cao su.
 - Ở cây chưa trưởng thành bệnh xuất hiện quanh năm gây rụng lá, làm chậm sự phát triển, cuối cùng gây chết cây. Ở cây cao su trưởng thành, nhạy cảm thì bệnh làm giảm 20 – 25 % giá trị kinh tế. Chiến lược kiểm soát bệnh này được tập trung nhất là lai tạo và sử dụng các dvt kháng bệnh (P. romruensukharom và cộng sự, 2005).



Hình 2.1 Một đợt dịch bệnh do *C. cassiicola* gây ra trên cây cao su ở Việt Nam.

(Nguồn: Bộ Môn BVTV/VNCCSVN).

- Cách phòng trị
 - Không trồng các dvt mẫn cảm với bệnh.
 - Tạo tuyển các dòng cao su kháng bệnh. Cần sự hỗ trợ của công nghệ sinh học nhằm tạo tuyển nhanh, chính xác và kinh tế các dvt kháng bệnh.

– Biện pháp sử dụng hóa chất chỉ áp dụng cho phạm vi qui mô nhỏ, vườn ươm, vườn nhân, cây cao su trong giai đoạn kiến thiết cơ bản (Shamsul và Samsuri, 1996; Darussamin A. và Pawirosoemardjo S., 1996; Phan Thành Dũng, 2006).

2.3.2. Yếu tố phát sinh bệnh trên cây cao su và sự hình thành nốt mới của nấm *C. cassiicola*

Có ba yếu tố dẫn đến sự phát sinh bệnh trên cây cao su gồm:

a) Dòng vô tính cao su mẫn cảm : tính mẫn cảm của các dvt cao su thì tùy thuộc vào điều kiện từng nước cũng như giai đoạn phát triển. Như dvt RRIC103 trước đây được xem là kháng bệnh ở Indonesia nhưng đột nhiên trở nên nhiễm nặng (Darussamin A. và Pawirosoemardjo S., 1996). Trong khi dvt PB 260 là dvt có triển vọng về sản lượng và kháng bệnh tại Malaysia và Indonesia nhưng bị hại rất nặng tại Cameroon và châu Phi. Dòng vô tính RRIM 725 mẫn cảm ở giai đoạn cây con nhưng kháng khi trưởng thành (Shamsul và Samsuri, 1996; Darussamin A. và Pawirosoemardjo S., 1996).

b) Nấm hình thành nốt mới: nấm dễ thích nghi với điều kiện môi trường để hình thành nốt mới vượt qua tính kháng của một số dvt cũng như đáp ứng khác nhau với thuốc trị bệnh. Nốt mới hình thành gồm ba yếu tố sau: đáp ứng với điều kiện địa lí, đáp ứng với cây kí chủ khác, đáp ứng với dvt cao su, trong đó yếu tố đầu và cuối có vai trò quan trọng đến mức độ gây hại của nấm với cao su từng vùng.

c) Môi trường thuận lợi cho nấm bệnh cao su phát triển: cũng như nhiều loại bệnh khác, sự phát dịch, lây lan và tác hại của *C. cassiicola* có liên quan đến các yếu tố môi trường như độ ẩm, nhiệt độ, lượng mưa, độ cao và độ màu mỡ của đất (CFC/INRO Project Proposal, 1999). RRIM 600 nhiễm bệnh nặng tại Johore, nhưng không bị bệnh ở vùng mùa khô kéo dài Kedah và Pelis (Shamsul và Samsuri, 1996; Darussamin A. và

Pawirosoemardjo S., 1996). Một số ghi nhận cho rằng, ở độ cao trên 300 m thì cao su ít bị bệnh hơn (Jaysinghe, 2000).

2.4. Giới thiệu về thông tin di truyền, tính đa dạng di truyền và chỉ thị

2.4.1. Thông tin di truyền

Nucleic acid, vật liệu mang thông tin di truyền của các hệ thống sống. Như tên gọi là các chất khởi đầu được cô lập từ nhân.

Về mặt cấu tạo hóa học là một polymer hình thành từ các monomer là các nucleotide. Mỗi nucleotide gồm ba thành phần: nhóm phosphate, đường pentose (đường 5 Carbon) và một base hữu cơ (vì các nucleotide chỉ khác nhau ở base nên người ta thường dùng từ “base” thay cho “nucleotide”).

Các base hữu cơ thuộc hai nhóm: các purine gồm Adenine (A) và Guanine (G), các pyrimidine gồm Thymine (T), Cytosine (C) và Uracine (U). Các nucleotide được nối với nhau bằng liên kết phosphodiester tạo thành chuỗi dài. Các base nitrogen của phân tử DNA mang thông tin di truyền, trong khi các nhóm pentose và phosphodiester có vai trò cấu trúc.

Về mặt cấu trúc nucleic acid gồm hai loại phân tử có cấu tạo rất giống nhau là deoxyribonucleic acid (DNA) và ribonucleic acid (RNA). Ở sinh vật eucaryote, thông tin di truyền là phân tử DNA, là một chuỗi xoắn kép gồm hai mạch đơn, mỗi mạch đơn là một chuỗi nucleotide. Hai mạch đơn liên kết với nhau nhờ liên kết hydro hình thành giữa base bổ sung nằm trên hai mạch: A bổ sung với T, G bổ sung với C. Mỗi mạch đơn là một trình tự có định hướng với một đầu là 5' phosphate tự do và một đầu là 3' hydroxyl tự do (hướng quy ước là $5' \rightarrow 3'$). Hướng của hai mạch đơn trong chuỗi xoắn kép ngược nhau, người ta gọi chúng là hai mạch đối song song. Mỗi mạch đơn là một trình tự những base khác nhau, do đó mỗi mạch đơn mang thông tin khác với mạch kia. Hai mạch đơn liên kết với nhau bởi tính chất bổ sung. Chính tính chất này giải thích được cấu trúc chặt chẽ của phân tử DNA, đặc biệt là cách thức tự sao chép để tạo ra hai phân tử con từ một phân tử mẹ (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002; Bùi Trang Việt, 2002; Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

2.4.2. Tính đa dạng di truyền

Trong một giống, các loài khác nhau có trình tự bộ gene khác nhau. Trình tự bộ gene của các cá thể trong một loài cũng có thể khác nhau, do sự xuất hiện của một loại đột biến nào đó. Đôi khi sự khác biệt này lại có ý nghĩa về mặt di truyền, do đột biến xuất hiện tại vị trí của một gene nào đó trong bộ gene của một cá thể, làm cho gene đó không biểu hiện hay biểu hiện khác đi thành một tính trạng khác với những cá thể khác cùng loài. Sự khác biệt về di truyền như vậy được gọi là tính đa dạng di truyền (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

2.4.3. Chỉ thị

Sự khác nhau về di truyền của các cá thể trong cùng một loài (hay giữa các loài trong cùng một giống) có thể biểu hiện hay không biểu hiện thành những tính trạng bên ngoài. Người ta thường tìm kiếm những dấu hiệu để nhận ra được sự khác nhau về di truyền giữa các cá thể (hoặc giữa các loài), gọi là những chỉ thị.

Có 3 loại chỉ thị thường được sử dụng:

- Chỉ thị hình thái.
- Chỉ thị isozyme.
- Chỉ thị phân tử.

2.4.3.1. Chỉ thị hình thái

Gene thể hiện bản chất di truyền sẽ được liên kết với một tính trạng hình thái nào đó mà người ta có thể phát hiện được. Tuy nhiên nếu dựa vào những chỉ thị loại này để lập bản đồ gene và chọn lọc sẽ mất thời gian, số lượng chỉ thị ít do không phải tất cả những tính trạng kiểu hình nào ta cũng có thể nhận diện được, đồng thời độ chính xác và độ tin cậy thấp (Nguyễn Hữu Hồ, 2005).

2.4.3.2. Chỉ thị isozyme

Là những chỉ thị protein. Mỗi protein là sản phẩm biểu hiện của một hay một vài gene, do vậy người ta dựa vào điều này để tìm ra những chỉ thị. Dựa

vào hàng loạt những enzyme giống nhau được mã hóa bởi những allel khác nhau nằm cùng trên một locus. Do sự khác nhau về điện tích của aminoacid, isozyme có thể được phân tách bằng điện di. Nhiều enzyme bất biến trong quần thể và hầu hết sự đa hình của những enzyme này chỉ do một vài biến đổi nhỏ. Kết quả mà chỉ thị isozyme đem lại khả quan hơn so với chỉ thị hình thái do có số lượng chỉ thị có thể phát hiện được nhiều hơn, tuy nhiên số lượng chỉ thị cũng vẫn ít, không đáp ứng cho những nghiên cứu sâu rộng. Nghiên cứu của Nguyễn Hoàng Luân và cộng sự, 2005 trên 9 hệ thống isozyme của 65 kiểu di truyền khác nhau cho thấy sự hạn hẹp về mặt di truyền trên hầu hết các quần thể giống cao su trồng đại trà hiện nay (Nguyễn Hữu Hồ, 2005).

2.4.3.3. Chỉ thị phân tử – chỉ thị DNA

Là những chỉ thị phân tử DNA được tạo ra nhờ những kỹ thuật sinh học phân tử. Ngày nay người ta càng tìm ra được nhiều kỹ thuật đánh giá đa dạng di truyền và phát hiện chỉ thị, tuy nhiên có thể được chia ra làm 2 nhóm:

- Những kỹ thuật dựa trên kỹ thuật PCR (PCR based): RAPD (mục 2.10), STS (mục 2.8), SSR(mục 2.9), AFLP (mục 2.11), v.v.
- Kỹ thuật dựa trên kỹ thuật lai DNA – DNA (Non PCR based): điển hình là RFLP (mục 2.5.) (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

2.5. Kỹ Thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Đây là kỹ thuật sinh học phân tử nhằm phát hiện sự khác nhau về di truyền giữa các cá thể, giữa các loài trong cùng một giống dựa vào sự khác nhau về số lượng và kích thước của những đoạn DNA được tạo ra do sử dụng những enzyme cắt giới hạn (restriction enzymes) cắt toàn bộ bộ gene của những cá thể hay loài được nghiên cứu, sau đó những đoạn DNA được cắt ra này được lai với những probe được đánh dấu huỳnh quang đã biết, kết quả được quan sát qua màu huỳnh quang phát ra. Sử dụng đoạn probe chuyên biệt với loài hay giống cần nghiên cứu. Nguyên lý của kỹ thuật này dựa vào hiện tượng đột biến làm mất hay xuất hiện một vị trí cắt giới hạn,

vì vậy kỹ thuật RFLP có thể phát hiện đột biến mặc dù mức độ tin cậy không cao (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2004).

2.6. Kỹ thuật PCR

2.6.1. Giới thiệu kỹ thuật PCR

PCR (polymerase chain reaction) được mô tả bởi Mulis và cộng sự (1985) là phương pháp tạo dòng in vitro, nghĩa là cũng nhằm mục đích thu nhận một số lượng lớn bản sao của một trình tự xác định. Cơ sở của phương pháp này chính là đặc tính hoạt động của DNA polymerase: chúng chỉ có khả năng tổng hợp một mạch mới từ khuôn kể từ một primer (là một trình tự DNA ngắn) đã bắt cặp sẵn với khuôn. Trong thực nghiệm, primer là những trình tự bổ sung chuyên biệt cho đoạn DNA cần tổng hợp. Trong phản ứng PCR chuẩn cần phải biết trình tự các đầu tận cùng của đoạn DNA cần tăng bội (không cần biết trình tự các vùng giữa), để tạo các oligonucleotide bổ sung cho chúng. Các oligonucleotide có hai chức năng: cho phép định vị phần DNA cần tăng bội và làm primer cho DNA polymerase (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002; Bùi Trang Việt, 2002; Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

2.6.2. Các bước cơ bản quy trình chuẩn của PCR.

Phản ứng PCR được mô tả ở Hình 2.1 gồm 3 bước

- Bước 1: Giai đoạn biến tính (Denaturation) thường là 94°C - 96°C trong vòng 30 giây - 1 phút (tùy thuộc vào vật liệu).
- Bước 2: Giai đoạn bắt cặp (Annealing) thường nhiệt độ dao động khoảng 40 - 72°C thường là 55°C và kéo dài từ 30 giây - 1 phút.
- Bước 3: Giai đoạn tổng hợp hay kéo dài (Extension) lúc này nhiệt độ tăng lên đến 72°C , đây là nhiệt độ tối ưu cho nhiều DNA polymerase chịu nhiệt và kéo dài từ 1 phút đến nhiều phút tùy vào độ dài DNA cần khuếch đại.

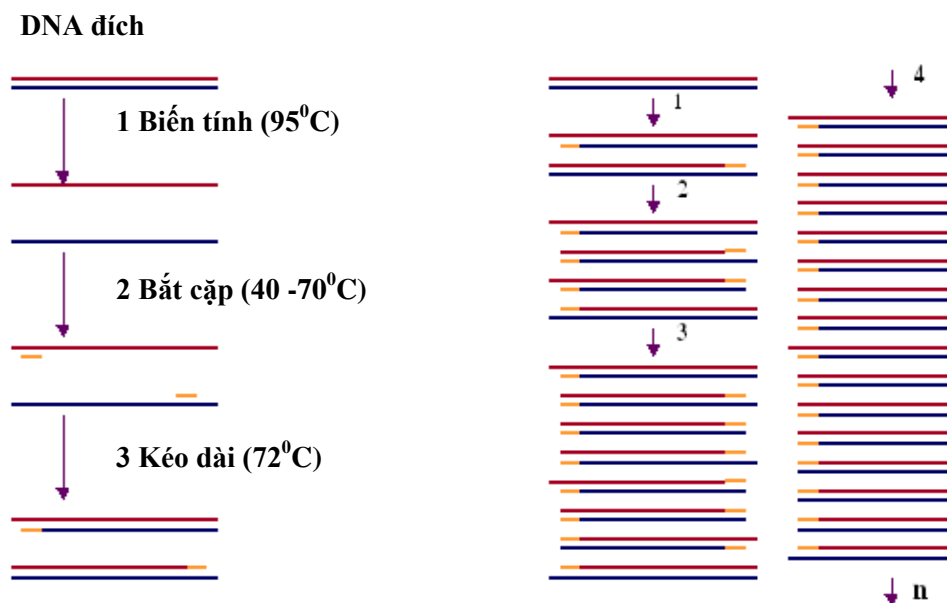
Một chu kỳ bao gồm ba bước trên sẽ được lặp đi lặp lại nhiều lần, và mỗi lần lại làm tăng gấp đôi lượng mẫu của lần trước. Đây là sự khuếch đại theo cấp số nhân. Phản ứng PCR sẽ kéo dài khoảng 25 – 40 chu kỳ (tùy vào ứng dụng

chuyên biệt). Cuối cùng được kết thúc bằng một giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 5 phút, sau đó cho dừng hẳn bằng cách tồn trữ sản phẩm PCR ở nhiệt độ phòng hoặc ở 4°C (tùy vào loại máy PCR được sử dụng) (Bùi Chí Bửu - Nguyễn Thị Lang, 2004).

Số bản sao DNA được tạo ra nhờ kỹ thuật PCR được tính như sau:

$$\text{Tổng số sản phẩm khuếch đại} = m \times 2^n.$$

Trong đó n là số chu kỳ, m là số copy của chuỗi mã hoá cần nghiên cứu. Giả sử chúng ta đạt hiệu quả là 100 %, sau 30 chu kỳ chúng ta sẽ có tổng số sản phẩm khuếch đại là $1,07 \times 10^9$ (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002, Bùi Chí Bửu, 2002, Nguyễn Thị Lang, 2002)



Hình 2.2 Sơ đồ các bước phản ứng chuỗi polymerase

(Nguồn: Nguyễn Thái Thủy, 2003).

2.6.3. Thành phần cơ bản của phản ứng PCR và các yếu tố ảnh hưởng

2.6.3.1. Primer và nhiệt độ lai hay bắt cặp

Primer là những đoạn DNA ngắn, có khả năng bắt cặp với một đầu của mạch khuôn DNA và DNA polymerase sẽ nối dài primer để hình thành mạch mới. primer là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới tính đặc hiệu và tính hiệu quả

của phản ứng khuếch đại. Trình tự của primer thường được chọn sao cho không có sự bắt cặp bổ sung giữa primer xuôi và primer ngược, không có những cấu trúc “kẹp tóc” do sự bắt cặp bổ sung trong mỗi primer và T_m của 2 primer phải không quá cách biệt nhau. Ngoài ra, thành phần nucleotide của primer phải cân bằng, tránh lặp lại nhiều lần các cặp GC. Primer được chọn phải đặc trưng cho trình tự DNA cần khuếch đại, không trùng với các trình tự trên gen. Trình tự nằm giữa hai primer không quá lớn, phản ứng PCR sẽ tối ưu trên những trình tự nhỏ hơn 1 kb (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002).

Có hai loại primer trong phản ứng PCR chuẩn, đó là primer xuôi (forward primer) bắt cặp và gắn vào đầu 3' của mạch khuôn 5' – 3' (sợi sense), primer ngược (reverse primer) bắt cặp và bổ sung gắn ở đầu 3' của mạch khuôn 3' – 5' (sợi antisense). (Bùi Trang Việt, 2002)

Trình tự của primer xác định kích thước, vị trí của sản phẩm PCR và nhiệt độ T_m , giúp ước lượng được nhiệt độ bắt cặp khoảng $T_m - 2$ (thường chỉ đúng với những primer có chiều dài nhỏ hơn 20 basepairs).

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) \quad (\text{Suggs và cộng sự, 1981})$$

Với A, T, G, C là số lượng các nucleotide tương ứng có trong chuỗi primer, tuy nhiên công thức này chỉ để tham khảo hay ước lượng.

Trong hầu hết các ứng dụng PCR thì có nồng độ hai primer bằng nhau, nên từ 1 – 25 pmol cho một phản ứng từ 25 μl – 50 μl (dẫn theo Bùi Chí Bửu – Nguyễn Thị Lang, 1999).

2.6.3.2. DNA mẫu

Kết quả phản ứng PCR phụ thuộc rất lớn vào độ tinh sạch cũng như lượng DNA mẫu. Tuy nhiên, trong kỹ thuật chẩn đoán nhanh bằng PCR, DNA thu nhận trực tiếp từ dịch chiết tế bào nhưng kết quả vẫn tốt. Lượng DNA mẫu thường được sử dụng là 10 - 100 ng. Lượng mẫu phù hợp có tác dụng hạn chế sự khuếch đại tạo các sản phẩm không mong muốn (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002).

Tỉ lệ primer/DNA mẫu : Nếu tỉ lệ này quá cao, hiện tượng dimer – primer sẽ xuất hiện do lượng DNA mẫu thấp và lượng primer quá cao. Ngược lại sản phẩm PCR không nhiều do không đủ primer cho nhân bản.

2.6.3.3. Enzyme DNA polymerase

DNA polymerase: được dùng phổ biến là *Taq* polymerase, lấy từ vi khuẩn suối nước nóng *Thermus aquaticus*, có tính ổn định nhiệt rất cao. Trong hầu hết các protocol, người ta khuyến cáo nồng độ *Taq* sử dụng là 0,5 U / 25 μ l. Nếu nồng độ *Taq* quá cao (> 1,25 U / 25 μ l, những sản phẩm không chuyên tính có thể nhảy vào làm sai lệch kết quả. Nếu nồng độ *Taq* quá thấp, chúng ta sẽ không có đủ số lượng men xúc tác tạo ra sản phẩm PCR mong muốn (Bùi Chí Bửu-Nguyễn Thị Lang, 2004). *Taq* polymerase có thể kéo dài 2 – 4 Kb trên phút, vì thế 1Kb, 1 phút với 72 °C sẽ thành công cho quá trình khuếch đại (Nguyễn Thị Lang, 2002).

2.6.3.4. dNTP

Bốn loại nucleotide thường được sử dụng ở nồng độ là 20 – 200 μ M/ mỗi loại nucleotide. Nồng độ cao hơn sẽ dẫn đến việc tạo ra các sản phẩm không mong muốn. Sự mất cân bằng trong thành phần các nucleotide sẽ làm tăng các lỗi sao chép của polymerase (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002).

2.6.3.5. Ion magnesium (Mg^{2+})

Một trong những nhân tố ảnh hưởng lớn tới phản ứng PCR trong dung dịch đệm là ion Mg^{2+} . Kết quả của phản ứng sẽ tốt nếu như ta cho vào dung dịch phản ứng một nồng độ Mg^{2+} tối ưu.

Nồng độ ion Mg^{2+} trong dung dịch đệm cao hay thấp đều ảnh hưởng rất khác nhau trong phản ứng PCR. Nồng độ Mg^{2+} cao sẽ làm cho dây đôi DNA ổn định hơn, làm sự biến tính và tách DNA từ sợi đôi thành sợi đơn giảm, kết quả là sản phẩm PCR ít đi. Lượng dư Mg^{2+} sẽ làm cho hiện tượng bắt cặp (annealing) không chuyên tính xảy ra, quá trình bắt cặp ở những vị trí không đúng sẽ xảy ra và cho ra những sản phẩm không mong muốn với số lượng lớn, nhưng độ chuyên tính thấp. Ngược lại, nếu nồng độ Mg^{2+} quá thấp, nó sẽ

làm xấu đi quá trình kéo dài (extension). Do đó, người ta cần phải xác định nồng độ tối ưu của ion Mg^{2+} nhằm đảm bảo kết quả số lượng sản phẩm và sự chuyên tính của sản phẩm PCR. Để tối ưu hóa phản ứng PCR người ta thường thay đổi nồng độ của $MgCl_2$ trước tiên để phản ứng xảy ra dễ dàng hơn.

2.6.3.6. Buffer (dung dịch đệm)

PCR buffer thường được cung cấp theo *Taq* – polymerase, có thể có hoặc không có Mg^{2+} . PCR buffer có các chất ổn định hoạt động enzyme (enzyme stabilizer): thường là gelatin ở nồng độ 0,01 % hay Triston X – 100 ở nồng độ 0,1 % .

2.6.3.7. Những ứng dụng quan trọng của phản ứng PCR

Kể từ khi ra đời, phương pháp PCR ảnh hưởng sâu sắc tới các nghiên cứu về sinh học phân tử. Các ứng dụng tiêu biểu của PCR bao gồm: sản xuất mẫu dò dùng trong phương pháp lai phân tử, xác định trình tự acid nucleic, tạo đột biến điểm định hướng. Ngoài ra, PCR còn được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác như: y học, pháp y, ngành khảo cổ học. Gần đây nhất là sự đóng góp thiết thực của kỹ thuật PCR trong việc giải mã bộ gen người.

2.6.3.8. Những hạn chế của phương pháp PCR

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.

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 sau 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 (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002).

◆ Các sai sót gây ra do *Taq* polymerase.

Sự sao chép bởi *Taq* polymerase cho tỷ lệ sai khá cao (cứ 10000 nucleotide thì enzyme gắn sai 1 nucleotid. 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, 2002).

2.7. Kỹ thuật SSCP (Single – Strand Conformation Polymorphism)

Kỹ thuật này dựa trên giả thuyết: sự khác biệt giữa các DNA do sự thay đổi cấu trúc của dây đơn DNA có cấu trúc hình học khác nhau, làm cho DNA dịch chuyển

trên gel với tốc độ và khoảng cách di chuyển khác nhau. Sau khi thực hiện phản ứng PCR, làm biến tính DNA thành dây đơn, điện di và nhuộm bạc. Kỹ thuật SSCP có quy trình thực hiện khó nhưng kết quả có độ tin cậy không cao (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

2.8. Kỹ thuật STS (Sequence – Target Sites)

Do Olson và ctv đề xuất năm 1989, dựa trên nguyên lý: trình tự một đoạn DNA chuyên biệt cho loài, thông qua kỹ thuật PCR nhân bản đoạn DNA đó lên hàng triệu lần và phát hiện qua điện di. Kỹ thuật này có nhược điểm là phải biết trình tự gene của đối tượng nghiên cứu (Nguyễn Thị Lang, 2002).

2.9. Kỹ thuật Microsatellites (SSR – Simple Sequences Repeat)

Kỹ thuật này dựa trên nguyên lý: giữa những giống khác nhau có một đoạn DNA ổn định và chuyên biệt có trình tự đơn giản gồm khoảng 2 – 6 nucleotides được lặp lại nhiều lần (simple sequence repeat), tiến hành phản ứng PCR sử dụng các primer chuyên biệt nhân bản đoạn DNA chuyên biệt này lên. Điều quan trọng là phải biết được những trình tự lặp lại chuyên biệt này để thiết kế primer cho từng giống. Kỹ thuật SSR có độ tin cậy cao, chủ yếu được dùng để định danh những giống hay những loài rất gần nhau về mặt di truyền (Nguyễn Thị Lang, 2002).

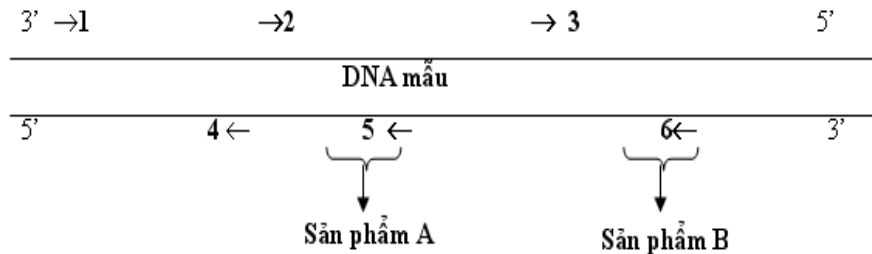
2.10. Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

2.10.1. Giới thiệu về kỹ thuật RAPD

Kỹ thuật RAPD dựa trên kỹ thuật PCR, bằng cách sử dụng những primer ngắn (khoảng 10 nucleotide) có trình tự biết trước, bắt cặp và nhân bản ngẫu nhiên những đoạn DNA có trình tự bổ sung với trình tự của các primer. Theo nguyên tắc, khi 2 cá thể hoàn toàn giống nhau, sau khi thực hiện phản ứng RAPD ở điều kiện như nhau sẽ tạo ra số lượng các đoạn DNA bằng nhau và chiều dài các đoạn DNA tương ứng bằng nhau. Khi có đột biến làm xuất hiện hay mất đi một vị trí bắt cặp ngẫu nhiên sẽ tạo ra số lượng và chiều dài các đoạn DNA khác nhau giữa các cá thể, vì vậy kỹ thuật RAPD có thể phát hiện đột biến. Kỹ thuật

RAPD giúp nhận diện những chỉ thị phân tử trội (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

Kỹ thuật RAPD được minh họa qua hình 2.3:



Hình 2.3 Sự bắt cặp và khuếch đại trong phản ứng RAPD

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

- Sản phẩm A: là sản phẩm PCR khuếch đại một đoạn DNA nằm giữa hai vị trí 2 và 5.
 - Sản phẩm B: là sản phẩm PCR khuếch đại.
 - Không có sản phẩm PCR hình thành bởi các primer nằm ở vị trí 1 và 4 do hai vị trí này quá xa nhau để cho phép hoàn thành sự khuếch đại.
 - Không có sản phẩm hình thành bởi các primer nằm ở vị trí 2 và 4, 3 và 5, do các primer không có chiều hướng vào nhau.
- (Nguồn <http://www.avery.rulger.edu/wssp/student scholarship/project/archive s anion/rapd.html>).

Về cơ bản kỹ thuật RAPD được thực hiện theo ba bước:

- Tách chiết DNA tổng số, nhân DNA bằng máy PCR
- Điện di trên gel agarose hoặc gel polyacrylamid
- Xác định tính đa dạng di truyền bằng các phần mềm thông dụng (NTSYSpc, UPGMA cluster, Gelcompar, lập dendrogram) các số liệu thu

được cho thấy sự gần gũi hoặc cách biệt di truyền của các mẫu nghiên cứu (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

2.10.2. Một số vấn đề trong thực tế khi thực hiện phản ứng RAPD thường gặp phải

- Nồng độ primer tối ưu thường nằm trong khoảng từ 1 – 2mM.
- Nồng độ DNA mẫu khác nhau có thể làm thay đổi số băng trên bảng gel điện di. Vì vậy nồng độ DNA mẫu xem là thích hợp cho mỗi phản ứng: 10 – 50 ng/50 µl thể tích phản ứng.
- PCR buffer thường được cung cấp theo *Taq* - polymerase và có thể có hoặc không có Mg^{2+} . Kỹ thuật RAPD phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ Mg^{2+} , nếu nồng độ Mg^{2+} khác nhau thì sản phẩm RAPD sẽ khác nhau, sự thay đổi nồng độ Mg^{2+} thường thay đổi số lượng băng DNA trên gel.
- *Taq* - polymerase của các nhà sản xuất khác nhau cho kết quả sản phẩm khác nhau rất lớn. Vì vậy, loại *Taq* - polymerase và nồng độ của *Taq* đòi hỏi phải chính xác và được xác định qua thực nghiệm. Việc chọn loại *Taq* polymerase phù hợp là rất quan trọng. *Taq* – polymerase (Promega) và *AmpliTaq* (Perkin Elmer) thì thường sử dụng nhất.
- Chu kỳ nhiệt có thể có sự thay đổi về số chu kỳ và nhiệt độ, điều này phụ thuộc vào máy PCR và độ dày của eppendorf. RAPD thường được tiến hành với 45 chu kỳ (KurtWeising, Hide Nybom, Kirten Wolff, Wieland Meyer, 1995).

2.10.3. Những ưu điểm của kỹ thuật RAPD

- Về mặt kỹ thuật: kỹ thuật RAPD dễ thực hiện và dễ thành công do không cần biết trước trình tự bộ gene của đối tượng cần nghiên cứu, thao tác đơn giản. Chất lượng DNA khuôn không cần độ tinh sạch cao, thời gian thực hiện nhanh, khả năng nhân bản cao.
- Về mặt kinh tế: chi phí thực hiện thấp. Kỹ thuật RAPD thường được sử dụng kết hợp với những kỹ thuật cao cấp khác để đánh giá đa dạng di

truyền và nhận diện chỉ thị phân tử có độ tin cậy cao (Nguyễn Thị Lang, 2002).

2.10.4. Những hạn chế của kỹ thuật RAPD

- Kỹ thuật RAPD có độ chính xác không cao, không ổn định (thể hiện ở mức độ lặp lại giống nhau thấp).
- Khả năng nhân bản trong phản ứng PCR cao nhưng khả năng xuất hiện đa hình thấp và độ tin cậy không cao. Khả năng nhận diện chỉ thị phân tử thấp và có độ tin cậy không cao (Nguyễn Thị Lang, 2002).

2.10.5. Ứng dụng của kỹ thuật RAPD

Kỹ thuật RAPD được phát minh và sử dụng ngay sau khi kỹ thuật PCR ra đời, mặc dù cho kết quả có độ tin cậy không cao nhưng vẫn còn được sử dụng do ưu điểm dễ thực hiện và chi phí thấp. Những ứng dụng của kỹ thuật RAPD:

Đánh giá đa dạng di truyền: đã được áp dụng trên các đối tượng: cúc lai, cà phê, bắp, đậu nành, lúa mì, lúa mạch, dâu tây, khoai tây, cà chua.v.v. Cần quan tâm đến yếu tố nồng độ DNA, điều kiện thí nghiệm, chương trình chạy PCR và cần lựa chọn primer thích hợp cho sự đa hình cao. Đối với nấm bệnh thực vật thì kỹ thuật RAPD đã được áp dụng để phân tích đa dạng di truyền của nhiều loại nấm khác nhau: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not (Goodwin and Annis, 1991), *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei (Silva và cộng sự, 1995) và *D. teres* (Peever và Milgroom, 1994; Peltonen và cộng sự, 1996).v.v.(Nguồn: <http://library.uws.edu.au/adt-NUWS/uploads/approved/adt-NUWS20050722.084916/public/04Chapter3.pdf>).

Nhận diện chỉ thị phân tử: ở Việt Nam, nghiên cứu đa dạng di truyền và mối tương quan giữa kiểu gene RGA và kiểu hình phản ánh bệnh đạo ôn của một số giống lúa ở Việt Nam (Lã Tuấn Nghĩa và ctv, 1999) (Nguyễn Thị Lang, 2002).

Ngoài ra kỹ thuật RAPD còn được áp dụng xây dựng bản đồ gene: (Nguyễn Thị Lang, 2002).

2.10.6. Sự cách tân của kỹ thuật RAPD

Đã có vài cách tân của kỹ thuật RAPD được mô tả. Kỹ thuật thứ nhất là sử dụng cùng lúc 2 primer khác nhau thay vì sử dụng 1 primer như kỹ thuật RAPD thông thường. Việc sử dụng cùng lúc 2 primer khác nhau làm xuất hiện những băng hoàn toàn khác, hoặc mất đi những băng đã xuất hiện so với khi sử dụng từng primer riêng rẽ. Việc lựa chọn, sử dụng cùng lúc 2 primer khác nhau một cách phù hợp cũng có thể làm tăng tính đa hình của những primer cho sản phẩm ít đa hình.

Cách tân thứ 2 là cắt DNA bằng các enzyme giới hạn trước hoặc sau khi thực hiện phản ứng PCR. Sự cắt này cũng có thể tạo ra hai kết quả. Một là có thể làm giảm số lượng các băng khó xác định (complex band) điều đó dễ dàng hơn cho việc đánh giá đa dạng di truyền. Hai là tạo ra sự đa hình ở các mẫu có hạn chế về sự đa hình. Tuy nhiên việc sử dụng những cách tân tuy thuộc vào chiến lược nhằm làm tăng số chỉ thị (marker) đa hình có thể hoặc đạt được các chỉ thị (marker) đồng trội. Những cách tân này có hạn chế là làm giảm đi lợi thế của kỹ thuật RAPD cụ thể là tốc độ, giá thành, sử dụng phức tạp hơn (Kurt Weising, Hide Nybom, Kirten Wolff, Wieland Meyer, 1995).

2.11. Kỹ thuật AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)– đa dạng chiều dài các đoạn DNA được nhân bản chọn lọc, là phương pháp dựa trên nguyên tắc PCR. Ở đây sản phẩm PCR là kết quả của quá trình nhân bội các đoạn DNA sau khi đã được cắt bằng enzyme giới hạn (Zabow M. và Vos P., 1993).

Nguyên lý của kỹ thuật này như sau: trước khi làm phản ứng PCR người ta gắn các đoạn DNA ngắn (adaptor) vào hai đầu của mảnh DNA đã được cắt bằng enzyme giới hạn sau đó thiết kế các primer theo các đoạn DNA ngắn có gắn thêm một hoặc một số nucleotide và tiến hành phản ứng PCR. Khi thay đổi số lượng và trật tự các oligonucleotid được chọn lọc ở các đầu nối ta có thể nhận được những đoạn DNA được nhân bản khác nhau. Sản phẩm được phân tích trên gel polyacrymide, kết quả thu được thường là 50 - 100 băng DNA trên mẫu thí nghiệm.

Kỹ thuật AFLP là phương pháp xác định đa hình cao, tiết kiệm thời gian, dễ dàng lặp lại và có thể sử dụng để phân tích DNA ở bất kỳ mức độ nào (Zabeau, 1993). AFLP là loại chỉ thị di truyền trội, giá thành đắt nên phần nào hạn chế sử dụng (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

2.12. Nghiên cứu trong và ngoài nước

2.12.1. Những nghiên cứu về *C. cassiicola* ngoài nước

2.12.1.1. Nghiên cứu tình hình bệnh do *C. cassiicola* gây ra trên cây cao su tại một số nước trồng cao su

Đây là bệnh mới và có tác hại lớn chưa từng có từ trước tới nay tại các nước trồng cao su trên thế giới.

Bệnh xuất hiện quanh năm và mọi giai đoạn sinh trưởng của cây cao su, gây hại cho các dvt cao su mẫn cảm: RRIC 103, PNN 2058, PNN 2444, PNN 2447, KRS 21, FX 25, RRIM 725, IAN 873.v.v.

Tình hình bệnh và diễn biến bệnh ở các quốc gia, các vùng địa lý khác nhau là khác nhau. Dịch hại do *C. cassiicola* gây ra được ghi nhận lần đầu tiên vào năm 1980. Ngày nay bệnh xuất hiện tại 12 nước trồng cao su, trong đó gây hại nặng tại 5 nước sau (Jayasinghe, 2000, IIRDB, 2002).

Tại Sri Lanka, có 4.300 ha cao su thuộc dvt RRIC 103 bị nhiễm bệnh nặng, phải nhổ bỏ và trồng lại bằng các dvt kháng bệnh. Chính phủ phải bồi thường 64.000.000 Rp cho những người trồng cao su. Ngoài các dvt bị nhiễm bệnh nặng trước đây như RRIC 103, RRIC 104, KRS 21 đã bị loại bỏ từ đầu, các dvt khác mà vào thập niên 80 được đánh giá là kháng bệnh nay lại bị hại nặng gồm: RRIM 600, GT 1, RRIC 110, IAN 873, PB 260, PB 28/59, PB 235 và RRII 105 (Jayasinghe, 2000).

Ở Indonesia, có 400 ha cao su bị nhổ để trồng lại với ước tính thiệt hại khoảng 200 triệu Rp. Một số dvt phải kéo dài thời gian KTCB 8 - 10 năm và làm giảm sản lượng 30 - 50% đối với vườn cây khai thác. Các dvt mẫn cảm với bệnh gồm: RRIC 103, GT 1, KRS 21, FX 25, BPM 6, RRIM 600, RRIM 725 và IAN 873 (Wisma và Harmidi, 1996).

Ở Malaysia, bệnh ghi nhận tại tất cả các vùng trồng cao su trong cả nước, nặng nhất tại Johor và Trengganu. Các dvt nhiễm bệnh gồm: GT 1, RRIM 600, RRIM 701, RRIM

703, RRIM 712, RRIM 725, RRIM 901, RRIM 2009, RRIM 2015, RRIM 2020, PR 261, IAN 873 và PB 217 (Shamsuri và cộng sự, 2000).

Ở Ấn Độ, các dvt nhiễm bệnh ở vườn cây trồng thành gồm: GT 1, RRIM 600 và RRII 105, 118. Tại vườn nhân, gồm các dvt : RRII 105, 118, 300, 305, PR 107, 255, 261, RRIM 600, PB 235, 255, 260, 311 và GT 1. Đặc biệt dvt RRII 105 mắc cảm nặng với bệnh đã gây nhiều chú ý do trên 80% cao su tại Ấn Độ trồng dvt này (Sabu, 2000).

Ở Thái Lan, bệnh được ghi nhận năm 1985 tại thí nghiệm trao đổi giống cao su quốc tế 7 năm tuổi ở trạm Surat Thani. Bệnh gây chết dvt RRIC 103 và rụng lá nặng trên dvt KRS 21.

Các dvt như RRIC 103 và KRS 21 đã bị loại bỏ hoàn toàn tại nhiều quốc gia trồng cao su trên thế giới. Dòng vô tính RRIC 110 cũng bị loại bỏ tại Châu Phi năm 1995 do mắc cảm với bệnh (Ismail và cộng sự, 1996; Darussamin A. và Pawirosoemardjo S., 1996).

2.12.1.2. Các nghiên cứu khác

Nấm *C. cassiicola* trên các ký chủ khác nhau cũng đã được nghiên cứu và so sánh mức độ khác biệt về di truyền và tìm hiểu khả năng nhận biết các dòng *C. cassiicola*, cũng như mức độ và khả năng gây độc của *C. cassiicola*. Kết quả của những nghiên cứu này cho thấy, tính độc của *C. cassiicola* ngày càng phát triển đa dạng và rất biến thiên, khả năng gây độc của *C. cassiicola* trên các dvt cao su khác nhau, tùy theo giai đoạn sinh trưởng. *C. cassiicola* có khả năng tổng hợp các enzyme phân giải pectin và enzyme phân giải cellulose ngoài cơ chế biến dưỡng độc tố (C.K. Jayashinge, 2000).

Những khác biệt về di truyền của nấm bệnh *C. cassiicola* trên ký chủ khác nhau đã được nghiên cứu bằng phân tích đa hình RFLP trên vùng ITS (internal transcribed spacer) của ribosome DNA và đa hình các đoạn DNA được khuếch đại từ DNA tổng số (PCR-RAPD). Tuy nhiên những nghiên cứu bằng phân tích đa hình RFLP trên vùng ITS (internal transcribed spacer) của ribosome DNA hầu như không có sự khác biệt. Silva và cộng sự, 1998 đã đọc trình tự một phần vùng ITS của một nguồn nấm *C. cassiicola* từ Srilanka và một nguồn nấm *C. cassiicola* từ Úc kết quả cho thấy mức tương đồng cao.

Ngược lại những nghiên cứu bằng kỹ thuật RAPD lại cho thấy sự khác biệt di truyền đáng kể giữa các nguồn nấm *C. cassiicola*.

Nghiên cứu biến dị di truyền của 42 nguồn nấm *C. cassiicola* trên các ký chủ khác nhau bằng phương pháp RAPD của Silva và cộng sự (1995) cho thấy, có 5 nhóm di truyền đã được xác định, điều này có nghĩa là có sự khác biệt di truyền đáng kể giữa các nguồn nấm *C. cassiicola* thu thập từ các ký chủ khác nhau. Những kết quả nghiên cứu này làm cho việc nghiên cứu tạo các dvt cao su kháng bệnh trở nên dễ dàng hơn (Silva và cộng sự, 2003).

Kỹ thuật RAPD với 14 primer được sử dụng đã phát hiện được khác biệt đáng kể giữa một số nguồn nấm *C. cassiicola* trên ký chủ khác nhau: đu đủ, húng, cao su, trình nữ. Phân tích theo nhóm các đoạn DNA được khuếch đại cho thấy 5 nguồn nấm được xếp vào 3 nhóm di truyền khác nhau tương ứng với nguồn gốc ký chủ và đặc điểm hình thái. Các kỹ thuật này có thể được mở rộng để nghiên cứu biến dị trong cùng nguồn nấm *C. cassiicola* trên cây cao su ở Sri Lanka, nơi mà các chủng *C. cassiicola* độc tính cao đã xuất hiện đe dọa nghiêm trọng cho ngành công nghiệp cao su thiên nhiên của nước này (Silva và cộng sự, 2002).

Safiah Atan và Noor Hisham Hamid (2003) đã sử dụng kỹ thuật RAPD để phân tích 9 nguồn nấm *C. cassiicola* từ *Hevea brasiliensis*. Kết quả đã phân biệt được 2 nhóm nguồn nấm, là nguồn nấm gây nhiễm cho các dvt RRIM 2020 và nhóm nguồn nấm gây nhiễm cho các dvt RRIM 600 và các dvt cao su khác. Silva và cộng sự (1998) kết hợp nghiên cứu đặc điểm hình thái, độc tính và đặc điểm phân tử của nấm *C. cassiicola* thu nhận từ các đồn điền cao su ở Sri Lanka. 32 nguồn nấm *C. cassiicola* được thu nhận từ phổ ký chủ rộng và địa điểm khác nhau đã được phân tích bằng kỹ thuật RAPD sử dụng 15 primer ngẫu nhiên khuếch đại hệ gen *C. cassiicola*. Kết quả đã xác định được có 7 nhóm RAPD khác nhau, các nguồn nấm có sự tương quan rất lớn giữa nhóm RAPD và vị trí phân lập cũng như kiểu gen của cây trồng ký chủ mà từ đó các nguồn nấm được phân lập. Ngoài ra, cũng có mối tương quan giữa nhóm RAPD với tỷ lệ tăng trưởng của nguồn nấm và tính độc trên các cây trồng ký chủ khác nhau.

2.12.2. Những nghiên cứu về *C. cassiicola* trong nước

Ở Việt Nam bệnh xuất hiện lần đầu vào tháng 8 năm 1999 tại trại thực nghiệm cao su Lai Khê, Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam. Các dvt LH 88/372, RRIC 103 và RRIC 104 bị hại nặng và phải cưa bỏ và xử lý bằng 0,5 % Benlate C 50 WP. Do bệnh là đối tượng kiểm dịch loại 2, nên khi vừa phát hiện, Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam, cùng với Chi Cục Bảo Vệ Thực Vật Vùng II và Tổng Công Ty Cao Su Việt Nam đã thống nhất loại bỏ tất cả những dvt mắc cảm nhằm dập tắt nguồn bệnh ngay từ ban đầu (Tổng Công Ty Cao Su Việt Nam, 2004). Ở điều kiện đồng ruộng, mức độ nhiễm bệnh của các dvt khác biệt rất lớn so với điều kiện trong phòng và tỷ lệ bệnh hầu như không đáng kể. Tính đến năm 2002 đã có trên 60 dvt thuộc nhiều phổ hệ khác nhau bị nhiễm. Nấm hình thành nhiều nòi sinh lý mới sẽ tăng nguy cơ gây hại cho các dvt cao su. Hiện bệnh đang trong giai đoạn tích lũy và có nguy cơ bùng phát trong tương lai (Phan Thành Dũng, 2006). Những nghiên cứu về bệnh rụng lá *Corynespora* ở Việt Nam hiện nay mới chỉ dừng lại ở việc quan sát đánh giá tình hình bệnh, kiểm tra tính kháng của một số dvt cao su tuy nhiên hiện vẫn chưa có những số liệu đầy đủ của các nghiên cứu này.

Theo một số ghi nhận ban đầu, bệnh gây thiệt hại về sinh trưởng và sản lượng do tán lá không đủ để cây sinh trưởng và duy trì sản lượng. Một số vườn khai thác bị hại nặng có sản lượng chỉ bằng 1/3 -1/2 so với vườn cây có cùng điều kiện không bị nhiễm bệnh. Sinh trưởng cũng chậm, tỷ lệ khô miệng cạo và cỏ trong vườn cũng gia tăng hơn so với vườn cây không bị hại. Ngoài ra, cùng dvt và tuổi cây, bệnh phân bố khác nhau, trong đó gây hại nặng tại những vùng thấp ẩm ướt hơn so với vùng cao có điều kiện thông thoáng hơn (Phan Thành Dũng và Nguyễn Thái Hoan, 2000).

Việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để nghiên cứu về *C. cassiicola* chưa nhiều. Năm (2005), Vũ Thị Quỳnh Chi đã phân tích RFLP trên vùng ITS đã được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Tuy nhiên 7 nguồn nấm *C. cassiicola* được nghiên cứu đều không có sự khác biệt.

PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thời gian và địa điểm tiến hành

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 02/2006 đến tháng 08/2006 qua hai giai đoạn.

3.1.1. Giai đoạn 1

- Tiến hành từ tháng 4 đến tháng 5 năm 2006.
- Thu thập mẫu bệnh *C. cassiicola* từ một số dvt cao su, tiến hành phân lập, tách đơn bào từ nấm *C. cassiicola* tại phòng thí nghiệm Bộ Môn Bảo Vệ Thực Vật, Viện Nghiên Cứu Cao Su Việt Nam - Lai Khê, Bến Cát, Bình Dương.

3.1.2. Giai đoạn 2

- Tiến hành từ tháng 5 đến ngày 15 tháng 8 năm 2006.
- Tiến hành nhân sinh khối, phân tích RAPD tại Phòng Thí Nghiệm Công Nghệ Sinh Học Bảo Vệ Thực Vật – Trung Tâm Phân Tích Và Thí Nghiệm Hoá Sinh Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.

3.2. Đối tượng nghiên cứu

Một số mẫu lá cao su thuộc các dvt cao su khác nhau có biểu hiện các triệu chứng đặc trưng của bệnh rụng lá *Corynespora* (mục 2.3.1.2).

3.3. Nội dung và phương pháp

3.3.1. Phương pháp lấy mẫu

- Mẫu được lấy vào buổi sáng sớm khi độ ẩm không khí còn cao, bào tử còn nằm trên lá và chưa phát tán vào không khí.
- Thông thường, mẫu được lấy trước 8h sáng.
- Mẫu được ghi rõ tên dvt lấy mẫu, địa điểm lấy mẫu, lá non hay lá già, vết bệnh đặc trưng hay không đặc trưng. Mẫu lá bệnh được đặt vào hộp có đặt giấy thấm nước để giữ ẩm.

3.3.2. Phân lập

3.3.2.1. Hóa chất và dụng cụ

- Dụng cụ: bình tam giác, ống nghiệm, đĩa petri, que cấy, đèn cồn, pence, lame, lamelle, giá đỡ ống nghiệm, becher, kính hiển vi quang học, nồi hấp Tommy, tủ sấy, hộp đựng mẫu, giấy thấm nước, bút lông.
- Hóa chất:
 - Thuốc nhuộm Methylene blue.
 - Môi trường PSA hoặc PDA (tự pha chế theo công thức do Chee đề xuất năm 1988).

Bảng 3.1 Thành phần môi trường PSA, PDA

Thành phần	Môi trường PSA (g/l)	Môi trường PDA(g/l)
Khoai Tây	100	200
Đường	10	2
Agar	15	15
Nước cất	Nước cất vừa đủ 1lít	Nước cất vừa đủ 1lít

- Cách nấu môi trường PSA:

- Khoai tây gọt vỏ rửa sạch, cân đủ 100g, thái nhỏ hạt lựu, thêm 500 ml nước cất 2 lần đun sôi trong 30 phút.
- Lọc lấy nước trong.
- Thêm 15g agar và 500 ml nước cất vào dung dịch đã lọc.
- Bổ sung thêm nước cất cho đủ 1000 ml và thêm 10g đường sucrose.
- Đun sôi trong 30 phút, khuấy đều trong lúc nấu.

Phân vào các ống nghiệm (10 ml/ ống) và đem hấp khử trùng ở 121°C/ 15 phút.

Môi trường PDA được thực hiện tương tự như môi trường PSA.

3.3.2.2. Phương pháp phân lập

- Mẫu nấm được phân lập từ vết bệnh đặc trưng của bệnh rụng lá *Corynespora*.

- Cách thực hiện như sau: Lá có triệu chứng bệnh đặc trưng được đưa về phòng thí nghiệm, rửa bằng nước cất vô trùng 3 lần, dùng que cấy nấm đã khử trùng ướt và khô, sau đó đốt trên ngọn lửa đèn cồn, để nguội, lấy trực tiếp bào tử ngay trên vết bệnh cấy vào đĩa môi trường (5 điểm/đĩa).
- Phương pháp phân lập từ một bào tử, sau hai ngày những khuẩn lạc nghi ngờ là nấm *C. cassiicola* được cấy sang đĩa môi trường mới (môi trường PDA) và đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang 12h/ngày ở điều kiện nhiệt độ phòng (26 - 30°C). Khi nấm phát triển, tiến hành cấy chuyển sang môi trường mới cho đến khi thu được nguồn nấm thuần chủng.
- Trong phân lập nấm *C. cassiicola* thường lấy bào tử ở mặt dưới của phiến lá. Mặt dưới của phiến lá là nơi thuận lợi cho sự phát triển của nấm hơn bề mặt trên của lá. Tầng cutin mỏng giúp nấm xâm nhập vào mô lá dễ dàng hơn, nấm ít chịu ảnh hưởng của các điều kiện môi trường, đặc biệt là tia tử ngoại của ánh sáng mặt trời.
- Sử dụng phương pháp phân lập như trên có thể thu nhận được nguồn nấm *C. cassiicola* đơn bào tử. Tuy nhiên, cần lưu ý là phương pháp này chỉ thực hiện được đối với nấm *C. cassiicola* do kích thước của bào tử nấm *C. cassiicola* tương đối lớn.
- Với phương pháp phân lập như trên, sau khi phân lập các mẫu nấm cần phải được kiểm tra lại bằng cách quan sát hình thái sợi nấm và bào tử của nấm *C. cassiicola* dưới kính hiển vi.
- Nấm *C. cassiicola* rất khó tạo bào tử trên môi trường nhân tạo, để tạo được bào tử *C. cassiicola* trên môi trường nhân tạo có thể tiến hành theo phương pháp sau:
 - Các mẫu nấm sau khi thuần được cấy vào đĩa etri có chứa 10 ml môi trường PSA.
 - Nuôi cấy trong điều kiện tối liên tục 24/24h ở điều kiện nhiệt độ phòng trong 5 ngày.

– Sau 5 ngày nuôi cấy sử dụng một tấm lame vô trùng cạo nhẹ trên bề mặt khuẩn lạc để kích thích sợi nấm tạo bào tử (Chee, 1988).

– Tiếp tục nuôi cấy ở điều kiện chiếu sáng hoàn toàn 24/24h ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Sau thời gian trên tiến hành kiểm tra lại nguồn nấm bằng cách soi bào tử dưới kính hiển vi (đặt bào tử trong giọt nước cất hoặc giọt dung dịch methylene blue). Hình dạng bào tử được so sánh với những mô tả của Ellis và Holiday (1971). Các nguồn nấm được xác định chính xác là nấm *C. cassicola* sẽ được sử dụng vào những phân tích tiếp theo.

3.3.2.3. Phương pháp tách đơn bào tử nấm *C. cassicola*

Đặt các lame sạch vào đĩa petri, hút 1 ml môi trường agar cho vào lame và trang thành một lớp mỏng. Hút 10 ml nước cất 2 lần vô trùng cho trực tiếp vào đĩa nấm, quan sát mật độ bào tử dưới kính hiển vi và pha loãng tới mật độ thích hợp thuận lợi cho quá trình tách đơn bào tử. Hút 0,1 ml dịch bào tử chuyển lên lame agar đã chuẩn bị, dùng que cấy tam giác trang đều cho đến khi bề mặt agar khô hoàn toàn.

Sau đó đem ủ ở nhiệt độ phòng qua đêm (khoảng 10 – 12 giờ) bào tử bắt đầu nảy mầm trên bề mặt môi trường. Đặt lame dưới kính hiển vi quan sát những bào tử nào mọc mầm riêng lẻ, sau đó đánh dấu vùng có đơn bào tử. Dùng dao cắt cẩn thận, vùng cắt càng nhỏ thì độ chính xác càng cao. Sau khi cắt xong đặt vào đĩa môi trường PGA chuẩn bị sẵn, đem ủ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối vài ngày để cho đơn bào tử phát triển thành khuẩn lạc. Sử dụng khuẩn lạc này để nhân sinh khối sợi nấm (*C. Kuruvilla* Jacob và cộng sự, 2002).

3.3.3. Nhân sinh khối

3.3.3.1. Dụng cụ

Máy lắc, bình tam giác, kim mũi mác, đèn cồn.v.v.

3.3.3.2. Phương pháp

- Các dòng nấm *C. cassiicola* sau khi đã phân lập thuần được chuyển sang môi trường lỏng, tiến hành nuôi cấy trên máy lắc (160 vòng/phút), điều kiện nhiệt độ 26 - 30°C.
- Sau 4 ngày tiến hành thu sinh khối sợi nấm. Cần lưu ý là sợi nấm phải khô và nên giữ nguồn sợi nấm ở -70°C.

3.3.4. Tách chiết DNA

3.3.4.1. Hóa chất và dụng cụ ly trích

- Becher, phễu lọc, giấy thấm, nitơ lỏng, phenol, chloroform, isoamyl alcohol, lysis buffer, isopropanol, TE 1X, ethanol 100%, ethanol 70%.
- Cối và chày để nghiền mẫu, eppendorf, micropipette và các loại đầu tít, bồn ủ nhiệt Memmert, máy vortex.

3.3.4.2. Phương pháp ly trích

Phương pháp ly trích DNA được thực hiện theo quy trình của Lee và Taylor có cải tiến (Vũ Thị Quỳnh Chi, 2005) như sau:

- 1) Nuôi trong môi trường lỏng.
- 2) Giữ sợi nấm ở - 70°C.
- 3) Lấy 1g sợi nấm khô kiệt vào cối và nghiền trong dung dịch nitơ lỏng.
- 4) Chuyển phần bột nấm vào ống eppendorf. Ở bước này, cố gắng giữ cho bột nấm được nghiền không tan.
- 5) Thêm 400 µl lysis buffer (xem phụ lục 2), trộn đều hỗn hợp.
- 6) Ủ ở 65°C trong 1 giờ.
- 7) Di chuyển ống nghiệm ra khỏi dung dịch nước ấm (ra khỏi bồn ủ nhiệt).
- 8) Thêm vào 300 µl phenol: chlorophorm và isoamyl alcohol. (25:24:1), lắc nhẹ (lúc này dung dịch có màu trắng đục). Ly tâm 14 000 vòng trong 1 phút ở 28°C.

9) Chuyển phần trên ống eppendorf sang một eppendorf khác với thể tích 300 μ l và kết tủa DNA bằng cách thêm vào $\frac{1}{2}$ thể tích isopropanol, trộn nhẹ và cẩn thận. DNA sẽ kết tủa dạng sợi màu trắng đục.

10) Ly tâm 14000 vòng trong 1 phút ở 28°C.

11) Cẩn thận đổ bỏ phần dịch lỏng. Dùng ethanol 70 % rửa sạch nhiều lần DNA.

12) Làm khô DNA, hoà tan trong dung dịch TE 1X và tồn trữ ở 4°C hay - 20°C cho đến khi sử dụng.

3.3.4.3. Kiểm tra chất lượng DNA

- Yêu cầu DNA được tách chiết có chất lượng tốt (trung 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 bản 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 theo qui trình như sau (Nguyễn Thị Lang, 2002).
 - Chuẩn bị gel agrose
 - Chuẩn bị DNA cho loading: dùng parafilm để đặt DNA lên (khoảng 10-15 μ l cho 1 mẫu)+4 μ l dung dịch nhuộm
 - Đầu tiên đặt mẫu DNA chuẩn : mẫu DNA chuẩn dùng cho thí nghiệm là 0,5X (5 μ l), 1X (10 μ l) và 2 (20 μ l). Các mẫu chuẩn này đặt bên cạnh các mẫu thí nghiệm để dễ dàng so sánh kết quả.
 - Điện di và 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 4⁰C để dùng cho việc chạy RAPD –PCR.

3.3.5. Thực hiện phản ứng RAPD

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

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

3.3.5.1. Hóa chất và dụng cụ

a> Các hóa chất cần thiết cho kỹ thuật RAPD.

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Trisbase 1M. | 7. Ethidium bromide. |
| 2. KCl 1M. | 8. Methylene blue. |
| 3. <i>Taq</i> polymerase (Promega). | 9. Thang chuẩn (DNA.ladder) |
| 4. Dầu khoáng (Mineral oil). | 10. Bromphenol blue. |
| 5. dNTPs. | 11. Xylenecyanode FF. |
| 6. Agarose. | 12. Glycerol. |

13. Phản ứng RAPD –PCR được thực hiện với 3 primer sau:

Bảng 3.2 Các primer dùng cho phản ứng RAPD

Tên primer	Trình tự(5'-3')	Tm ^o C
OPL-08	AGCAGGTGGA	36
OPM-05	GGGAACGTGT	35
OPD-18	GAGAGCCAAC	32

b>Dụng cụ.

1. Pipet.
2. Máy PCR.
3. Máy ly tâm.
4. Máy điện di.
5. Máy chụp hình DNA Geldoc.
6. Lò vi sóng(Oven).
7. Tủ lạnh -20^o C,- 40^oC.

3.3.5.2.

3.3.5.3. Khảo sát qui trình RAPD

- Mục đích tối ưu hóa qui trình RAPD.
- Căn cứ trên một số yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng RAPD ở mục (2.10.2). Việc bố trí thí nghiệm để khảo sát tùy vào sản phẩm của phản ứng → phân tích → đưa ra những thí nghiệm phù hợp nhằm đáp ứng mục đích chung của thí nghiệm.

Quá trình khảo sát tiến hành qua các thí nghiệm sau.

A> Thí nghiệm 1.

- Mục đích thí nghiệm: khảo sát quy trình RAPD.
- Chỉ tiêu đánh giá: các băng DNA trên gel điện di.
- Phương pháp tiến hành: theo quy trình với thành phần hóa chất, chương trình nhiệt ghi trong bảng sau.

a> Thành phần phản ứng cho thí nghiệm 1.

Bảng 3.3 Thành phần hóa chất cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1(Silva và cộng sự, 2003)

Hóa chất	Dung dịch gốc	Nồng độ cuối	Thể tích sử dụng
PCR buffer	10X	1X	1,μl
MgCl ₂	25 mM	1,8 mM	0,72 μl
dNTP	10 mM	0,2mM	0,2 μl
primer	10 pmol/μl	0,5 mM	0,5 μl
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U	0,5 U	0,1 μl
DNA mẫu	10 ng/μl	10 ng	1 μl
H ₂ O			5,58 μl

b>Chương trình nhiệt cho thí nghiệm 1.

Bảng 3.4 Chương trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1 (Silva và cộng sự, 2003)

Số chu kỳ	Bước	Nhiệt độ(độ °C)	Thời gian
40	Bước1	94	1 phút
	Bước 2	36	1 phút
	Bước 3	72	1 phút
Giữ	4°C		

B> Thí nghiệm 2.

- Mục đích thí nghiệm : khảo sát ảnh hưởng của yếu tố chu kỳ đến phản ứng RAPD.
- Chỉ tiêu đánh giá: các băng DNA trên gel điện di.
- Phương pháp tiến hành: theo quy trình với thành phần hóa chất và chương trình nhiệt ghi trong bảng sau :

a> Thành phần hóa chất cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 2: giống thí nghiệm 1 (Bảng 3.1).

b> Chương trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 2:

Bảng 3.5 Chương trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 2

Số lần lặp lại	Các bước	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Thời gian
1	1	94	1 phút
Lần, lượt tăng	2	94	45 giây.
từ 40, 42, 45	3	35	1 phút
	4	74	3 phút
1	5	72	10 phút
	6	giữ 4°C	

C> Thí nghiệm 3:

- Mục đích thí nghiệm: khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố MgCl_2 , dNTPs và primer, *Taq* - polymerase, DNA lên phản ứng RAPD.
- Chỉ tiêu đánh giá: số lượng và chất lượng các băng DNA trên gel điện di.
- Phương pháp tiến hành: theo quy trình với thành phần hóa chất và chương trình nhiệt ghi trong bảng sau:

a> Thành phần hóa chất cho phản ứng RAPD của các nghiệm thức trong thí nghiệm 3.

Bảng 3.6 Thành phần hóa chất cho phản ứng RAPD của các nghiệm thức - trong thí nghiệm 3

Nghiệm thức	Hóa chất	Dung dịch gốc	Thể tích sử dụng	Nồng độ cuối
	PCR buffer	10X	1 µl	1X
	<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U	0,1 µl	0,5U
	DNA mẫu	10 ng/µl	1 µl	10 ng
1	MgCl ₂	10 mM	2,1 µl	2,1 mM
	dNTP	10 mM	0,2 µl	0,2 mM
	primer	10 pmol/µl	0,5 µl	0,5 mM
2	MgCl ₂	10 mM	2,5 µl	2,5 mM
	dNTP	10 mM	0,2 µl	0,2 M
	primer	10 pmol/µl	0,5 µl	0,5 mM
3	MgCl ₂	10 mM	2,5 µl	2,5 mM
	dNTP	10 mM	0,3 µl	0,3 mM
	primer	10 pmol/µl	0,5 µl	0,5 mM
4	MgCl ₂	10mM	2,5 µl	2,5 mM
	dNTP	10mM	0,3 µl	0,3 mM
	primer	10 pmol/µl	0,6 µl	0,6 mM
5	MgCl ₂	10 mM	2,5 µl	2,5mM
	dNTP	10 mM	0,3 µl	0,3mM
	primer	10 pmol/µl	0,4 µl	0,4mM
6	MgCl ₂	10 mM	2,5 µl	2,5 uM
	dNTP	10 mM	0,35 ul	0,35 mM
	primer	10 pmol/µl	0,7 µl	0,7 mM
	H ₂ O		Thêm vào cho đủ 10 µl	

Bảng 3.7. Thành phần hóa chất cho phản ứng RAPD của các nghiệm thức 7 – 10 của thí nghiệm 3

Nghiệm thức	Hóa chất	Dung dịch gốc	Thể tích sử dụng	Nồng độ cuối
	MgCl ₂	10 mM	2,5 µl	2,5 mM
	dNTP	10 mM	0,3 µl	0,3 mM
	primer	0.5 pmol/µl	0,5 µl	0,5 nM
7	DNA	10ng	0,5	10 ng
	<i>Taq</i>	5U/1 ul	0,1	0,5U
8	DNA	10 ng	1,5	15
	<i>Taq</i>	5U/ 1ul	0,1	0,5
9	DNA	10 ng	1 µl	10 ng
	<i>Taq</i>	5U/1 µl	0,08 µl	0,4 U
10	DNA	10 ng	1	10 ng
	<i>Taq</i>	5U/1 µl	0,06 µl	0,3U
	H ₂ O		Thêm vào cho đủ 10 µl	

b> Chương trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 3.

Chương trình nhiệt thu được ở thí nghiệm 2.

- Sau khi tìm được qui trình tối ưu cho phản ứng RAPD ta tiến hành thực hiện phản ứng RAPD với số lượng mẫu đã thu.
- Mẫu sau khi chạy PCR sẽ được bảo quản ở 4⁰ C và tiến hành điện di.

3.3.5.4. Điện di và đọc kết quả PCR trên gel agarose.

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

1. Agarose.
2. TAE 0,5X.
3. Loading dye 6X.
4. Ethidium bromide.

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

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 1. Cân kỹ thuật 4 số. | 4. Giấy parafin. |
| 2. Lò viba. | 5. Máy chụp hình gel (Biorad). |
| 3. Khay đổ gel. | 6. Ống đong. |
| 4. Bồn và máy điện di (Bio-rad). | |

c) Quy trình thực hiện.

1. Cho 0,25 g agarose vào 12,5 ml dung dịch TAE 0,5X (nồng độ 2%).
2. Đun sôi hỗn hợp trên khoảng hai phút trong lò viba.
3. Để nguội ở nhiệt độ phòng còn khoảng 50°C.
4. Đổ gel vào khay (đặt lược tạo giếng trước khi đổ gel), chú ý tránh bọt khí khi đổ gel.
5. Để gel đông đặc lại ở nhiệt độ phòng, khoảng 30 phút, rút lược ra khỏi gel, cho gel vào bồn điện di sao cho gel ngập trong dung dịch TAE 0,5X khoảng 1 đến 1,5 cm.
6. Trộn 2,5 µl sản phẩm PCR với 1,5 µl loading dye 6X trên mặt giấy parafin. Cho hỗn hợp vào giếng của gel, bao gồm giếng thang chuẩn, giếng đối chứng và giếng chứa mẫu.
7. Vận hành máy điện di ở hiệu điện thế 50V, thời gian 70 phút.
8. Sau khi hoàn tất quá trình điện di, băng gel được lấy ra khỏi bồn điện di và nhuộm trong dung dịch ethidium bromide trong khoảng 15 – 20 phút và chụp ảnh gel bằng máy chụp Geldoc.

d) Đọc kết quả điện di.

- Sau khi điện di, gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide từ 5 - 15 phút. Vớt ra, rửa lại nhiều lần với nước và đọc kết quả dưới tia UV. DNA liên kết với ethidium bromide sẽ phát sáng dưới tia UV. Chụp ảnh kết quả điện di bằng máy Gel BioRad.

3.3.5.5. Phân tích kết quả bằng phần mềm NTSYSpc2.1

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

PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả lấy mẫu, phân lập và nhân sinh khối

4.1.1. Kết quả lấy mẫu, phân lập

Mẫu bệnh rụng lá *Corynespora* với vết bệnh đặc trưng (mục 2.3.1.2) được thu thập từ nhiều dvt cao su khác nhau từ vườn tuyển non Lai Khê thuộc Bộ Môn Giống – tại trại thực nghiệm cao su Lai Khê, VNCCSVN (Bình Dương).

Trong quá trình lấy mẫu trên đồng ruộng chúng tôi nhận thấy ở Việt Nam chuyên canh cây cao su trên diện rộng, trải dài từ Bắc đến Nam trong vùng khí hậu nóng ẩm, mưa nhiều là điều kiện rất thuận lợi cho nấm *C. cassiicola* lây lan, phát triển. Hiện nay bệnh này chưa bùng phát mạnh nhờ hiệu quả của công tác quản lý dịch bệnh. Những dvt mắc với bệnh này đều bị loại bỏ và được khuyến cáo không trồng. Khi phát hiện vườn cây có bệnh, tiến hành cưa bỏ toàn bộ, đốt cháy để hạn chế sự phát tán mầm bệnh.

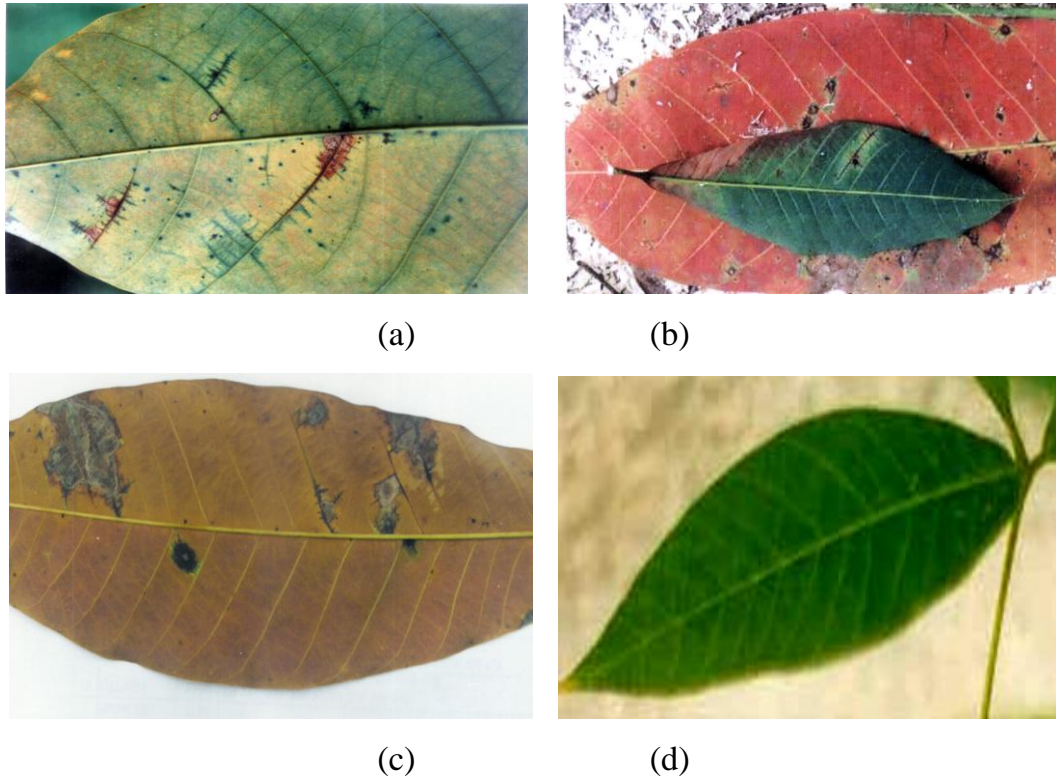
– Những khu vực phát hiện bệnh này là Miền Đông Nam Bộ (Bình Dương, Đồng Nai), miền Bắc (Hà Tây, Nghệ An). Những đợt điều tra bệnh lá trên cây cao su gần đây ở tỉnh Tây Ninh và khu vực Tây Nguyên chưa phát hiện thấy có bệnh này

– Xét về mức độ ảnh hưởng không giống với các nấm khác trên cây cao su thường chỉ gây bệnh tại một vị trí, hay một giai đoạn nhất định (bệnh Nấm Hồng, bệnh Phấn Trắng.v.v.). Nấm *C. cassiicola* gây bệnh tại nhiều vị trí trên cây cao su từ lá non, lá già, cuống lá, chồi. Bệnh gây hại quanh năm trong suốt các giai đoạn phát triển của cây cao su từ vườn ươm, vườn kiến thiết cơ bản đến vườn cây khai thác.

– Bệnh *Corynespora* có biểu hiện triệu chứng rất khác nhau, thay đổi tùy theo tính miễn cảm của dvt đối với nấm bệnh. Ngoài triệu chứng điển hình trên lá già vết bệnh đặc trưng hình xương cá dọc theo gân, lá chuyển dần sang màu đỏ cam (Hình 4.1). Trên lá non còn có triệu chứng vết bệnh tròn, tâm đen có quầng màu vàng bao quanh. Tại trung tâm vết bệnh đôi khi hình thành lỗ thủng, lá quan biến dạng sau đó hình thành lỗ thủng. Triệu chứng đôi khi có thay đổi tùy mức độ miễn cảm của dvt (Hình 4.2). Triệu chứng này có thể gây nhầm lẫn giữa bệnh rụng lá *Corynespora* với bệnh héo đen đầu lá do nấm

Colletotrichum gloeosporioides gây ra trên lá trưởng thành nhưng không u lồi mà trơn láng khi dùng tay vuốt nhẹ (Hình 4.3).

– Do cây cao su là cây cao to, tán lá lớn, rậm nên việc dùng biện pháp hóa học chỉ áp dụng cho vườn ươm, vườn nhân. Đối với cây cao su là một cây công nghiệp dài ngày, việc nhổ bỏ trồng lại sẽ gây thiệt hại rất lớn.



Hình 4.1 Triệu chứng đặc trưng của bệnh rụng lá Corynespora – vết bệnh hình xương cá ở mặt trên của lá (a và b), ở mặt dưới của lá(c), lá bình thường (d)
(Nguồn: Bộ môn BVTV/VNCCSVN (a),(b). Chụp tại vườn tuyển non Lai Khê: (c),(d))



Hình 4.2 Triệu chứng không đặc trưng của bệnh rụng lá Corynespora
Dấu mũi tên chỉ vị trí vết bệnh. Vết bệnh phóng lớn (góc trái)



Hình 4.3 Triệu chứng của bệnh héo đen đầu lá do *Colletotrichum gloeosporioides* gây ra trên cây cao su

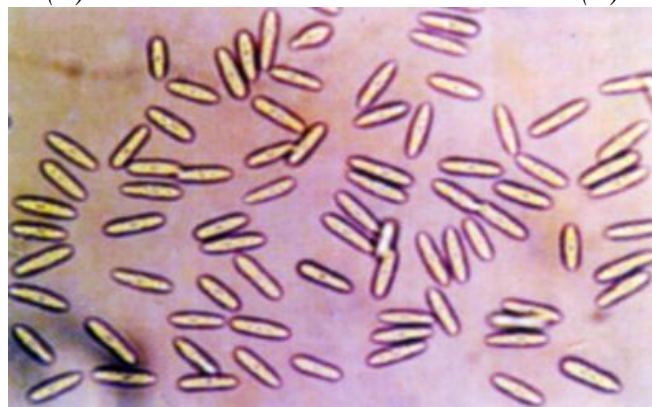
(Nguồn: Bộ môn BVTV/VNCCSVN)



(a)



(b)



(c)

Hình 4.4 Bào tử của nấm *C. cassicola* trên môi trường PDA (a), từ vết bệnh (b) và bào tử nấm *Colletotrichum gloeosporioides* (c) dưới kính hiển vi quang học.

(Nguồn: Bộ môn BVTV/VNCCSVN)

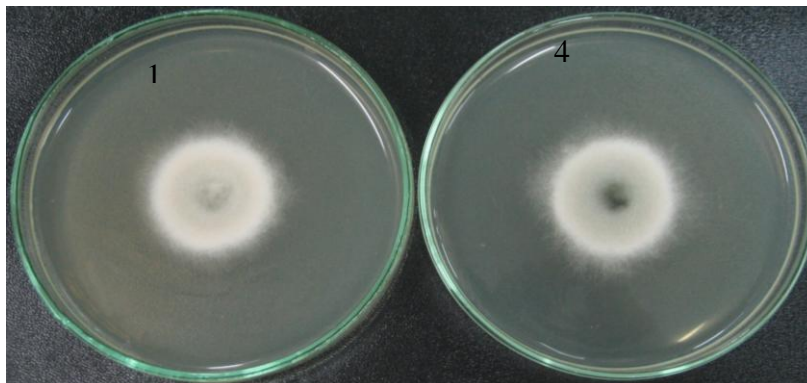
Sau khi phân lập, các mẫu nấm được kiểm tra lại bằng cách làm tiêu bản và quan sát bào tử dưới kính hiển vi. Kết quả đã có 63 mẫu bệnh (Phụ lục 3) phân lập được nấm *C. cassicola*, phần lớn các mẫu nấm là nấm *Colletotrichum*

gloeosporioides, phân biệt rất dễ dàng bằng bào tử (Hình 4.4). Các mẫu nấm sau khi phân lập được tiến hành tách đơn bào tử trên lame trang agar. Do nấm *C. cassiicola* rất khó tạo bào tử trên môi trường nhân tạo. Nên chỉ tách đơn bào tử được 11 nguồn nấm *C. cassiicola*. Để dễ dàng trong việc phân tích, nguồn nấm được phân lập từ dvt cao su nào sẽ được gọi tên theo dvt cao su đó. Để dễ dàng cho việc chú thích chúng tôi kí hiệu tên 11 nguồn nấm theo số thứ tự từ 1- 11 (Bảng 4.1).

Bảng 4.1 Danh sách các nguồn nấm *C. cassiicola* phân lập được.

Số thứ tự	Tên nguồn nấm	Số thứ tự	Tên nguồn nấm
1	LH99/0019	7	LH99/0679
2	LH99/0019	8	LH99/0053
3	LH99/0131	9	LH99/0216
4	LH99/0131	10	LH99/067
5	LH99/0431	11	RRIV4
6	LH99/0617		

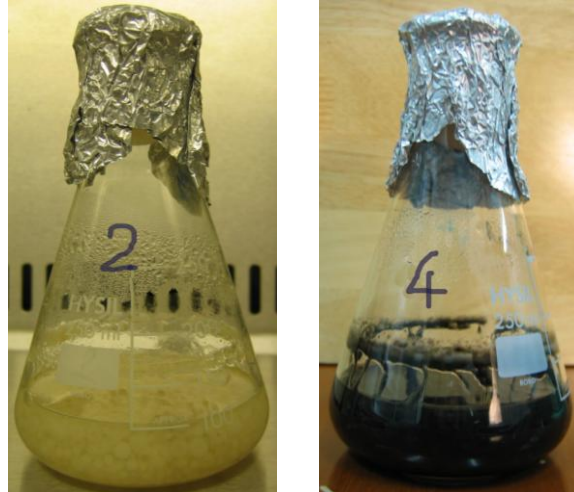
Các nguồn nấm có sự khác biệt về hình thái khuẩn lạc. Tuy nhiên đặc điểm chung của các nguồn nấm phân lập từ các dvt cao su khác nhau là khuẩn lạc có màu xám, sợi nấm mọc thành những đường tròn đồng tâm. Khuẩn lạc mọc dày và tụ lại. Khi quan sát bằng cách lật ngược đĩa petri có thể nhận thấy những đường tròn đồng tâm, nấm nuôi cấy lâu ngày sẽ tạo sắc tố màu đen. Ở điều kiện nuôi cấy bình thường, nấm *C. cassiicola* rất khó hình thành bào tử.



Hình 4.5 Khuẩn lạc nấm *C. cassiicola* trên môi trường thạch đĩa PDA sau 4 ngày nuôi cấy

Các dòng nấm đã tách đơn bào tử được chuyển sang môi trường potato dextrose broth (môi trường PDA không có agar) lỏng để nhân sinh khối để tiếp tục nghiên cứu.

4.1.2. Kết quả nhân sinh khối



Hình 4.6 Màu sắc sợi nấm trên môi trường PDA lỏng.

Bảng 4.2 Kết quả sau khi nhân sinh khối nấm *C.cassicola* trong môi trường lỏng.

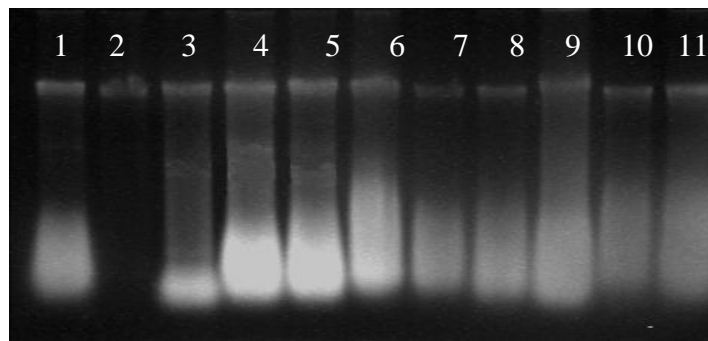
STT	Nguồn nấm	Khối lượng (g)	Màu sắc môi trường (sau 4 ngày nuôi cấy)
1	LH99/0019	1,05	Đen
2	LH99/0081	1,34	Trắng
3	LH99/0098	1,32	Đen
4	LH99/0131	0,89	Đen
5	LH99/0431	0,95	Đen
6	LH99/0617	1,1	Đen
7	LH99/0679	1,47	Đen
8	LH99/0053	0,96	Đen
9	LH99/0216	1,24	Đen
10	LH99/0672	1,15	Đen
11	RRIV4	0,98	Đen

- Bảng 4.2 cho thấy tất cả các nguồn nấm thí nghiệm đều có khả năng tạo sợi nấm trong môi trường lỏng PDA.
- Nguồn nấm 7: LH99/0679 cho khối lượng cao nhất với khối lượng là 1,47g.
- Nguồn nấm 4: LH99/0431 cho khối lượng thấp nhất với khối lượng là 0,89g.

- Qua quá trình nuôi cấy cho thấy các nguồn nấm có màu sắc đa dạng, thay đổi theo tuổi trên môi trường PDA lỏng. Darussamin A. và Pawirosoemardjo S., 1996, khi nuôi nấm trên môi trường môi trường PDA lỏng cũng đã thấy hiện tượng tương tự. Điều này cho thấy có thể ở các giai đoạn phát triển khác nhau tính trạng màu sắc của nguồn nấm được qui bởi các gen khác nhau. Cũng có thể trong quá trình phát triển các hoạt động trao đổi chất của các nguồn nấm này tạo ra các chất làm đổi màu sắc của các nguồn nấm trên. Tuy nhiên sau 4 ngày nuôi cấy nguồn nấm 2: LH99/0081 có màu trắng còn các nguồn nấm còn lại có màu đen, các nguồn nấm đều cho thấy độ nhớt cao.
- Lưu ý nấm *C. cassiicola* rất dễ bị nhiễm trong quá trình nuôi cấy. Thường nấm *C. cassiicola* bị nhiễm sau 1 – 2 ngày nuôi cấy. Triệu chứng của các nguồn nấm bị nhiễm là môi trường nuôi cấy bị đục, tăng sinh khối chậm. Để xác định các nguồn nấm không bị nhiễm, trước khi thu sinh khối, dịch nuôi cấy của các nguồn nấm này đều được làm tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

4.2. Kết quả ly trích

Chúng tôi tiến hành ly trích DNA của 11 nguồn nấm theo quy trình ly trích của Lee và Taylor (1990) có cải tiến (mục 3.3.4.2). Sau khi điện di, kết quả thu được thể thể hiện trong hình 4.7:



Hình 4.4 Kết quả ly trích DNA tổng số theo quy trình của Lee và Taylor (1990) có cải tiến

Hình 4.7 cho thấy DNA tổng số ly trích theo quy trình ở mục 3.3.4.2 không sạch hoàn toàn. Ngoài DNA tổng số còn có các đoạn DNA bị gãy do quá trình

nghiền chưa tốt hoặc thao tác chưa tốt, các đoạn DNA bị gãy thể hiện thành các vệt mờ chạy dọc theo giếng, xuất hiện cả bên trên và bên dưới băng DNA tổng số. Các vệt sáng ở cuối giếng là phần tạp nhiễm do quá trình tinh sạch DNA ly trích chưa tốt. Hơn nữa lượng DNA tổng số ly trích được không nhiều (30 ng).

Với mục tiêu cố gắng tối ưu hóa từng giai đoạn để đảm bảo cho phản ứng PCR xảy ra tốt. Nhận thấy sản phẩm ly trích còn nhiều tạp nhiễm, lượng DNA tổng số ly trích được không nhiều. Trên cơ sở tham khảo, phân tích và thử nghiệm các qui trình ly trích của: Lee và Taylor, 1990; David và cộng sự 1980; Vũ Thị Quỳnh Chi, 2005. Chúng tôi có một số thay đổi, cải tiến qui trình ly trích như sau.

Nghiền 0,1 – 0,3 g sợi nấm đã được làm khô kiệt trong nitor lỏng.

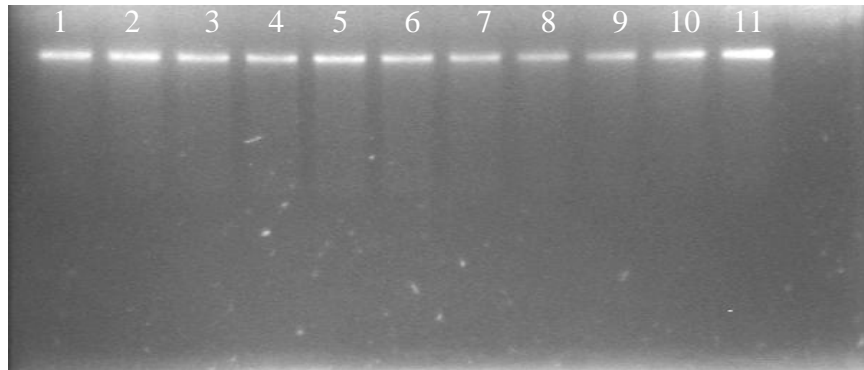
Thêm 400 μ l lysis buffer (phụ lục 2) và vortex cho tới khi hỗn hợp đồng nhất. Nếu hỗn hợp quá đặc thì cho thêm lysis buffer (cho tới 700 μ l). Ủ 1h ở 65°C.

Thêm một thể tích tương ứng (400 μ l) hỗn hợp phenol, chloroform và isoamyl alcohol (tỉ lệ 25:24:1), và lắc nhẹ.

1. Ly tâm 1 phút với tốc độ 14000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.
2. Chuyển dịch nổi (khoảng 300 μ l) vào một ống eppendorf mới.
3. Kết tủa DNA bằng cách thêm 0,03 thể tích natri acetate 3M (6 μ l) và 1/2 thể tích isopropanol. Trộn nhẹ nhàng.
4. Ly tâm 1 phút (10000 vòng/phút ở 4°C).
5. Loại bỏ dịch nổi, rửa phần kết tủa 3 lần với ethanol 70%.
6. Làm khô DNA kết tủa, hòa tan DNA với một thể tích TE 1X hoặc nước (khoảng 200 μ l).
7. Thêm vào 2 μ l RNase vào hỗn hợp trên, trộn đều.
8. Ủ ở 37°C khoảng 1 giờ.
9. Thêm vào 2 μ l Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1), lắc nhẹ trong 2 phút.
10. Ly tâm 1 phút với tốc độ 14000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.
11. Chuyển phần trên sang một ống eppendorf mới.

12. Kết tủa DNA bằng cách thêm 0,03 thể tích natri acetate 3M (6 μ l) và 0,5 thể tích isopropanol(100 μ l). Trộn nhẹ nhàng.
13. Ly tâm 1 phút (10000 vòng/phút ở 4°C).
14. Loại bỏ dịch nổi, rửa phần kết tủa 3 lần với ethanol 70%
15. Làm khô DNA kết tủa, hòa tan DNA với một thể tích TE 1X hoặc nước (khoảng 50 μ l).
16. Kiểm tra sự có mặt và độ tinh sạch của DNA bằng cách điện di trên gel agarose và đo OD.

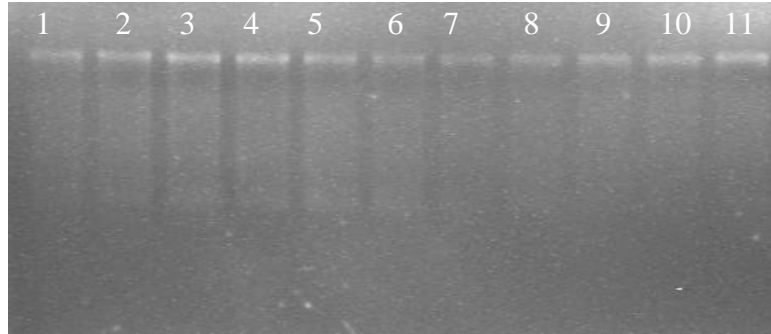
Kết quả ly trích thể hiện qua Hình 4.8



Hình 4.8. DNA tổng số của 11 nguồn nấm *C. cassicola* (Bảng 4.1), ly trích theo qui trình mới cải tiến

Hình 4.8 cho thấy các mẫu DNA ly trích đã sạch hơn so với kết quả ở Hình 4.4. Các phần tạp bị loại bỏ. Qui trình ly trích sử dụng RNase giúp loại bỏ RNA. Natri acetate kết hợp với isopropanol kết tủa và rửa sạch DNA, bảo vệ DNA, thao tác cũng đã tốt hơn, nhờ đó các mẫu DNA gãy đã ít hơn.

Các mẫu DNA đều có nồng độ cao (100 ng) và đồng đều cần pha loãng (10 lần) trước khi tiến hành phản ứng PCR.



Hình 4.9 Các mẫu DNA của 11 nguồn nấm (Bảng 4.1), sau khi tiến hành pha loãng

- Một số lưu ý trong quá trình li trích :

Quá trình li trích DNA phụ thuộc rất nhiều vào thao tác và kinh nghiệm của người li trích. Trong quá trình li trích thao tác nhẹ nhàng tránh làm đứt gãy DNA, cần chú ý một số vấn đề sau:

Lysis buffer bảo quản ở 4°C khi đem ra sử dụng có hiện tượng kết tủa ảnh hưởng đến hiệu quả li trích DNA do đó cần mang ủ ở 37°C trước khi sử dụng

Quá trình nghiền nấm trong Nitơ lỏng cần thao tác đều tay, không quá mạnh gây ảnh hưởng đến sự đứt gãy DNA.

Ở lần ly tâm thứ nhất sau khi ly tâm nếu phần dịch nổi phía trên chưa trong thì có thể ly tâm lại.

Khi chuyển dịch trong sang eppendorf mới (sau khi ly tâm lần thứ nhất) cần cẩn thận tránh lấy phải phần tạp phía dưới. Thường bước này chỉnh pipet ở 400ul hút khoảng 300 μ l là vừa.

Tóm lại qui trình li trích DNA trên ổn định và hiệu quả, phù hợp để li trích DNA nấm *C. cassicola*.

4.3. Thiết lập qui trình RAPD và đánh giá độ đa dạng di truyền của các chủng nấm *C. cassicola* phân lập được từ vườn tuyển non Lai Khê thuộc Bộ Môn Giống –trại thực nghiệm Lai Khê– VNCCSVN (Bình Dương).

4.3.1. Thí nghiệm 1: khảo sát qui trình RAPD của Silva và cộng sự, 2003.

Thực hiện theo qui trình này sản phẩm PCR không có băng sau khi điện di trên gel dù Silva và ctc, 2003 đã thu được kết quả tốt khi phân tích đa dạng di

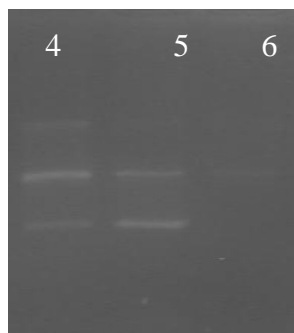
truyền của 42 chủng nấm *C. cassiicola* với các primer OPL-08, OPM-O5, OPD - 18, các băng DNA được tạo ra có kích từ 300bp đến 2600bp. Điều này có thể do hóa chất có nguồn gốc khác nhau hoặc thiết bị PCR khác nhau (máy thermo cycler khác nhau).

Chúng tôi cũng đã thử nghiệm một vài qui trình khác tuy nhiên kết quả cũng không tốt lên. Trên cơ sở lý thuyết (mục 2.6.2), tham khảo một số qui trình nhiệt của các tác giả khác (P. romruensukharom và cộng sự, 2005; Silva và cộng sự, 1998, 2002, 2003) và trải qua quá trình phân tích, thử nghiệm, cuối cùng chúng tôi đề ra được qui trình nhiệt như sau.

Bảng 4.3 Chương trình nhiệt được xây dựng ở thí nghiệm 1

Số lần lặp lại	Các bước	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Thời gian
1	1	94	1 phút
	2	94	45 giây.
39	3	35	1 phút
	4	74	3 phút
1	5	72	10 phút
	6	giữ 4°C	

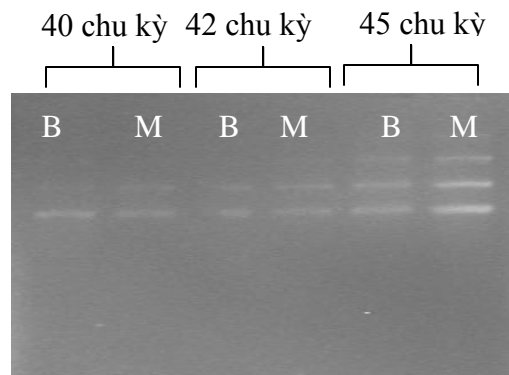
Với qui trình nhiệt ở Bảng 4.3 sản phẩm PCR đã xuất hiện băng điện di trên gel. Tuy nhiên các băng còn mờ. Do đó chúng tôi nghĩ có thể do số chu kỳ ít hoặc thành phần hóa chất chưa tối ưu.



Hình 4.10 Kết quả điện di sản phẩm PCR ở thí nghiệm 1, primer OPM-O5, nguồn nấm 4, 5, 6, (Bảng 4.1)

4.3.2. Thí nghiệm 2: khảo sát ảnh hưởng của yếu tố chu kỳ đến phản ứng RAPD.

Hình 4.10 cho thấy phẩm PCR có xuất hiện băng trên gel điện di nhưng kết quả các băng còn mờ. Mặt khác kỹ thuật RAPD thường tiến hành với 45 chu kỳ, ở 45 chu kỳ sẽ cho số lượng sản phẩm nhiều hơn so với 40 chu kỳ (Kurt Weising, Hide Nybom, Kirten Wolff, Wieland Meyer, 1995). Do đó chúng tôi lần lượt tăng số chu kỳ lên 42 và 45 chu kỳ. Kết quả thể hiện qua hình 4.11. Chúng tôi cũng đã tiến hành thí nghiệm ở cả 3 máy PCR: Master gradient PCR, Bio rad, PTC100 Thermal cycler. Do các loại máy PCR khác nhau có thời gian chuyển giữa các bước 2, 3, 4 (Bảng 4.3) trong một chu kỳ nhiệt là khác nhau. Nên cùng một chương trình nhiệt nhưng chỉ có hai loại máy PCR có xuất hiện băng điện di trên gel: Master gradient PCR và Bio rad là sản phẩm PCR có băng điện di trên gel.

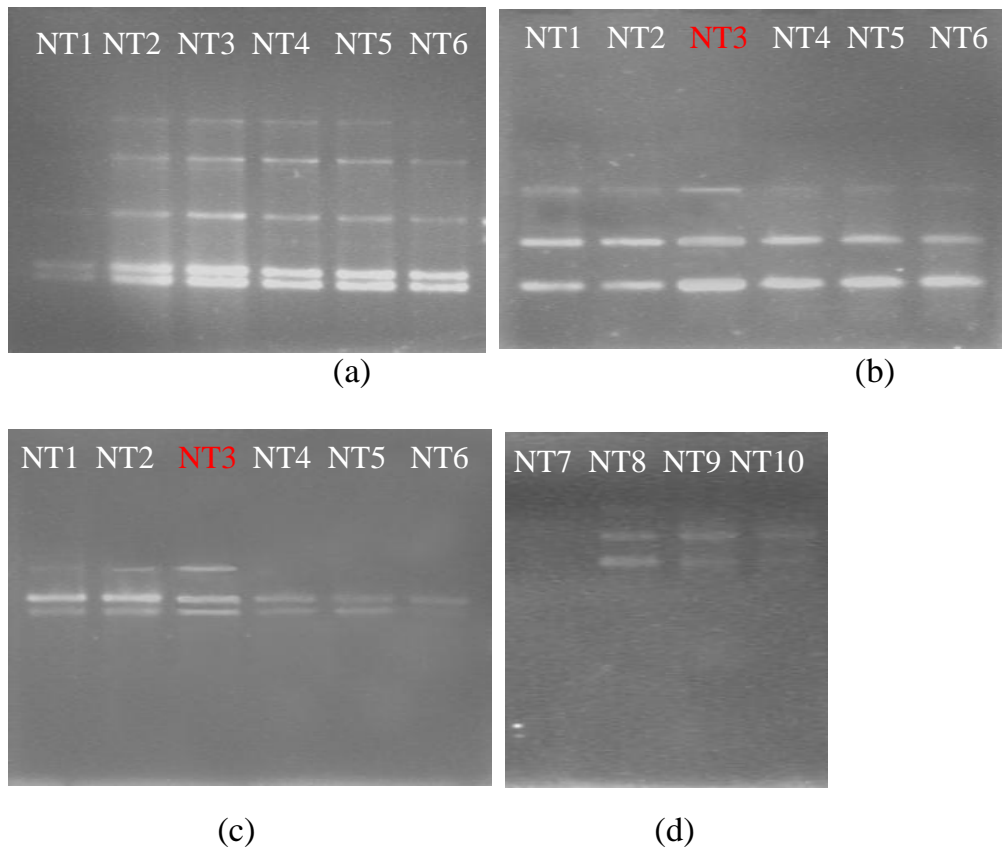


Hình 4.11 Kết quả điện di sản phẩm PCR của thí nghiệm khi thực hiện với primer OPM - O5, nguồn nấm 4 (Bảng 4.1), trên máy PCR Master gradient PCR (M), Bio rad (B).

Qua Hình 4.11 cho thấy ở 45 chu kỳ các băng DNA rõ hơn, sản phẩm PCR nhiều hơn. Cả hai máy PCR Master gradient PCR và Bio rad đều cho sản phẩm PCR có băng khi điện di, tuy nhiên máy PCR Master gradient PCR với chất lượng băng tốt hơn. Do đó để đảm bảo tính chính xác cho nghiên cứu chúng tôi quyết định chọn máy PCR: Master gradient PCR để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

4.3.3. Thí nghiệm 3 Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố $MgCl_2$, dNTP, primer, DNA, Taq - polymerase (Promega) lên phản ứng RAPD.

Phản ứng PCR là một hệ tương thích các thành phần hóa chất được xác định cụ thể trong thực nghiệm. Với mục tiêu tối ưu hóa cho phản ứng RAPD chúng tôi tiến hành thí nghiệm 3: lần lượt thay đổi các thành phần hóa chất trong phản ứng RAPD. Kết quả thể hiện trong Hình 4.12.



Hình 4.12 Kết quả điện di sản phẩm RAPD các nghiệm thức từ 1 – 6 với primer OPL-08 (Hình 4.12.a), primer OPM-O5 (Hình 4.12.b), primer OPD - 18 (Hình 4.12.c), nghiệm thức 7-10 ở nguồn nấm 4 (Bảng 4.1) với primer OPM-O5 (Hình 4.12.d), nguồn nấm 4 (Bảng 4.1), NT:(nghiệm thức)

Qua Hình 4.12. cho thấy ở cả 3 primer nghiệm thức 3 là tối ưu nhất. Do đó chúng tôi chọn nghiệm thức này để tiến hành nghiên cứu tiếp theo.

❖ Sau hai lần lặp lại các thí nghiệm 1, 2, 3 chúng tôi đã chọn quy trình RAPD cho kết tốt nhất. Quy trình này được thể hiện qua Bảng 4.4 và Bảng 4.5.

Bảng 4.4 Thành phần hóa chất phản ứng RAPD thu được sau thí nghiệm 1, 2, 3

Hóa chất	Dung dịch gốc	Nồng độ cuối	Thể tích sử dụng
PCR buffer	10X	1X	1. μ l
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1 μ l
dNTP	10 mM	0,3 mM	0,3 μ l
primer	10 pmol/ μ l	0,5 mM	1 μ l
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U	0,5 U	0,1 μ l
DNA mẫu	10 ng/ μ l	10 ng	1 μ l
H ₂ O			5,6 μ l

Bảng 4.5 Chương trình nhiệt được xây dựng sau thí nghiệm 1, 2, 3

Số lần lặp lại	Các bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian
1	1	94	1 phút
	2	94	45 giây.
45	3	35	1 phút
	4	74	3 phút
1	5	72	10 phút
	6	giữ 4 ⁰ C	

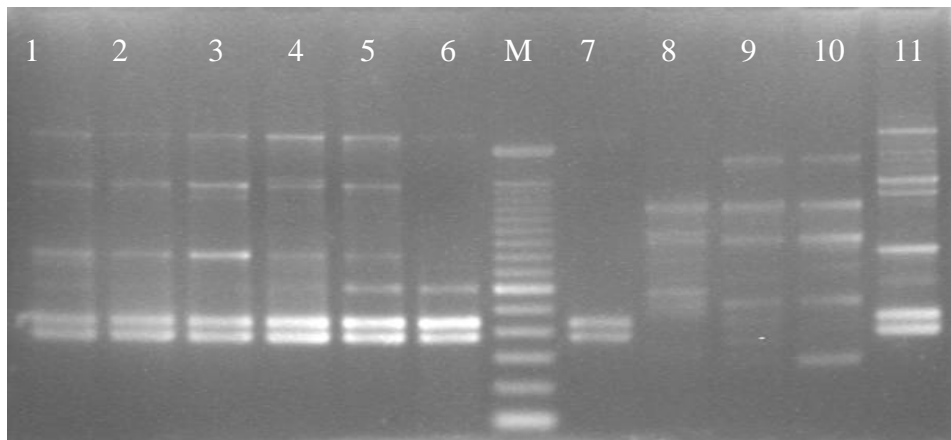
4.3.4. Đánh giá độ đa dạng di truyền của các chủng nấm *C. cassicola* phân lập được từ vườn tuyến non Lai Khê thuộc Bộ Môn Giống tại trại thực nghiệm Lai Khê – VNCCSVN (Bình Dương).

Để phát hiện sự đa hình của các nguồn nấm trên, 3 primer (OPL-08, OPM-05, OPD - 18) được sử dụng trong phản ứng PCR trên DNA thu được từ các chủng *Corynespora cassicola* (Burt & Curt) Wei, theo qui trình đã tối ưu sau các nghiệm thức trên. Sản phẩm RAPD của những primer này được quan sát theo kết quả điện di trên gel (Hình 4.13). Mỗi giếng đại diện cho một dòng, mỗi băng hiện diện với một kích thước phân tử xác định bởi vì nó là kết quả của sự tăng bội của một sợi đơn DNA gốc. Các đoạn DNA có cùng trọng lượng phân tử sẽ di chuyển với cùng khoảng cách trên gel. Sự đa dạng di truyền phân tử được chỉ ra bởi sự khác biệt của các băng DNA hình thành.

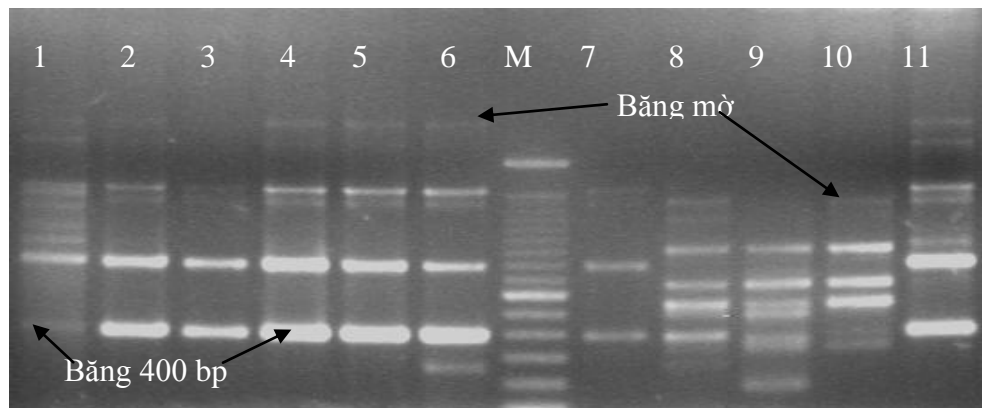
Quan sát Hình 4.13 cho thấy cả ba primer được sử dụng đều cho sản phẩm khuếch đại tốt, các băng rõ, các băng đa hình nhiều. Tổng cộng có 35 băng, kích thước từ 100 bp – 2600 bp. Trong đó có 34 băng đa hình (băng đa hình có ở mẫu này nhưng không có ở mẫu kia. băng đồng hình có mặt trong tất cả các mẫu). chiếm tỉ lệ 97,1%, 1 băng đồng hình duy nhất (với primer OPM-O5, kích thước 400kb) chiếm tỉ lệ 2,9%.

Qua Hình 4.13 còn cho thấy ngoài những băng rõ (Hình 4.13.a là các băng 350bp, 450bp; Hình 4.13.a là các băng 400bp, 800bp .v.v.; Hình 4.13.a là các băng 650bp, 800bp.v.v.). Còn có những băng mờ hoặc khó nhận diện. Điều này có thể do đặc điểm di truyền làm hạn chế khả năng bắt cặp của primer, làm giảm số lượng sản phẩm PCR. Nguyên nhân khác có thể do thao tác PCR chưa tốt, điều kiện PCR chưa thật phù hợp. Trong trường hợp này để các băng rõ hơn có thể phải thay đổi nhiều yếu tố trong phản ứng PCR và có thể kết quả cũng sẽ mất đi một vài băng đã có. Trong điều kiện khóa luận chúng tôi chưa khảo sát sâu vấn đề này nên kết quả thu được còn vài băng chưa rõ nếu nhìn bằng mắt. Tuy nhiên nếu sử dụng chức năng detected band trong máy Geldoc thì các băng này vẫn được nhận diện rõ ràng (Hình 4.14). Một nguyên nhân khác nữa có thể do thời gian nhuộm ethium bromide ít, chất lượng ethiumbromide kém (lâu ngày không thay mới).

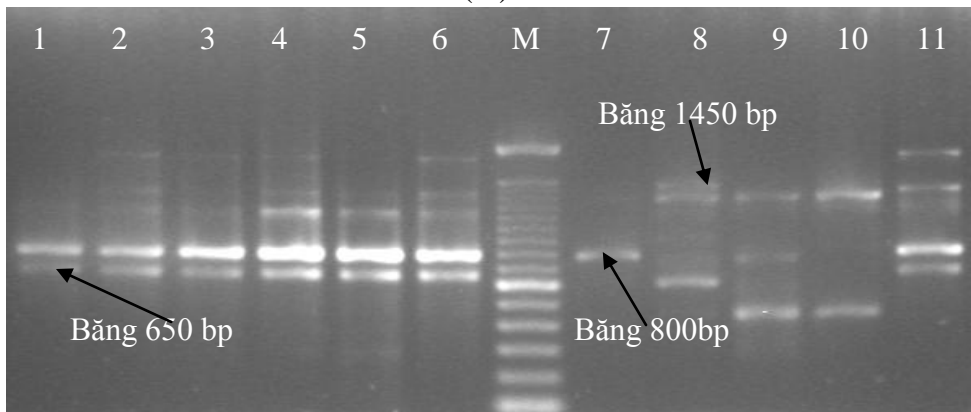
Ngoài ra còn có một số băng tách không rõ có thể do quá trình điện di các băng có kích thước gần bằng nhau nên các băng tách không rõ, bên cạnh đó còn có hiện tượng các băng di chuyển không đều, có thể do điện cực bị cong hay do hiệu ứng thành máy điện di ảnh hưởng đến sự di chuyển của các DNA. Những trường hợp này nên thực hiện lại phản ứng PCR hay chạy điện di lại, cho lượng mẫu nhiều hơn và chỉnh sửa máy điện di có thể cho kết quả tốt hơn.



(a)



(b)



(c)

Hình 4.13 Kết quả điện di sản phẩm RAPD của 11 nguồn nấm *C. cassicola* (Bảng 4.1) với primer OPL-08 (Hình 4.13.a), primer OPM-O5 (Hình 4.13.b), primer OPD - 18 (Hình 4.13.c). Nồng độ gel 2%, hiệu điện thế 40V, thời gian 70 phút, M: DNA ladder (1.5 Kb).



Hình 4.14 Phát hiện băng bằng chức năng detected band

Ngoài ra còn có một số băng tách không rõ có thể do quá trình điện di các băng có kích thước gần bằng nhau nên các băng tách không rõ, bên cạnh đó còn có hiện tượng các băng di chuyển không đều, có thể do điện cực bị cong hay do hiệu ứng thành máy điện di ảnh hưởng đến sự di chuyển của các DNA. Những trường hợp này nên thực hiện lại phản ứng PCR hay chạy điện di lại, cho lượng mẫu nhiều hơn và chỉnh sửa máy điện di có thể cho kết quả tốt hơn.

Những nguyên nhân trên khiến cho việc thu thập dữ liệu để phân nhóm cần tiến hành cẩn thận.

Ở cả 3 primer thì nguồn nấm số 7 cho số lượng băng rất ít. Điều này có thể do đặc điểm di truyền của các dòng nấm này đã làm giảm vị trí bắt cặp của các primer này, do đó làm giảm số lượng băng. Ba nguồn nấm 8, 9, 10 cho kiểu băng rất khác biệt, nên có thể phân biệt các nguồn nấm 7, 8, 9, 10 với nguồn nấm khác (trong phạm vi nghiên cứu này).

Qua Hình 4.13.a cho thấy với primer OPL-08 sản phẩm tạo ra có 14 băng, kích thước từ 300 bp – 2 kp, cả 14 băng đều đa hình. Trung bình có 5.5 băng/nguồn nấm. Nguồn nấm số 7 có chỉ có 2 băng (khoảng 380 bp và 450 bp) do đó có thể phân biệt nguồn nấm này với các nguồn nấm còn lại (trong phạm vi nghiên cứu này).

Qua Hình 4.13.b cho thấy với primer OPM-O5 sản phẩm tạo ra có 15 băng, kích thước từ 200 bp – 2600 bp. Trung bình có 5.2 băng/nguồn nấm. Có một băng đồng hình duy nhất 400 bp, 14 băng còn lại đều đa hình. Băng 400 bp xuất hiện ổn định, có thể tiếp tục nghiên cứu để tìm mối quan hệ với tính trạng có liên quan.

Qua Hình 4.13.c cho thấy với primer OPD - 18 sản phẩm khuếch đại tạo ra có 7 băng, kích thước từ 450 bp – 1850 bp. Cả 7 băng đều đa hình, đây là primer cho số lượng băng đa hình thấp nhất. Trung bình có 3 băng/nguồn nấm.

Với Primer OPD - 18 sản phẩm khuếch đại tạo ra ở nguồn nấm số 7 cho một băng duy nhất (800 bp), nguồn nấm số 1 cho 2 băng (800 bp, 650 bp). Nguồn nấm số 8 cho 3 băng, trong đó có băng 1450 bp chỉ có ở nguồn nấm này. Do đó có thể tiếp tục nghiên cứu để dựng primer này như là chỉ thị (marker) phân tử cho các nguồn nấm số 1, 7, 8.

Từ kết quả trên cũng dẫn đến một số nhận xét sau:

- Phản ứng RAPD rất nhạy cảm với các thành phần hóa chất, chỉ cần thay đổi 1 yếu tố thì sản phẩm thu được sẽ khác nhau. Do đó cần kiểm tra lại toàn bộ quy trình khi có sự thay đổi về một yếu tố nào đó.
- Chỉ sử dụng cùng một loại dụng cụ và thiết bị khi thực hiện kỹ thuật RAPD. Đặc biệt nên sử dụng cùng một loại eppendorf thành mỏng sẽ giúp trao đổi nhiệt tốt hơn, không dán nhãn vào thành eppendorf khi chạy PCR.
- Kỹ thuật đổ gel: agarose chưa tan đều hoặc do agarose quá nguội khi đổ.
- Điện trường của máy điện di: do điện thế không ổn định hoặc điện cực bị cong.v.v.
- Dung dịch điện di: cần thay dung dịch điện di khác.

4.3.5. Phân tích kết quả phản ứng RAPD bằng phần mềm NTSYS

Kết quả phát hiện băng được mã hoá dạng nhị phân, theo nguyên tắc có băng thì ghi 1 và không có băng thì ghi 0 (Phụ lục 2). Số liệu thu được đem xử lý

bảng phần mềm NTSYSpc 2.1. Kết quả được hiển thị theo dạng số liệu và dạng cây di truyền.

```

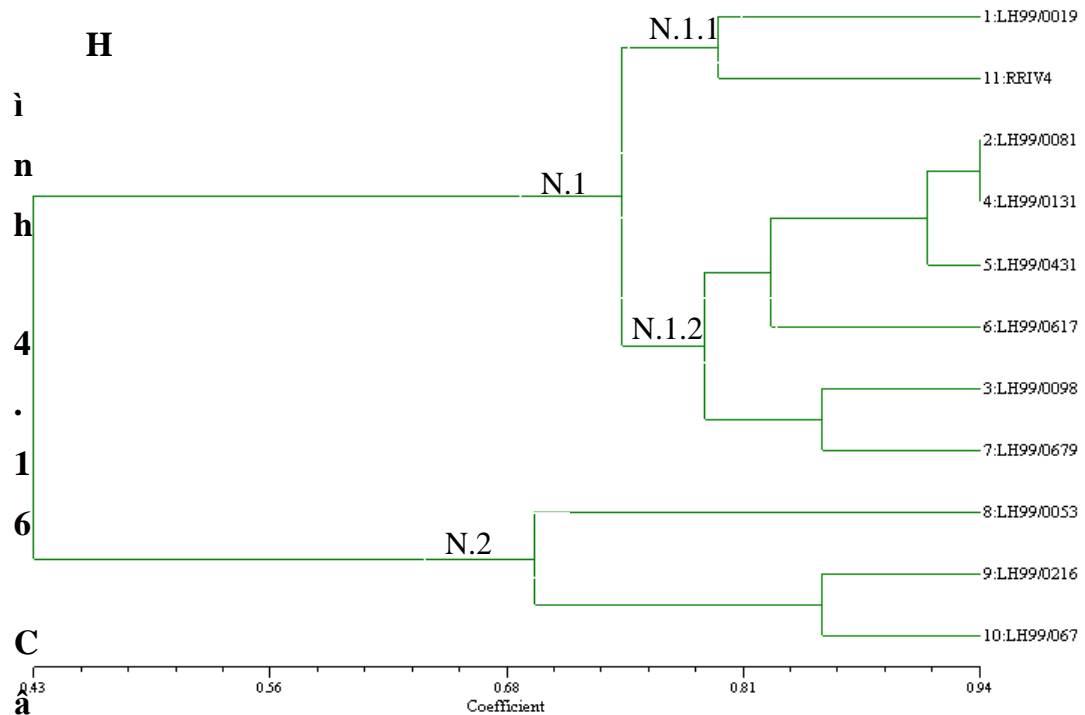
1:LH99/0019 2:LH99/0081 3:LH99/0098 4:LH99/0131 5:LH99/0431 6:LH99/0617
7:LH99/0679
8:LH99/0053 9:LH99/0216 10:LH99/067 11:RRIV4
1.0000000
0.8285714 1.0000000
0.7714286 0.8857143 1.0000000
0.7714286 0.9428571 0.8285714 1.0000000
0.8571429 0.9142857 0.8571429 0.9142857 1.0000000
0.6857143 0.8000000 0.6857143 0.8571429 0.8285714 1.0000000
0.6857143 0.8000000 0.8571429 0.7428571 0.7714286 0.7714286 1.0000000
0.4857143 0.4285714 0.4857143 0.4285714 0.4571429 0.5142857 0.5142857
1.0000000
0.3142857 0.3714286 0.4857143 0.3714286 0.3428571 0.4000000 0.5714286
0.6571429 1.0000000
0.3428571 0.4000000 0.4571429 0.4000000 0.3714286 0.4285714 0.5428571
0.7428571 0.8571429 1.0000000
0.8000000 0.8000000 0.6857143 0.8000000 0.7714286 0.7142857 0.6000000
0.4000000 0.3428571 0.3714286 1.0000000

```

Hình 4.15 Kết quả đánh giá đa dạng di truyền dạng số liệu NTSYS đối với các nguồn nấm *C. cassicola*

Qua Hình 4.15 cho thấy hệ số đồng dạng di truyền của 11 nguồn nấm biến thiên từ 0,3142 – 0,9428. Như vậy các mẫu phân tích có quan hệ di truyền khá xa nhau. Tuy nhiên kết luận này còn phụ thuộc vào tỷ lệ mẫu có hệ số đồng dạng di truyền thấp. Nếu các mẫu có hệ số đồng dạng di truyền thấp chiếm một tỷ lệ lớn thì các mẫu phân tích có quan hệ di truyền xa nhau. Ngược lại nếu chỉ một vài mẫu có hệ số đồng dạng di truyền thấp thì không kết luận được. Tuy nhiên kết quả này rất khó dùng đánh giá đa dạng di truyền.

Trên cơ sở bảng hệ số đồng dạng di truyền, chúng tôi xây dựng cây phả hệ (dendrogram) .



Hình 4.16 Cây phả hệ (dendrogram) của 11 nguồn nấm *C. cassicola*

Qua Hình 4.16 cho thấy hệ số đồng dạng di truyền của các nguồn nấm được sử dụng trong nghiên cứu này biến thiên từ 0,43 – 0,94. Cây phả hệ (dendrogram) có nhiều nhánh. Điều này cho thấy có sự đa dạng di truyền giữa các nguồn nấm được nghiên cứu. Kết quả này cũng phù hợp với đánh giá: hiện nay nấm hình thành nhiều nòi sinh lí mới, tăng nguy cơ gây hại cho các dvt cao su của Phan Thành Dũng, 2006.

Cây phả hệ (dendrogram) chia thành 2 nhóm chính như sau:

Nhóm 1 (N1) gồm có 8 nguồn nấm :1, 2, 4, 5, 6, 3, 11. Có hệ số đồng dạng di truyền nằm trong khảng 0,74 – 0,94. Nhóm này lại được chia thành hai nhóm phụ với hệ số di truyền gần hơn như sau:

Nhóm N1.1 gồm hai nguồn nấm: 1 và 11 có hệ số đồng dạng di truyền từ 0,79 chứng tỏ hai nguồn nấm này có quan hệ di truyền khá gần nhau.

Nhóm N1.2 gồm năm nguồn nấm: 2, 4, 5, 6, 3, 7. Nhóm này có hệ số đồng dạng di truyền từ 0,79 – 0,94 cây phả hệ (dendrogram) có nhiều nhánh. Điều này

cho thấy có thể các nguồn nấm này có cùng nguồn gốc nhưng nấm hình thành nòi mới thích nghi với tính kháng của kí chủ.

Mặt khác các nguồn nấm trong nhóm N1.2 có hệ số đồng dạng di truyền cao nên tính kháng và tính miễn cảm với thuốc bảo vệ thực vật của các nguồn nấm này có thể tương đương nhau. Từ đó ta có thể đề ra hướng diệt nấm giống nhau. Trong nhóm này có hai nguồn nấm: 2 và 4 có hệ số đồng dạng di truyền cao: 0,94 nhưng lại cho màu sắc khác nhau trên môi trường PDA sau 4 ngày nuôi cấy. Nguồn nấm số 4 cho màu đen còn nguồn nấm số 2 cho màu trắng (Hình 4.6). Điều này nói lên rằng có thể tính trạng màu sắc được qui định bởi một gen hay một số ít các gen, mà những gen này không hiện diện trong các băng tạo ra khi kỹ thuật RAPD được tiến hành với 3 primer (OPL-08, OPM-O5, OPD - 18) trong nghiên cứu này.

Nhóm 2 gồm ba nguồn nấm, có hệ số đồng dạng di truyền từ 0,69 – 0,85. Trong đó nguồn nấm số 8 có hệ số đồng dạng di truyền thấp nhất: 0,69 nghĩa là có sự khác biệt di truyền so với hai nguồn nấm còn lại trong nhóm.

Tóm lại, phân tích RAPD giúp xác định được sự tương quan di truyền giữa các nguồn nấm, từ đó góp phần làm cơ sở sẽ sở cho các chiến lược phòng trừ bệnh và các nghiên cứu tiếp theo đạt hiệu quả hơn.

PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

- Đã phân lập được 11 nguồn nấm *C. cassiicola* từ các mẫu bệnh rụng lá *Corynespora* được thu thập từ vườn tuyến non Lai Khê thuộc Bộ Môn Giống tại trại thực nghiệm Lai Khê– VNCCSVN (Bình Dương) (Bảng 4.2).
- Xây dựng qui trình ly trích DNA ổn định và hiệu quả, phù hợp để ly trích DNA nấm *C. cassiicola* (Hình 4.8).
- Quy trình RAPD tốt nhất là quy trình ở Bảng 4.4 và 4.5. Qui trình RAPD này có thể áp dụng để phân tích đa dạng di truyền của quần thể nấm *C. cassiicola*.

Cả 3 primer dùng trong kỹ thuật RAPD ở nghiên cứu này đều cho kết quả khuếch đại tốt. Đã có 35 băng được tạo ra trong đó có 34 băng đa hình và một băng đồng hình. Băng 400bp là băng đặc trưng khi thực hiện kỹ thuật RAPD sử dụng primer OPM-O5 trên 11 nguồn nấm được sử dụng trong nghiên cứu này.

- Sự khác biệt về hình thái thì dường như không liên quan đến các nhóm RAPD trong nghiên cứu này
- Việc phân tích RAPD sử dụng 3 primer (OPL-08, OPM-O5, OPD - 18) trên 11 nguồn nấm sử dụng trong nghiên cứu này đã lập được cây phả hệ (dendrogram) có hệ số đồng dạng di truyền dao động trong khoảng 0,43 – 0,94 (Hình 4.15). Cây phả hệ (dendrogram) có nhiều nhánh cho thấy sự đa dạng của 11 nguồn nấm sử dụng trong nghiên cứu này.
- Primer OPD – 18 có thể nhận biết được các nguồn nấm số 1, 2 và 7 trong các nguồn nấm sử dụng trong phạm vi nghiên cứu này.

5.2. Đề nghị

- Tăng số lượng mẫu và phạm vi lấy mẫu để kết quả nghiên cứu khái quát hơn.

- Nên tiến hành lấy mẫu trên các kí chủ khác ngoài cây cao su để có thể xác định nguồn gốc nấm *C. cassiicola* trên cây cao su và phục vụ cho công tác bảo vệ thực vật.
- Băng 400bp là băng đặc trưng khi thực hiện với primer OPM-O5 có thể tiếp tục nghiên cứu để tìm mối quan hệ với tính trạng có liên quan.
- Có thể áp dụng các kỹ thuật có độ tin cậy cao hơn để nghiên cứu đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola* như: SSR, AFLP.
- Nghiên cứu các nhân tố ảnh hưởng đến sự phát sinh, phát triển của bệnh như: điều kiện khí hậu, môi trường, tính độc của nguồn bệnh, tính nhạy cảm của kí chủ, quần thể nguồn bệnh, tìm mối quan hệ với các nhóm RAPD. Từ đó phục vụ cho các chiến lược quản lý và phòng trừ bệnh, các nghiên cứu tiếp theo.
- Nghiên cứu đặc tính sinh học, đa dạng di truyền và gen kháng của cây cao su.
- Những nghiên cứu này cần có chiến lược và sự hợp tác chặt chẽ giữa các tổ chức, viện, cơ quan.v.v.

5.3. Hạn chế của đề tài

- Phạm vi lấy mẫu hẹp, số lượng mẫu tách đơn bào tử được ít.
- Chưa có thông tin về tính độc của nguồn nấm được phân lập, tính miễn cảm của các dvt đã lấy mẫu bệnh. Do đó chưa tìm mối quan hệ giữa các nhóm RAPD với tính độc của các nguồn nấm, tính miễn cảm của các dvt cao su.

PHẦN 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT.

1. Nguyễn Quỳnh Anh, 2005. *Bước đầu đánh giá mức độ đa dạng di truyền của quần thể điều (Anacardium occidentale L.) tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu bằng kỹ thuật RAPD và AFLP.* Khóa Luận tốt nghiệp kỹ sư công nghệ sinh học, Đại học Nông lâm Tp. HCM
2. Phạm Văn Bình, 2005. *Đánh giá sơ bộ mức độ đa dạng di truyền của quần thể điều (Acanardium occidentale L.) hiện được trồng tại tỉnh Ninh Thuận bằng kỹ thuật RAPD và AFLP.* Khóa Luận tốt nghiệp kỹ sư công nghệ sinh học, Đại học Nông lâm Tp. HCM
3. Bùi Chí Bửu – Nguyễn Thị Lang, 1999. *Di truyền phân tử.* Quyển II, Những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng. NXB Nông nghiệp. 45-60.
4. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 2004. *Di truyền phân tử.* NXB Nông Nghiệp TP Hồ Chí Minh.
5. Trần Văn Cảnh, 2006. *Công tác bảo vệ ngành cao su việt nam*
6. Vũ Thị Quỳnh Chi, 2005. *Phân tích đa dạng di truyền một số mẫu nấm Corynespora cassiicola (Berk. & Curt.) Wei gây bệnh trên cây cao su (Hevea brasiliensis Muell. Arg) bằng phương pháp RFLP – PCR.* Khóa Luận tốt nghiệp kỹ sư công nghệ sinh học, Đại học Nông lâm Tp. HCM.
7. Phan Thành Dũng, 2004. *Kỹ thuật bảo vệ thực vật cây cao su.* Nhà xuất bản Nông Nghiệp. 124 trang.
8. Phan Thành Dũng, 2006. *Công tác bảo vệ ngành cao su việt nam. Hiên trang và thác thức mới (VNCCSVN)*
9. *Diễn đàn khuyến nông và công nghệ. Chuyên đề nâng cao năng lực cao su tiểu điền 2006* (nhiều tác giả). Trang 1 – 21.
10. Hồ Huỳnh Thùy Dương. 2000. *Sinh học phân tử.* Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia
11. Nguyễn Hữu Hồ, 2005. *Chuyên đề chuyển gen.* Tài liệu giảng dạy Đại Học Nông Lâm.
12. Nguyễn Thị Lang, 2002. *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu Công nghệ sinh học.* Nhà xuất bản Nông nghiệp Tp. HCM. 220 trang.
13. Nguyễn Thái Thủy, 2003. *PCR và Real - time PCR.* Công ty Bio – Rad. 101 trang.
14. Nguyễn Hữu Trí, 2004. *Công nghệ cao su thiên nhiên.* trang 17 – 20

15. Bùi Trang Việt, 2001. *Sinh học Phân tử*. Khoa sinh học, ĐH Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh., trường ĐH Khoa học tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh.

TIẾNG ANH

16. Dũng, P.T., 1995. *Studies on C. cassiicola (Berk. & Curt.) Wei on rubber. Masters' thesis. University Pertanian Malaysia.*

17. Dũng, P.T and Hoan, N.T., 2000. *Current status of Corynespora leaf fall in Vietnam.* Presented at workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brassiliensis*, Kuala Lumpur, Malaysia and Medan, Indonesia, 6 – 15, June, 2000.

18. Ellis, M.B and Holiday, 1971. *Corynespora cassiicola. C.M.I Description of Pathogenic Fungi and Bacteria.* No. 303. 1-2.

19. Kuruvilla Jacob C. và cộng sự, 2002. *A laboratory Manual for International Training on strategies for management of Corynespora Leaf Fall Disease of Heveabrasiliensis.*

20. Kurt Weising, Hilde Nybom, Kirsten Wolff, Wieland Meyer, 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi.* CRC Press. 322p.

21. Jayashinge, C.K. and W.P.K, Silva.1996. *Current status of Corynespora leaf fall in Sri Lanka.* Presented at workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brassiliensis*, Medan, Indonesia 16 – 17, Dec, 1996.

22. Ismail, H., N.Z. Radzia and K. Silvadadyan, 1996. *Management strategies of Corynespora leaf fall with fungicides and cultural practices.* Presented at workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brassiliensis*, Medan, Indonesia 16 – 17, Dec, 1996.

23. Liyanage, A.de., Jayasighe, C. *cassiicola* k. and liyanage, N.I.S. (1988). *Biology, epidemiology and pathogenicity of Corynespora cassiicola leaf fall disease workshop held at Bogor Research Institute, Indonesia, 12th to 13th february, 1988*

24. Sabu, P.I., 2000. *Current status of Corynespora leaf fall in India.* Presented at workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brassiliensis*, Kuala Lumpur, Malaysia and Medan, Indonesia, 6 – 15, June, 2000.

25. Safiah A. and Noor H.H., 2003. *Differentiating races of C. cassiicola using RAPD and ITS chi thi (marker)s.* Journal of Rubber Research. 6(1). 59 – 64.

26. Shukhor S.K. and Hidir S.M., 1996. Current status of *Corynespora* leaf fall disease in Malaysia. Presented at workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brassiliensis*, Medan, Indonesia 16 – 17, Dec, 1996
27. Silva, W.P.K, Deverall, B.J & Lyon, B.R., 1995. *RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of nguồn nấm of the leaf spot fungus C. cassiicola*. Aust. J. Bot., 43, 609 – 618.
28. Silva, W.P.K, Deverall, B.J & Lyon, B.R., 1998. *Molecular, physiological and pathological characterization of Corynespora leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka*. Plant pathology, 47 (3), 267-277
29. Silva, W.P.K, Eric H. Karunanayake, Ravi L.C. Wijesundera and Uhanowita M.S. Priyanka., 2003. *Genetic variation in Corynespora cassiicola: a possible relation between host and virulence*. Mycol Res. 2003 May;107 (Pt 5):567-71.
30. Sinulinga W., Suwanto and Soepena H., 1996. *Current status of Corynespora leaf fall in Indonesia*. Presented at workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brassiliensis*, Medan, Indonesia 16 – 17, Dec, 1996
31. Sujanto and Irwan Suhendry., 2000. *Corynespora leaf fall disease on Hevea rubber in Indonesia*. Presented at workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brassiliensis*, Kuala Lumpur, Malaysia and Medan, Indonesia, 6 – 15, June, 2000.
32. The International Natural Rubber Organization, 1999. *Improvement of management strategy in combating Corynespora leaf fall disease (CLFD) in Hevea brasiliensis*.

TÀI LIỆU TỪ INTERNET.

33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
Database: *Corynespora cassiicola*.
34. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12884953&dopt=Abstract
Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relation between host and virulence
35. <http://www.irrdb.com/>

Annual report

36. [http://www.avery.rulger.edu/wssp/studentscholarship/project/achives anion/rapd.html](http://www.avery.rulger.edu/wssp/studentscholarship/project/achives%20anion/rapd.html).

Các từ khóa: rapd+picture+define

37. <http://library.uws.edu.au/adt-NUWS/uploads/approved/adt-NUWS20050722.084916/public/04Chapter3.pdf>

Các từ khóa: rapd+apply+fungus

38. <http://www3.sympatico.ca/roland.pelletier>.

PHỤ LỤC.

Phụ lục I Thành phần các hóa chất trong phản ứng PCR

- TAE buffer 50X:

+ Tris-HCl	242 g/l.
+ Glacial acetic acid	57,1 ml/l.
+ EDTA 0,5M, pH 8	100 ml/l.

- TE

+ Tris HCl 10 mM, pH 8,3.
+ EDTA 1mM.

- Loading buffer

+ 100 % glycerol	5 ml.
+ TE 5X buffer	2,5 ml.
+ Bromphenol Blue	0,015 ml.

- Ethidium bromide

+15 µl Ethidiumbromide.
+300 ml TAE 0,5 X.

- Ladder

+65 % TAE 0,5X.
+25 % loading dye 6X.
+15 % ladder.

Phụ lục II Bảng mã hóa số liệu NTSYS kết quả RAPD

1	36	11	3									
Số thứ tự	1:L H99/ 0019	2:LH9 9/0081	3:L H99/ 0098	4:LH9 9/013 1	5:LH9 9/0431	6:LH 99/06 17	7:LH 99/06 79	8:LH9 9/005 3	9:LH 99/02 16	10:L H99/ 067	11:L HH	Kích Thước bp
OP L- 08	Tổng số 60 băng. Số lượng băng trung bình: 5,5 băng/nguồn nấm.											
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2200
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1850
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1750
4	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1500
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1400
6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1300
7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1200
8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	900
9	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	800
10	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	600
11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	500
12	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	450
13	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	350
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	300
Op m0 5-4	Tổng số 59 băng. Số lượng băng trung bình: 5,2 băng/nguồn nấm.											
15	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	2600
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2300
17	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1600
18	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1400
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1300
20	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1200
21	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	950
22	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	800
23	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	650
24	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	550
25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	480
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	400
27	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	250
28	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	200
Opd 19- h8	Tổng số 33 băng Số lượng băng trung bình: 3 băng/nguồn nấm.											
29	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1850
30	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1450
31	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1300
32	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1100
33	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	800
34	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	650
35	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	450

Phụ lục III :Danh sách các dvt cao su phân lập được mẫu.

Số thứ tự	Dvt cao su phân lập được mẫu bệnh	Số thứ tự	Dvt cao su phân lập được mẫu bệnh
1	LH99/0019	33	RRIV 2
2	LH99/0081	34	MT/C/5
3	LH99/0098	35	MT/C/4
4	LH99/0131	36	AC/B/18
5	LH99/0431	37	AC/B/17
6	LH99/0617	38	LH 97/164
7	LH99/0679	39	LH 96/347
8	LH99/0053	40	RRIC 121
9	LH99/0216	41	MTIT 14
10	LH99/0216	42	MTIT 16
11	LH99/0672	43	RO/CM/10
12	RRIV4	44	FX 2840
13	LH99/0028	45	AC 88
14	LH99/0090	46	PB 255
15	LH99/0083	47	PB 260
16	LH99/0093	48	MTI2
17	LH99/0098	49	ROT5
18	LH99/0023	50	LH 97/167
20	LH99/0622	51	LH 82/008
21	LH99/0627	52	LH 83/152
22	LH99/0638	53	VM 515
23	LH99/0648	54	VE2
24	LH99/0670	55	LH 82/104
25	LH99/0696	56	LH 82/183
26	LH99/0698	57	RRIC 100
27	LH99/0699	58	RRIC 102
28	LH99/0775	59	GU 969
29	LH99/0291	60	IAN 6323
30	LH99/0347	61	LH 82/156
31	LH99/0675	62	LH 83/161
32	LH99/0679	63	LH99/0778