

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



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**XÁC ĐỊNH GENE LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG VIRUS
PMWaV - *Pineapple mealybug wilt associated virus* - GÂY BỆNH
HÉO ĐỎ ĐÀU LÁ TRÊN CÂY DỨA CAYENNE BẰNG
PHƯƠNG PHÁP PCR THOÁI HOÁ (degenerated PCR)**

Ngành: Công nghệ sinh học

Niên khoá: 2003 - 2007

Sinh viên thực hiện: LÊ MINH THÔNG

Thành phố Hồ Chí Minh

09/2007

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

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**XÁC ĐỊNH GENE LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG VIRUS
PMWaV - *Pineapple mealybug wilt associated virus* - GÂY BỆNH
HÉO ĐỎ ĐẦU LÁ TRÊN CÂY DỨA CAYENNE BẰNG
PHƯƠNG PHÁP PCR THOÁI HOÁ (degenerated PCR)**

Giáo viên hướng dẫn:

TS. Trần Thị Dung

CN. Lưu Phúc Lợi

Sinh viên thực hiện:

Lê Minh Thông

Thành phố Hồ Chí Minh

09/2007

LỜI CẢM TẠ

Tôi xin chân thành cảm ơn:

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

Các thầy cô trong Bộ môn Công Nghệ Sinh Học cùng các thầy cô đã trực tiếp giảng dạy trong suốt bốn năm qua.

TS. Trần Thị Dung và CN. Lưu Phúc Lợi đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kinh nghiệm quý báu và tạo điều kiện tốt nhất cho việc thực hiện và hoàn tất khoá luận tốt nghiệp.

TS. Bùi Minh Trí, Ks. Hồ Việt Thế và các anh chị phụ trách phòng CNSH thuộc Viện nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Đại học Nông Lâm Tp. HCM đã quan tâm giúp đỡ trong suốt thời gian thực tập phòng thí nghiệm.

Các kỹ sư thuộc Nông trường Phạm Văn Hai đã tận tình hướng dẫn trong suốt thời gian thu mẫu.

Toàn thể lớp CNSH 29 thân yêu đã hỗ trợ, giúp đỡ, chia sẻ và động viên tôi trong suốt thời gian làm đề tài.

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

Tháng 9, năm 2007.

Lê Minh Thông

TÓM TẮT

LÊ MINH THÔNG, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Tháng 9/2007.

“XÁC ĐỊNH GENE LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG VIRUS PMWaV -

Pineapple mealybug wilt associated virus - GÂY BỆNH HÉO ĐỎ ĐẦU LÁ TRÊN CÂY DỨA CAYENNE BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR THOÁI HOÁ (degenerated PCR)”.

Hội đồng hướng dẫn:

TS. Trần Thị Dung

CN. Lưu Phúc Lợi

Đề tài được thực hiện từ tháng 01/2007 đến tháng 09/2007 tại Trại thực nghiệm bảo vệ thực vật, Khoa Nông học và Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh Học và Môi Trường thuộc Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh trên đối tượng cây dứa Cayenne. Dựa trên sự bảo tồn những motif trình tự của các họ gene kháng thực vật, thực hiện phản ứng PCR thoái hoá nhằm phân lập vùng gene NBS trên nguồn dứa Cayenne cấy mô đã được chủng bệnh và nguồn dứa ngoài đồng có và không có biểu hiện bệnh héo đỏ đầu lá. Thực hiện kỹ thuật RFLP đối với sản phẩm PCR thoái hoá với mục đích tìm kiếm những marker liên kết với tính kháng virus PMWaV - *Pineapple mealybug wilt associated virus* – tác nhân gây bệnh wilt, làm cơ sở ban đầu cho những phân tích xa hơn nhằm phục vụ cho mục tiêu tạo ra giống dứa Cayenne chất lượng cao, có khả năng kháng mạnh và ổn định đối với dịch bệnh nguy hiểm trên, góp phần bảo vệ năng suất, phẩm chất của cây dứa, mang lại hiệu quả cho nông dân và kinh tế xã hội.

Kết quả:

Đã nuôi rệp và chủng bệnh thành công với tỉ lệ biểu hiện bệnh là 35,66%.

Đã cải tiến được chu trình nhiệt và nồng độ các thành phần tham gia phản ứng PCR thoái hoá của Z. Deng và cs (2000) cho phép khuếch đại thành công vùng NBS trên cây dứa Cayenne.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	iii
TÓM TẮT	iv
MỤC LỤC.....	v
DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	viii
DANH SÁCH CÁC HÌNH	x
DANH SÁCH CÁC BẢNG	xii
DANH SÁCH CÁC BIỂU ĐỒ	xii
MỞ ĐẦU.....	1
1.1. Đặt vấn đề	1
1.2. Mục tiêu	3
1.3. Nội dung.....	3
1.4. Yêu cầu.....	3
TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
2.1. Tổng quan về cây dứa	4
2.1.1. Nguồn gốc và phân loại.....	4
2.1.2. Đặc điểm thực vật học.....	4
2.1.3. Cây dứa Cayenne	5
2.1.4. Tình hình sản xuất và tiêu thụ dứa trên thế giới và Việt Nam.....	7
2.2. Bệnh héo đỏ đầu lá trên cây dứa	8
2.2.1. Tình hình dịch bệnh và tác hại	8
2.2.2. Triệu chứng	9
2.2.3. Nguyên nhân gây bệnh.....	10
2.2.4. Tác nhân lây truyền bệnh	10
2.2.5. Cách phòng trừ	11
2.2.6. Một số nghiên cứu về bệnh héo đỏ đầu lá trên thế giới và Việt Nam.....	11
2.3. Tổng quan về tính kháng bệnh trên thực vật.....	13

2.3.1. Khái niệm về tính kháng bệnh trên thực vật	13
2.3.2. Cơ sở sinh hóa, sinh lý của tính kháng bệnh ở thực vật.....	14
2.3.3. Cơ sở di truyền tính kháng bệnh ở thực vật	16
2.3.4. Phân loại tính kháng bệnh của cây trồng	18
2.3.5. Khái niệm gene đối gene (gene - for - gene concept)	19
2.3.6. Chức năng và cấu trúc gene kháng	20
2.4. Phương pháp PCR thoái hoá trong nghiên cứu tính kháng thực vật.....	24
2.4.1. Một số chiến lược nghiên cứu tính kháng thực vật.....	24
2.4.2. Sơ lược về quá trình sử dụng phương pháp PCR thoái hoá.....	25
2.4.3. Thiết kế primer thoái hoá	27
2.4.4. Những khuyết điểm của phương pháp	31
2.5. Ly trích DNA thực vật	31
2.6. Định lượng DNA.....	32
2.7. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction).....	32
2.7.1. Nguyên tắc của phương pháp PCR	32
2.7.2. Thành phần và các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR	35
2.8. Giới thiệu chung về đa dạng di truyền	36
2.9. Phương pháp RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	37
2.9.1. Enzyme cắt giới hạn.....	37
2.9.2. Nguyên tắc của phương pháp RFLP	37
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
3.1. Nội dung, địa điểm và thời gian nghiên cứu	39
3.1.1. Nội dung.....	39
3.1.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	39
3.2. Vật liệu	39
3.2.1. Vật liệu chủng bệnh	39
3.2.2. Hoá chất và vật liệu dùng trong ly trích DNA tổng số và PCR.....	40
3.3. Phương pháp nghiên cứu.....	41
3.3.1. Nội dung 1: Lây nhiễm bệnh héo đỏ đầu lá cho dứa Cayenne.	41

3.3.2. Nội dung 2: Phân lập vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập.....	44
3.3.3. Nội dung 3: Phân tích RFLP vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập. ..	49
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	50
4.1. Nội dung 1: Lây nhiễm bệnh héo đỏ đầu lá cho dứa Cayenne.	50
4.1.1. Nuôi rệp.....	50
4.1.2. Lây nhiễm bệnh.....	51
4.1.3. Thu thập mẫu.....	54
4.2. Nội dung 2: Phân lập vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập.....	56
4.2.1. Kết quả ly trích DNA tổng số	56
4.2.2. Kết quả pha loãng mẫu DNA tổng số	56
4.2.3. Tối ưu phương pháp PCR thoái hoá.....	57
4.2.4. Reamplify sản phẩm PCR	64
4.2.5. PCR trên các loại mô khác nhau	65
4.2.6. PCR thoái hoá clone vùng NBS trên các mẫu dứa Cayenne	66
4.3. Nội dung 3: Phân tích RFLP vùng gene NBS các mẫu dứa thu thập.	68
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	69
5.1. Kết luận	69
5.2. Đề nghị	69
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	70

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

bp	base pairs
cs.	cộng sự
CC	coiled coil
cDNA	complementary deoxynucleic acid
CTAB	cetyl trimethyl ammonium bromide
DNA	deoxyribo nucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
EB	extraction buffer
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EST	expressed sequence tag
GLRaV-3	grape leafroll associated virus
KIN	kinase
LRR	leucine rich repeat
MAS	marker assisted selection
MWP	mealybug wilt of pineapple
NBS	nucleotide binding site
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PCV	pineapple closterovirus
PMWaV	<i>pineapple mealybug- wilt associated virus</i>
QLT	quatity loci trait
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RGA	resistance gene analogs
RT	reverse transcription
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
TAE	tris – acetate – EDTA
TBIA	tissue blot immunoassay
TE	tris – EDTA

TIR toll interleukin receptor
TMV tobacco mosaic virus
Tp. HCM Thành phố Hồ Chí Minh

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1. Cây dứa	5
Hình 2.2. Cây dứa Cayenne	6
Hình 2.3. Ruộng dứa bị nhiễm bệnh héo đỏ đầu lá.....	8
Hình 2.4. Cây dứa và quả dứa Cayenne bị nhiễm bệnh đỏ đầu lá do virus PMWaV.9	
Hình 2.5. Hai loại rệp lây truyền PMWaV.	10
Hình 2.6. Sự cộng sinh giữa kiến và rệp sáp.....	11
Hình 2.7. Cơ chế kích hoạt tính kháng bệnh ở thực vật.....	20
Hình 2.8. Một số domain kháng, sự tổ hợp và phân bố của chúng trong tế bào....	22
Hình 2.9. Tương quan về sự bảo tồn và biến dị của cấu trúc NBS-LRR.....	23
Hình 2.10. Sự phân bố và bảo tồn của các motif trong vùng.....	24
Hình 2.11. Tiến trình nghiên cứu tính kháng thực vật có sử dụng phương pháp PCR thoái hoá.	27
Hình 2.12. Sơ đồ các bước thiết kế primer thoái hoá và bảng mã các nucleotide thoái hóa.	29
Hình 2.13. Quá trình của phản ứng PCR.	34
Hình 3.1. Chuyển rệp lên bí	42
Hình 3.2. Chuyển rệp bằng đèn.....	43
Hình 4.1. Sự phát triển của rệp trên bí đỏ sau 45 ngày.	51
Hình 4.2. Rệp phát triển trên dứa sau 7 ngày.....	52
Hình 4.3. Chuyển rệp lên dứa sạch bệnh.	53
Hình 4.4. Rệp phát triển trên dứa sau khi chủng.....	53
Hình 4.5. Dứa biểu hiện bệnh héo đỏ đầu lá sau khi chủng bệnh.....	54
Hình 4.6. Một số mẫu dứa Cayenne thu thập.....	55
Hình 4.7. Kết quả điện di DNA tổng số theo quy trình cải tiến.....	56
Hình 4.8. Kết quả pha loãng DNA.	57
Hình 4.9. Kết quả PCR tối ưu 4 cặp primer theo quy trình của Z. Deng và cs có cải tiến.....	58

Hình 4.10. Kết quả PCR tối ưu nồng độ primer	59
Hình 4.11. Kết quả PCR tối ưu nồng độ dNTP.....	60
Hình 4.12. Kết quả PCR tối ưu nồng độ Mg^{2+}	61
Hình 4.13. Kết quả PCR tối ưu nồng độ Taq polymerase	62
Hình 4.14. Kết quả tối ưu nhiệt độ bắt cặp	62
Hình 4.15. Kết quả PCR tối ưu số chu kỳ.....	63
Hình 4.16. Kết quả khuếch đại lại sản phẩm PCR lần 1 của một số mẫu dứa.....	65
Hình 4.17. Sản phẩm PCR với quy trình đã tối ưu trên các loại mô khác nhau	66
Hình 4.18. Kết quả PCR thoái hoá trên 9 mẫu dứa Cayenne.....	67
Hình 4.19. Kết quả phân cắt enzyme <i>Hind III</i> sản phẩm PCR thoái hoá.....	68

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các họ gene kháng chính.....	22
Bảng 3.1. Các primer thoái hoá sử dụng trong nghiên cứu	46
Bảng 3.2. Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR theo Z. Deng và cs. 47	
Bảng 3.3. Một số chỉ tiêu và các mức tiến hành tối ưu phản ứng PCR thoái hoá . 47	
Bảng 3.4. Thành phần phản ứng enzyme cắt	49
Bảng 4.1. Kết quả nuôi rệp.....	50
Bảng 4.2. Danh sách các mẫu thu thập	55
Bảng 4.3. Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR thoái hoá cải tiến ...	58

DANH SÁCH CÁC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 4.1. Sự phát triển của rệp theo thời gian.....	45
--	----

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Sở hữu những đặc điểm về dinh dưỡng, mùi vị cùng với những ưu thế trong canh tác và ứng dụng thực tế rộng rãi, cây dứa – nữ hoàng của các loại trái cây rất được ưa chuộng và quan tâm phát triển. Đối với nước ta, cây dứa được xác định với tiềm năng kinh tế xã hội rất lớn. Trong các giống dứa chính, dứa Cayenne mang nhiều ưu điểm vượt trội và là giống được trồng nhiều nhất trên thế giới. Nhiều vùng chuyên canh dứa mọc lên nhanh chóng để cung cấp nguyên liệu cho các nhà máy chế biến, phục vụ nhu cầu trong nước và xuất khẩu. Tuy nhiên, khi diện tích gieo trồng và sản lượng tăng lên thì cũng kéo theo sự phát triển và lây lan nhanh chóng của các bệnh hại dứa. Trong đó, đặc biệt nguy hiểm và gây thiệt hại nặng nề nhất là bệnh héo đỏ đầu lá (bệnh wilt) do virus PMWaV (*Pineapple mealybug wilt – associated virus*) gây nên. Trong khi đó, những biện pháp canh tác, phòng trừ với hiệu quả thấp không giúp cho cây dứa và người nông dân thoát khỏi sự đe dọa của dịch bệnh nguy hiểm này.

Bên cạnh đó, những tiến bộ gần đây trong việc nghiên cứu tính kháng bệnh cây trồng, đặc biệt là trong lĩnh vực sinh học phân tử đã mở ra một cơ hội to lớn trong việc tạo ra cây dứa có tính kháng ổn định đối với bệnh héo đỏ đầu lá. Cụ thể hơn, người ta đã nghiên cứu, xác định và phân lập nhiều gene liên quan đến tính kháng bệnh trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau, hoạt động theo mô hình gene đối gene. Nhiều trong số những gene kháng này (gene R) mã hóa cho những protein tham gia vào quá trình truyền tín hiệu để kích hoạt phản ứng kháng bệnh chuyên biệt ở cây trồng. Nghiên cứu những protein đó, người ta nhận thấy có một sự tương đồng cao về cấu trúc ở nhiều loài thực vật khác nhau. Sự tương đồng này còn thể hiện ở những trường hợp kháng đối với các đối tượng kí sinh khác nhau. Phát hiện này đã làm nền tảng cho việc thiết kế những primer thoái hóa trên những motif bảo tồn của nhiều protein kháng phục vụ cho việc thực hiện phản ứng PCR khuếch đại

những trình tự tương đồng liên quan đến tính kháng. Những trình tự này được xem là gene dự tuyển tính kháng – RGA (resistance gene analogs). Việc nghiên cứu ứng dụng những trình tự RGA có một ý nghĩa vô cùng quan trọng trong việc tổ chức, phân bố và tiến hóa của gene kháng thực vật. Quan trọng hơn nữa, các trình tự RGA được xác định là những công cụ sống còn trong việc phân lập các gene kháng với chiều dài đầy đủ. RGA cũng mang hứa hẹn nhiều cho công tác nghiên cứu genome thực vật, đặc biệt là của những đối tượng khó khăn trong việc nhân giống hữu tính như cây dứa. Cuối cùng, thực tế hơn cả là sự đóng góp của những trình tự RGA này trong việc thiết kế những chiến lược chọn tạo giống mới với đầy đủ những đặc tính kháng bệnh bền vững thông qua phương pháp chọn lọc dựa vào marker phân tử hay chuyển gene...

Trong sinh học phân tử, phương pháp PCR thoái hoá được cho là một công cụ mạnh mẽ trong việc tìm kiếm và phân lập những gene mới và các họ gene. Mặt khác, sự bảo toàn của trình tự gene kháng trên nhiều đối tượng thực vật cho phép ta hy vọng trên cây dứa Cayenne cũng tồn tại những gene với chức năng tương ứng. Hơn nữa, trong hoàn cảnh những nghiên cứu về di truyền trên đối tượng này chưa nhiều, đặc biệt là chưa có trình tự genome dứa hay trình tự về những marker liên quan đến tính kháng nên việc nghiên cứu tính kháng trên cây dứa Cayenne là rất khó khăn. Với tình hình như vậy, việc áp dụng chiến lược trên, hay cụ thể hơn là ứng dụng kỹ thuật PCR với primer thoái hoá để phân lập các thành viên trong họ gene kháng hiện hữu trong quần thể dứa Cayenne tại Thành phố Hồ Chí Minh là một bước đi hợp lý và xác đáng.

Vì vậy, đề tài “Xác định gene liên quan đến tính kháng virus PMWaV – gây bệnh héo đọt đầu lá trên giống dứa Cayenne bằng phương pháp PCR thoái hoá” được thực hiện nhằm tạo cơ sở ban đầu cho những phân tích xa hơn nhằm phục vụ cho mục tiêu tạo ra giống dứa Cayenne chất lượng cao, có khả năng kháng mạnh và ổn định đối với dịch bệnh nguy hiểm trên, góp phần bảo vệ năng suất, phẩm chất của cây dứa, mang lại hiệu quả cho nông dân và kinh tế xã hội.

1.2. Mục tiêu

Bước đầu xây dựng phương pháp PCR thoái hoá trên cây dứa Cayenne làm cơ sở cho việc xác định gene liên quan đến tính kháng virus PMWaV – gây bệnh héo đở đầu lá.

Nghiên cứu sự đa dạng di truyền về gene kháng giữa các giống dứa Cayenne dựa trên phương pháp RFLP – PCR nhằm xác định marker liên quan đến tính kháng bệnh héo đở đầu lá.

1.3. Nội dung

Khoá luận được thực hiện với 3 nội dung sau:

Nội dung 1: Lây nhiễm bệnh héo đở đầu lá cho dứa Cayenne.

Nội dung 2: Phân lập vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập.

Nội dung 3: Phân tích RFLP vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập.

1.4. Yêu cầu

Tiến hành nuôi rệp, chủng bệnh héo đở đầu lá lên cây dứa Cayenne nuôi cấy mô sạch bệnh.

Thu thập mẫu dứa Cayenne có và không có biểu hiện bệnh héo đở đầu lá từ hai nguồn: dứa ngoài đồng và dứa cấy mô được chủng bệnh.

Ly trích DNA tổng số, định lượng và pha loãng từ các mẫu dứa được thu thập.

Tối ưu hoá phương pháp PCR thoái hoá, phân lập vùng gene kháng trên các mẫu dứa thu thập bằng quy trình đã được tối ưu.

Thực hiện kỹ thuật RFLP trên sản phẩm PCR thoái hoá, qua đó khảo sát sự đa dạng di truyền về gene kháng giữa các mẫu dứa thu thập và xác định các marker liên quan đến tính kháng bệnh héo đở đầu lá trên cây dứa Cayenne.

Chương 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Tổng quan về cây dứa

2.1.1. Nguồn gốc và phân loại

Dứa là một loại thực vật nhiệt đới có nguồn gốc từ Nam Mỹ (Trung và Nam Brazil, miền Bắc Argentina và Paraguay) được thuần hóa bởi những người thổ dân bản địa. Ở cuối thế kỷ 16, cây dứa được du nhập vào châu Á và đến cuối thế kỷ 17, nó đã được trồng phổ biến ở hầu hết các nước nhiệt đới trên thế giới. Ở Việt Nam, cây dứa đã được du nhập và trồng từ hơn 130 năm trước. Riêng giống Cayenne du nhập vào nước ta cuối những năm ba mươi, đầu những năm bốn mươi trong những đồn điền do người Pháp quản lý ở một số địa phương miền Bắc.

Dứa có tên khoa học là *Ananas comosus* (L.) Merr thuộc:

Phân lớp: Magnoliophyta

Lớp: Liliopsida

Bộ: Poales

Họ: *Bromeliaceae*

Giống: *Ananas*

Loài: *Ananas comosus*

2.1.2. Đặc điểm thực vật học

Cây dứa có lá hình ống máng, có gai, chiều dài lá tương đối đồng đều, phân bố đều, xòe ra tứ phía, hình hoa thị. Do có nguồn gốc là cây khí sinh nên hệ rễ dứa cắm xuống đất khá cạn và yếu. Trên thân ở nách lá có một số chồi. Chồi dứa cũng như thân chính có nhiều rễ khí sinh sẽ bật thành rễ ngầm khi tiếp xúc với đất, do đó người ta dùng chồi dứa để nhân giống, không dùng hạt. Quả dứa phức hợp hình chóp cụt, giữa có lõi (thực chất là phần nối tiếp của thân chính), trên đầu quả còn có chồi gồm nhiều lá ngắn (gọi là chồi ngọn) cũng được dùng để nhân giống.



Hình 2.1. Cây dứa

Dứa là cây thân thảo lâu năm. Sau khi thu hoạch trái thứ nhất, các mầm nách ở thân tiếp tục phát triển và hình thành một cây mới giống như cây trước, cũng cho một trái. Nhiều thể hệ sinh trưởng có thể tiếp nối nhau như vậy, nhưng trong thực tế đối với nhiều giống dứa, thu hoạch hai hay ba lứa thường không có lợi do cây thoái hóa, trái nhỏ dần và không đồng đều.

Dứa sinh trưởng và ra hoa tốt ở 20 – 30°C, lượng mưa hàng năm khoảng 1000 – 2000 mm nên rất thích hợp với điều kiện khí hậu của nước ta với nhiệt độ bình quân là 22°C và lượng mưa bình quân 1300 - 1500 mm/năm. Về thổ nhưỡng, dứa thích hợp với đất đồi, đất badan, thậm chí đất xấu. Đặc biệt với đất phèn, không thể trồng lúa, trồng hoa màu nhưng trồng dứa lại rất tốt. Dứa có khả năng chống xói mòn, giữ màu cho đất nếu trồng với mật độ hợp lý (45.000 - 65.000 cây/ha). Cây dứa lại bảo đảm cho thu hoạch chắc chắn vì dứa không có hiện tượng ra hoa khó, rụng đài như nhiều loại cây ăn quả khác nên năng suất ổn định, không có hiện tượng mất mùa.

2.1.3. Cây dứa Cayenne

Dứa gồm khoảng 50 giống và 2000 loài phân bố ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Các giống dứa đang được trồng hiện nay được chia thành 3 nhóm: nhóm dứa Cayenne, nhóm dứa Queen (dứa Hoàng Hậu) và nhóm Spanish (dứa Tây Ban Nha). Trong đó, dứa Cayenne là loại được trồng phổ biến nhất trên thế giới.



Hình 2.2. Cây dứa Cayenne

Theo điều tra nghiên cứu của Viện nghiên cứu rau quả, đã tập hợp được 3 giống Cayenne được trồng ở nước ta gồm: Cayenne Chân Mộng trồng ở Vĩnh Phú, Cayenne Phủ Quỳnh trồng ở Nghĩa Đàn - Nghệ An, Cayenne Đức Trọng trồng ở Lâm Đồng. Giống Cayenne Lâm Đồng có nguồn gốc từ Pháp và là giống được trồng chủ yếu ở Nam Bộ. Nguồn gốc của các giống Cayenne trồng ở nước ta thường nhập từ nước ngoài và qua tiến hành lai tạo (Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải, 2002).

Đặc điểm chung của dứa Cayenne là lá dài, không gai, dày, lòng máng sâu, chậm ra hoa. Khi chưa chín, trái màu xanh đen, khi chín chuyển sang màu vàng da cam.

Dứa Cayenne chứa rất nhiều nước, vỏ lại mỏng nên rất dễ thối khi vận chuyển đi xa. Tuy nhiên, nước lại có tỷ lệ đường cao, vị chua nhẹ, mùi thanh, rất hợp khẩu vị người phương Tây, trái to (to nhất có thể đạt 3 – 4 kg/trái). Quả hình ống, mắt dứa Cayenne lại rất cạn, gọt vỏ xong không cần lấy mắt có thể ăn ngay.

Vì thế, so với các giống khác, dứa Cayenne có nhiều thuận lợi, lý tưởng cho việc chế biến đồ hộp (dứa khoanh, nước dứa cô đặc...) và thương mại trên quy mô công nghiệp.

Về mặt canh tác, nhờ đặc tính không có gai nên thao tác thuận lợi, hiệu suất lao động tăng lên nhiều. Hiện nay, dứa Cayenne là nguyên liệu chính cho ngành công nghiệp chế biến - xuất khẩu dứa của nước ta và đang được chú ý phổ biến ra diện

rộng, hình thành các vùng trồng dứa nguyên liệu nhằm cung cấp cho các nhà máy chế biến dứa.

2.1.4. Tình hình sản xuất và tiêu thụ dứa trên thế giới và Việt Nam

2.1.4.1. Thế giới

Theo số liệu thống kê thu thập từ FAO (Food and Agriculture Organisation), sản lượng dứa thế giới 1999 - 2001 là 13.527.149 tấn và ước tính sẽ ổn định trong 3 năm. Sản lượng trên thế giới đã tăng gấp 3 lần trong 30 năm qua (3.833.137 tấn - năm 1961 đến 13.738.735 tấn - năm 2001). Những nước đứng đầu về sản lượng năm 2001 bao gồm Thái Lan (2.300.000 tấn), Philippine (1.571.904 tấn), Brazil (1.442.300 tấn), Trung Quốc (1.284.000 tấn). Những nước chiếm ưu thế về thị trường dứa tươi (khoảng 700.000 tấn) như Costa Rica, Philippine; về dứa đông lạnh là Thái Lan và Philippine. Mỹ là nước nhập khẩu dứa lớn nhất từ năm 1998 - 2000 bình quân 552,5 triệu USD/năm ở các dạng dứa đóng hộp, tươi và cô đặc.

Theo thống kê, sản lượng dứa Cayenne chiếm 70% sản lượng thế giới và hầu hết ở dạng đóng hộp (khoảng 95%). Hiện nay, nhu cầu về dứa Cayenne ở dạng tươi cũng đang lên cao nhưng do chất lượng dứa tươi chưa tốt đòi hỏi phải cải thiện giống Cayenne để cung cấp dạng tươi tốt hơn (Sanewski and Scott, 2000). Hiện nay, một số nước đang cố gắng phát triển giống Cayenne như Đài Loan, Malaysia, Cuba, Brazil và Pháp.

2.1.4.2. Trong nước

Theo số liệu điều tra của Viện quy hoạch và thống kê nông nghiệp, diện tích dứa Cayenne năm 2002 là 3.641 ha trồng ở 18 tỉnh, thành phố và con số này đã được gia tăng trong những năm gần đây. Các tỉnh có diện tích dứa Cayenne nhiều như Ninh Bình (700 ha), Nghệ An (695 ha), Hà Tĩnh (438 ha). Sản lượng dứa tươi sản xuất cả nước theo Tổng cục thống kê Nông - Lâm - Ngư dao động từ 263 – 316 nghìn tấn/năm. Trong đó Đồng Bằng Sông Cửu Long chiếm gần 71%.

Nguyên liệu cung cấp cho các nhà máy chế biến đang trong tình trạng cung chưa đủ cầu do sự ra đời của nhiều nhà máy chế biến dứa với công suất cao và kỹ thuật

hiện đại như ở Tiền Giang, An Giang hay nhiều nhà máy công suất nhỏ ở Hà Tĩnh, Tp. Hồ Chí Minh, Cần Thơ..

2.2. Bệnh héo đỏ đầu lá trên cây dứa

Như một điều tất yếu, đi kèm với việc tăng diện tích gieo trồng và sản lượng thì bệnh hại trên dứa cũng bắt đầu lan rộng. Theo kết quả điều tra của nhóm nghiên cứu bệnh hại trên dứa thuộc trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM năm 2003, trên hầu hết các ruộng dứa tại Tp. HCM, Long An, Tiền Giang, Lâm Đồng xuất hiện những bệnh như thối trái, thối nõn làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng dứa, gây thiệt hại nghiêm trọng về mặt kinh tế. Trong đó, đáng lo ngại gây thiệt hại nặng nề nhất là bệnh héo đỏ đầu lá.



Hình 2.3. Ruộng dứa bị nhiễm bệnh héo đỏ đầu lá

2.2.1. Tình hình dịch bệnh và tác hại

Hiện nay, bệnh héo đỏ đầu lá hiện diện ở hầu hết các vùng trồng dứa trên thế giới. Theo Sether D.M. và Hu J.S. (2002), bệnh đã xuất hiện ở Mỹ, Đài Loan, Singapore, Brazil, Jamaica, Philippines, Venezuela, Thái lan, Malaysia và cả ở Việt Nam. Đây là bệnh rất nguy hiểm và ảnh hưởng lớn đến nghề trồng dứa. Không như các bệnh khác trên dứa do vi khuẩn, nấm hay tuyến trùng đều có các loại thuốc phòng trị đặc hiệu, bệnh héo đỏ đầu lá cho đến nay vẫn chưa có biện pháp phòng trừ triệt để ngoài việc hạn chế sự lây lan là diệt môi giới truyền bệnh (Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải, 2001). Virus gây bệnh tồn lưu và lan truyền sang đời sau chủ yếu

qua chồi giống và tàn dư của cây bệnh. Những chồi giống mang mầm bệnh lại thường chỉ biểu hiện triệu chứng vào giai đoạn cây đang phân hóa mầm hoa trở đi, tức là sau một thời gian trồng rất dài (9 - 12 tháng). Chính đặc điểm này của bệnh héo đỏ đầu lá đã gây nên những thiệt hại to lớn cho người trồng dứa (Borroto E.G. và cs, 1998).

2.2.2. Triệu chứng

Bệnh biểu hiện đầu tiên trên các lá già nhất, sau đó đến các lá già và lá bên trên. Các lá đỏ dần lên, vỏ lụa bung ra, kém trương nước. Mép lá và đầu lá bị héo, hóa nâu và khô dần. Tùy theo giống, từ khi cây bị nhiễm bệnh tới khi biểu hiện triệu chứng mất từ 2 tuần đến 6 tháng. Nhiều cây con bị nhiễm trong vườn ươm không có dấu hiệu bệnh, sau một thời gian trồng mới biểu hiện. Bệnh trở nên nặng hơn khi cây ra hoa, nuôi quả.



Hình 2.4. Cây dứa và quả dứa Cayenne bị nhiễm bệnh đỏ đầu lá do virus PMWaV.

Bệnh héo thường trải qua 4 giai đoạn phát triển:

- **Xâm nhiễm:** biểu hiện là chóp lá có màu đỏ.
- **Lây lan:** lá biến màu, chuyển từ đỏ sang hồng, mép lá uốn cong về phía mặt dưới.
- **Héo lá:** các lá bị bệnh héo khô dần, trong khi lá ở nõn vẫn mọc bình thường.
- **Gây chết cây.**

Hậu quả của bệnh wilt là quả bị nhỏ, chua, khô, mất lộ rõ, không có giá trị thương phẩm.

2.2.3. Nguyên nhân gây bệnh

Các nghiên cứu đã chứng minh rằng yếu tố liên quan đến bệnh héo đỏ đầu lá là virus. Virus liên quan đến bệnh héo ở dứa (PMWaV) thực chất là phức hợp của 2 loại virus PMWaV - 1 và PMWaV - 2. Dựa vào các đặc điểm về di truyền, hai loại virus này được xếp vào họ *Closterovirus*, loài *Ampelovirus*, giống *Vinivirus*. Các phân tích về phát sinh loài ở trình tự gene cho thấy PMWaV - 1 và PMWaV - 2 có độ tương đồng trung bình 50%.

2.2.4. Tác nhân lây truyền bệnh

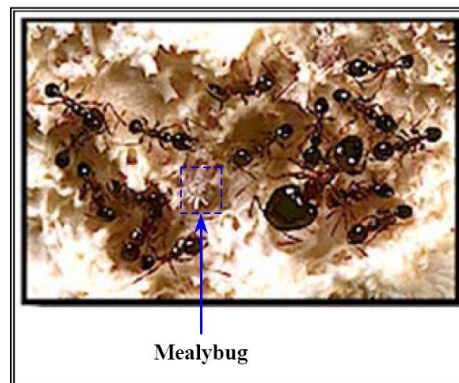
PMWaV - 1 và PMWaV - 2 được lây truyền bởi 2 loài rệp sáp: *Dysmicoccus brevipes* (rệp màu hồng) và *D. neobrevipes* (rệp màu xám). Rệp sáp có kích thước khoảng 2 - 3 mm, mình phủ một lớp sáp. Rệp sáp bám vào các lá non, vào gốc là già, vào mắt quả, vào rễ cây để hút dịch cây. Chúng sống trên cây dứa nhiễm PMWaV, tiếp thu và truyền virus trong suốt quá trình dinh dưỡng. Không có kí chủ khác của virus được tìm thấy ngoài cây dứa, mặc dù nhiều loài cũng là kí chủ của hai loài rệp này. Điều đó cho thấy cây dứa nhiễm PMWaV là nguồn chứa virus duy nhất cho rệp truyền sang các cây khác.



Hình 2.5. Hai loại rệp lây truyền PMWaV.

- (a) Rệp sáp màu xám (*Dysmicoccus neobrevipes* Beards),
 (b) Rệp sáp màu hồng (*Dysmicoccus brevipes* Cockerell).

Bên cạnh đó, kiến thường xuất hiện đồng thời với rệp tạo điều kiện thuận lợi cho rệp phát triển. Rệp chích hút nhựa cây sau đó tiết ra chất ngọt để quyên rũ kiến. Kiến sử dụng mật do rệp tiết ra, dùng đất và rác hữu cơ tạo thành nơi ẩn náu xung quanh đàn rệp để che chở cho chúng khỏi mưa nắng và tạo nên một tiểu khí hậu thích hợp cho rệp sinh sản. Khi cây dứa suy kiệt, kiến lại tha rệp đến cây khác. Với sự che chở của kiến cùng chu kỳ sinh sản ngắn từ 35 – 45 ngày, rệp mắn đẻ và phát triển rất nhanh. Vì vậy, có thể xem rệp và kiến có sự cộng sinh với nhau.



Hình 2.6. Sự cộng sinh giữa kiến và rệp sáp

2.2.5. Cách phòng trừ

Để phòng trừ bệnh héo đỏ đầu lá, theo Nguyễn Văn Kế (2000), cần áp dụng tổng hợp các biện pháp sau:

- Chọn giống kháng bệnh và lấy giống từ vùng ít bệnh.
- Xử lý vật liệu trồng bằng thuốc trừ rệp sáp.
- Trước khi trồng, khử đất để trừ kiến và các ổ rệp.
- Vệ sinh đồng ruộng để tránh lây lan cho vụ sau.
- Trong quá trình dứa phát triển cần theo dõi phun trừ rệp, kiến.

2.2.6. Một số nghiên cứu về bệnh héo đỏ đầu lá trên thế giới và Việt Nam

2.2.6.1. Thế giới

Tuy bệnh héo đỏ đầu lá đã xuất hiện từ rất lâu trên thế giới, nhưng mãi đến gần đây, các nghiên cứu về bệnh mới đạt được những thành tựu mong muốn.

Năm 1989, German và Gunasinghe đã tìm thấy *closterovirus* ở những cây dứa bị héo đỏ đầu lá ở Hawaii và đặt tên là *Pineapple closterovirus* (PCV).

Kháng thể đa dòng (Polyclonal Anti-body – PAb) sản xuất ở Hawaii (Millman D.E. và cs, 1989) và Australia (Wakmen W. và cs, 1995) được dùng để phát hiện PCV. Tuy nhiên, PAb cũng tương tác với protein của dứa nên không đem lại kết quả chính xác.

Năm 1996, Hu, Sether và Millman đã thiết kế kháng thể đơn dòng (Monoclonal Anti-body) cho PMWaV. Tuy nhiên, thí nghiệm thiếu độ nhạy cần thiết nên phải dùng những mẫu rễ và lá giàu virus mới thu được kết quả.

Năm 1997, Hu và cộng sự áp dụng phương pháp TBIA vào việc kiểm tra PCV cho thấy kể cả cây có triệu chứng bệnh lẫn cây không có triệu chứng bệnh đều mang virus.

Năm 1998, Hu, Sether và Millman tìm thấy PMWaV trên rệp sáp *Dysmicoccus brevipes* và *Dysmicoccus neobrevipes*. Xác định được rệp sáp là trung gian lây truyền PMWaV.

Năm 2001, Sether và cộng sự xác định được PMWaV gồm 2 dòng: PMWaV - 1 và PMWaV - 2. Bộ gene của chúng đã được giải trình tự và phân loại. Cũng trong nghiên cứu này, các mẫu dứa thu thập từ 17 nước trên thế giới đã được kiểm tra PMWaV với kỹ thuật TBIA và RT-PCR với kết quả 100% các mẫu trong thí nghiệm đều nhiễm PMWaV.

Năm 2002, Sether và Hu chứng minh cây mang PMWaV nhưng không có rệp sáp thì không xuất hiện bệnh. Tác giả đã đề ra giả thuyết độc tố trong nước bọt của rệp sáp cũng là một tác nhân cần thiết để gây bệnh. Tiến hành xử lý nhiệt để khử PMWaV trên các chồi dứa mang virus.

2.2.6.2. Việt Nam

Ở Việt Nam, nhìn chung chưa có nhiều nghiên cứu về bệnh héo đỏ đầu lá. Các thí nghiệm chỉ dừng lại ở bước xác định mối liên quan giữa mật độ rệp với mức độ bệnh trên dứa và thống kê tình hình phân bố bệnh ở một số địa phương.

Theo nghiên cứu của Phan Gia Tân (1984), trên giống dứa Queen, nếu chỉ có 6% số cây có rệp và mỗi cây có 1 – 10 con rệp thì cây chưa bị nhiễm bệnh hoặc nhiễm rất nhẹ. Với 90 – 92% cây có rệp và lượng rệp lẫn ấu trùng trên mỗi cây là 51

- 200 con thì cây bị nhiễm bệnh ở mức độ trung bình. Với 92% cây có rệp và mật độ ấu trùng trên 300 con/cây thì cây bị nhiễm bệnh nặng.

Một số thống kê về tình hình bệnh héo đỏ đầu lá của trường Đại học Nông Lâm TP.HCM cho thấy bệnh xuất hiện ở các vùng được nghiên cứu với tỷ lệ cao: ở Bến Lức – Long An, Tân Phước – Tiền Giang và Đức Trọng – Lâm Đồng, tỷ lệ bệnh lần lượt là 9.3%, 8.1% và 4.1%. Còn tỷ lệ bệnh ở các nông trường: nông trường Phạm Văn Hai, nông trường Lê Minh Xuân – Tp.HCM và nông trường Thọ Vực – Đồng Nai lần lượt là 6%, 7% và 12,1%.

Như vậy, hiện nay bệnh héo đỏ đầu lá đã xuất hiện ở nước ta với mật độ lớn và tỷ lệ cao, khi gặp điều kiện có thể lây lan thành dịch, gây thiệt hại lớn cho người trồng. Bên cạnh đó chúng ta vẫn chưa có biện pháp phòng trừ bệnh hữu hiệu mà chỉ có thể hạn chế bệnh bằng cách khống chế những nguồn trung gian truyền bệnh. Tuy nhiên với những vùng chuyên canh quy mô lớn hàng trăm, hàng ngàn hecta thì các phương pháp này không có tính khả thi. Vì vậy, với những dự án đầu tư lớn cho cây dưa hiện nay thì rất cần phải xây dựng chiến lược thật sự hiệu quả trong việc khống chế dịch hại.

2.3. Tổng quan về tính kháng bệnh trên thực vật

Trong suốt quá trình sinh trưởng, mỗi loài cây có thể bị tấn công bởi rất nhiều loại mầm bệnh như nấm, vi khuẩn, virus và nematode khác nhau. Mặt khác, một cây cũng có thể bị tấn công bởi hàng trăm, hàng ngàn cá thể của một loại bệnh. Sự tấn công này gây ra những thương tổn ở các mức độ khác nhau. Tuy nhiên, nhờ có khả năng tự bảo vệ khá tốt nên cây vẫn sinh trưởng, sinh sản và phát triển bình thường. Nhiều nhà khoa học từ khắp nơi trên thế giới đã tiến hành nghiên cứu để tìm hiểu khả năng tự bảo vệ tuyệt vời này của thực vật. Nhờ vậy mà ngày nay bản chất những phản ứng bảo vệ của cây trước sự tấn công của mầm bệnh đã dần sáng tỏ ở mức độ sinh lý, sinh hóa và phân tử.

2.3.1. Khái niệm về tính kháng bệnh trên thực vật

Khi cây trồng bị mầm bệnh tấn công, cây luôn có khuynh hướng chống đối lại với mầm bệnh. Nếu cây không đủ sức chống lại thì sẽ bị nhiễm bệnh, nếu cây chống

lại được với bệnh, không bị hại hoặc thiệt hại không đáng kể thì gọi là kháng bệnh. Tính kháng hoặc nhiễm bệnh của cây trồng tùy thuộc vào đặc tính di truyền của cây. Các đặc tính di truyền này giúp cho cây có những cơ chế kháng bệnh khác nhau.

2.3.2. Cơ sở sinh hóa, sinh lý của tính kháng bệnh ở thực vật

Ngay từ những ngày đầu của thế kỷ, các nhà bệnh cây đã thường xuyên đặt câu hỏi: Cơ chế nào ngăn cản sự lan truyền của ký sinh trong cây? Liệu có phải là sự thiếu một hợp chất đặc biệt nào đó cho quá trình sinh trưởng của kí sinh hay là sự hiện diện của những chất ức chế sinh trưởng do cây tiết ra cản trở sự xâm nhập và lan truyền bệnh? Nhiều công trình nghiên cứu được tiến hành và kết quả đã được công bố, trong đó cơ chế bảo vệ nói chung của cây được quy tụ do hai đặc điểm sau:

- Do đặc điểm cấu trúc: các cấu trúc này làm nên những hàng rào cản trở việc xâm nhập và lan truyền của tác nhân gây bệnh.
- Sự sản sinh ra những hợp chất hóa học trong các tế bào, mô nhằm gây độc hoặc cản trở sự phát triển của tác nhân gây bệnh.

Tuy nhiên, sự kết hợp của hai đặc tính này trong quá trình bảo vệ cũng khác nhau giữa các loài cây cũng như giữa các mô trong quá trình đối mặt với tác nhân gây bệnh để hình thành nên các cơ chế kháng bệnh. Có hai nhóm cơ chế kháng bệnh: kháng bệnh thụ động và kháng bệnh chủ động.

2.3.2.1. Cơ chế kháng bệnh thụ động

Kháng bệnh thụ động là do cấu tạo cơ thể của cây có các đặc tính làm cho mầm bệnh không tấn công được hoặc không gây hại được cho cây trồng. Các cấu tạo này do bẩm sinh đã có sẵn trong cây dù có hoặc không có sự hiện diện của mầm bệnh. Cơ chế kháng bệnh thụ động được hình thành do hình thái cấu tạo, chức năng sinh lý hoặc do thành phần lý hoá học của cây.

Do hình thái cấu tạo

Các đặc tính về cấu tạo hình thái giúp cho cây kháng bệnh gồm: Độ dày của lớp cutin bao che bên ngoài biểu bì lá; đặc điểm của lớp lông, lớp sáp trên bề mặt ngoài của lá; cấu tạo của lớp mô bần; số lượng, kích thước và hình dạng khí khổng; kích

thước mạch nhựa; ngoại hình của cây; đặc tính nở hoa... Các yếu tố này chỉ thể hiện ở thời kỳ xâm nhập của ký sinh gây bệnh. Ngoài ra, nó cũng có vai trò khống chế tốc độ di chuyển lan rộng của kí sinh trong mô cây.

Do chức năng sinh lý

Chức năng sinh lý có ý nghĩa rất lớn trong sự kháng bệnh của cây. Bởi vì các hoạt động sinh lý nếu ăn khớp với các hoạt động gây bệnh của ký sinh, cây sẽ nhiễm bệnh. Ngược lại, nếu hoạt động này không phù hợp có thể là trở ngại lớn làm cho kí sinh không phát triển và gây bệnh được. Các yếu tố thuộc về chức năng sinh lý ảnh hưởng đến tính kháng bệnh của cây gồm: chế độ hoạt động của khí khổng, khả năng hàn gắn vết thương, sự trao đổi chất, đặc điểm nảy mầm của hạt giống...

Do thành phần lý hoá học

Sở dĩ thực vật kháng một sinh vật ký sinh nào đó là do thực vật này không có thành phần hoặc loại dinh dưỡng phù hợp cho sự sống của kí sinh ấy. Có tác giả cho rằng sự tồn tại của những dạng đồng phân lập thể của những chất trao đổi là nguyên nhân cơ bản dẫn đến tính kháng. Mặt khác, trong cây còn có sự điều chỉnh cân bằng giữa những chất ức chế của cây và chất kích thích sinh trưởng của ký sinh. Các yếu tố thuộc về thành phần lý hoá tham gia vào tính kháng bị động của thực vật bao gồm: số lượng và thành phần glucid; protein và các sản phẩm phân giải của nó; acid hữu cơ và độ pH của dịch tế bào; số lượng các alkaloid, phenol, tanin và các chất có tính bảo vệ - fitonxit; Trong đó các hợp chất phenol (pirocatesin, hydroquinon, pirogalon, acid chlorogeneic...) quyết định tính miễn dịch và tính kháng bệnh của cây đối với nhiều loại bệnh khác nhau.

2.3.2.2. Cơ chế kháng bệnh chủ động

Kháng bệnh chủ động là khi cây bị mầm bệnh tấn công sẽ sinh ra các cơ chế chống lại mầm bệnh. Các cơ chế này không có sẵn trong cây hoặc có nhưng với mức rất kém không đủ để bảo vệ cây trồng trước sự tấn công đó. Chỉ khi nào có sự hiện diện của mầm bệnh, cơ chế này mới được tăng cường đến mức đủ sức chống lại chúng. Trong trường hợp này, sự tấn công của mầm bệnh như là một kích thích để cây huy động các phản ứng đối phó. Sự kích thích để tạo ra sự kháng bệnh ở cây

gọi là kích kháng (induced resistance). Các cơ chế kháng bệnh chủ động có thể là: cây tự tạo ra các cấu trúc đặc biệt ngăn cản mầm bệnh tấn công các bộ phận chưa bị xâm nhiễm, cây tiết ra chất chống lại mầm bệnh và phản ứng tự chết của mô cây.

Sự hình thành mô kháng

Để đối phó với sự xâm nhiễm của nấm, virus, vi khuẩn, một số giống kháng bệnh có khả năng hình thành nhiều lớp tế bào rỗng bao quanh vùng mô bị bệnh, các nút chặn tylose trong mạch nhựa hoặc chất gom bịt kín gian bào làm cho phần nhiễm bệnh bị cô lập, không còn được nâng đỡ và rụng đi mang theo mầm bệnh.

Sự hình thành tế bào kháng

Sự đề kháng này do các biến đổi về hình thể của vách tế bào hoặc có nguồn gốc từ vách tế bào bị xâm nhiễm. Loại đề kháng này yếu và gồm 2 loại chính: phình to vách tế bào hoặc hình thành lớp bọc cô lập mầm bệnh.

Kháng sinh thực vật

Khi bị mầm bệnh tấn công, ở giống kháng bệnh còn có khả năng tích tụ các hoá chất cần thiết để chống lại mầm bệnh. Các hoá chất này ở dạng hợp chất với phenol, các polyphenol, chlorogenic acid, caffeic acid. Trong đó phổ biến hơn cả là chlorogenic acid và caffeic acid. Ngoài ra còn có các kháng sinh thực vật gọi là phytoalexide - những chất chỉ có trong sự kháng bệnh chủ động.

Phản ứng siêu nhạy cảm (hypersensitive)

Là phản ứng tự chết của phần mô bị xâm nhiễm kéo theo sự cô lập và bỏ đói kí sinh làm cho chúng chết đi. Sự chết tế bào càng nhanh, tính kháng càng mạnh.

Ngoài ra, trong cơ chế kháng chủ động còn phải kể đến tác động kháng của tế bào chết, hiện tượng thực bào hay phản ứng kháng độc tố, kháng men của mầm bệnh.

2.3.3. Cơ sở di truyền tính kháng bệnh ở thực vật

Cây thể hiện tính kháng đối với ký sinh gây bệnh là do chúng mang các đặc tính phân loại khác với nhóm ký chủ của ký sinh gây bệnh, hoặc cây chứa các gene kháng mà ký sinh không có gene tương ứng để phá vỡ. Hiện tượng kháng và nhiễm của cây trồng đối với vi sinh vật gây bệnh là do số lượng khác nhau của gene kháng

hiện diện ở mỗi giống cây và mức độ ảnh hưởng của gene kháng đối với ký sinh. Trường hợp giống rất nhiễm đối với vi sinh vật gây bệnh thể hiện sự kiện không có gene kháng một cách hiệu quả chống lại nòi gây bệnh đó. Như vậy, sự kháng bệnh của cây trồng là do gene điều khiển. Một số giống cây trồng có thể có tính kháng đơn gene hoặc đa gene tùy theo số gene đối kháng với một đối tượng bệnh cây mà nó có.

2.3.3.1. Kháng bệnh đơn gene (monogenetic resistance)

Tính kháng bệnh đơn gene thường do một gene có tính trội điều khiển hoặc có thể do một vài gene điều khiển nhưng các gene này định vị rất gần nhau và liên kết với nhau rất chặt chẽ. Các gene kháng này có tính chuyên biệt cao đối với dòng sinh lý của mầm bệnh. Do đó các giống có tính kháng đơn gene thường kháng rất mạnh đối với dòng sinh lý của mầm bệnh tương ứng. Tuy nhiên, khi gặp dòng sinh lý khác của mầm bệnh, các giống này trở thành nhiễm bệnh và nhiễm nặng. Sử dụng thường xuyên giống kháng đơn gene rất dễ dẫn đến sự chuyển đổi dòng sinh lý mới của mầm bệnh và tấn công được giống này.

2.3.3.2. Kháng bệnh đa gene (polygenetic resistance)

Tính kháng bệnh của nhóm này được biểu hiện bởi nhiều gene. Các gene kháng này có thể có gene trội lẫn gene lặn. Do có nhiều gene kháng nên các giống trong nhóm này có thể kháng với nhiều dòng sinh lý khác nhau của mầm bệnh. Nhờ đó, tính kháng của giống thường bền hơn, lâu bị phá vỡ hơn nhóm giống kháng đơn gene. Tuy nhiên, tính kháng của nhóm này thường không mạnh bằng nhóm kháng đơn gene. Các giống kháng đa gene thường gây phiền phức cho các nhà lai tạo giống do có nhiều gene kháng và có cả gene lặn nên phân ly rất phức tạp và khó chọn lọc về sau.

2.3.3.3. Tính nhiễm bệnh do tế bào chất

Hầu hết các trường hợp kháng hoặc nhiễm bệnh là do gene điều khiển. Tuy nhiên có một số trường hợp tính nhiễm bệnh lại do tế bào chất quyết định. Trong trường hợp này, tế bào chất lấn át cả gene điều khiển tính kháng làm cho gene này không hoạt động được.

2.3.4. Phân loại tính kháng bệnh của cây trồng

Kháng bệnh dọc và kháng bệnh ngang

Kháng bệnh dọc (vertical resistance) Những giống cây trồng được gọi là kháng bệnh dọc là những giống chỉ kháng được với một số dòng sinh lý của bệnh. Tính kháng này rất mạnh. Như vậy, các giống kháng bệnh dọc có tính chuyên biệt rất cao trong sự kháng bệnh. Các gene điều khiển tính kháng bệnh dọc thường tương ứng với tính kháng đơn gene.

Kháng bệnh ngang (horizontal resistance) Các giống kháng bệnh ngang có khả năng kháng với nhiều dòng sinh lý của mầm bệnh. Khả năng kháng này không cao lắm, chỉ ở mức hơi kháng. Các giống này tương ứng với kháng đa gene. Các giống kháng bệnh ngang tương đối ổn định hơn, lâu bị phá vỡ tính kháng hơn mặc dù kháng không mạnh lắm.

Kháng bệnh thật sự và kháng bệnh ngoài đồng

Kháng bệnh ngoài đồng là những giống khi sử dụng trong sản xuất thì tỏ ra kháng bệnh, nhưng khi đưa vào trong nhà kính nghiên cứu thì lại trở thành nhiễm bệnh. Các giống kháng bệnh ngoài đồng thường kháng với nhiều dòng sinh lý của mầm bệnh. Tính kháng bệnh ngoài đồng cũng được điều khiển bởi gene.

Kháng bệnh thật sự là những giống kháng bệnh cả ngoài đồng lẫn trong điều kiện thí nghiệm ở nhà kính. Kháng bệnh thật sự là để chỉ các giống kháng ngang hoặc đôi khi kháng dọc.

Tính hơi kháng bệnh

Trong các giống kháng bệnh và các giống nhiễm bệnh rõ rệt, có một nhóm giống luôn luôn thể hiện ở mức trung bình, tức là không kháng bệnh hẳn mà cũng không nhiễm bệnh hẳn. Các giống này bị nhiễm bệnh nhưng ở mức độ nhẹ. Nhóm giống này được xem là nhóm hơi kháng bệnh, cũng do gene điều khiển và di truyền được tính kháng này cho thế hệ sau.

Tính chống chịu (tolerance)

Là trường hợp cây vẫn tạo năng suất mặc dù bị nhiễm bệnh. Tính chịu bệnh bắt nguồn từ những đặc tính di truyền của ký chủ cho phép ký sinh phát triển một cách

hạn chế. Cơ sở di truyền học của tính chịu bệnh vẫn chưa được biết đầy đủ. Mối quan hệ giữa tính chịu bệnh và tính kháng ngang cũng chưa rõ ràng. Tính chịu bệnh hay gặp ở các bệnh virus. Trong trường hợp cây nhiễm các chủng hiền của virus sau đó không bị nhiễm các chủng độc nữa và giúp cây tạo được năng suất.

2.3.5. Khái niệm gene đối gene (gene - for - gene concept)

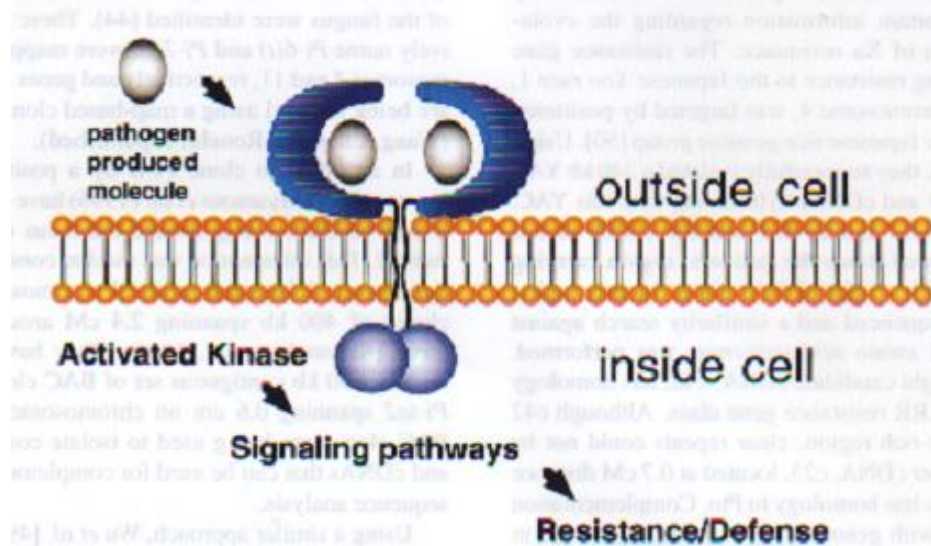
Khi quan sát từng giai đoạn trong tương tác di truyền giữa cây lanh (*Linum usitatissimum*) và bệnh gỉ sắt gây ra bởi *Melampsora lini*, Flor (1971) nhận thấy có sự tương quan giữa gene gây bệnh mạnh ở kí sinh với gene nhiễm bệnh ở kí chủ cũng như có sự tương quan giữa gene gây bệnh yếu ở kí sinh và gene kháng bệnh ở kí chủ. Từ đó, Flor đưa ra khái niệm gene đối gene như sau:

“Trong thiên nhiên, tương ứng với một gene điều khiển tính kháng hoặc nhiễm bệnh của kí chủ, luôn luôn có một gene điều khiển tính gây bệnh yếu hoặc mạnh ở kí sinh. Nói cách khác, giữa kí sinh và kí chủ luôn có một mối tác động qua lại lẫn nhau về gene như là các bổ thể của nhau”.

Như vậy, một gene gây bệnh mạnh hay yếu của kí sinh chỉ có thể được nhận ra khi có tương tác giữa nó với gene nhiễm hoặc kháng bệnh của giống kí chủ tương ứng. Và ngược lại, gene kháng bệnh hoặc nhiễm bệnh của một giống cũng chỉ có thể nhận ra được khi nó tương tác với một dòng sinh lý tương ứng của kí sinh. Tuy nhiên, tương quan này chỉ phù hợp trong trường hợp các kí sinh có tính chuyên biệt cao hoặc kí sinh bắt buộc và không áp dụng được với các kí sinh không chuyên tính.

Cơ sở của khái niệm này là khi mầm bệnh xâm nhập vào cây trồng thì lập tức phát tán vật chất của chúng (protein, cacbonhydrate...) hay còn gọi là elicitor vào trong thực vật. Những elicitor này được kiểm soát một cách trực tiếp hoặc gián tiếp bởi các gene không độc trong tác nhân gây bệnh (avr). Người ta cho rằng các gene kháng (gene R) sẽ mã hóa các thụ thể - receptor đối với từng elicitor riêng biệt (Staskawicz và cs. 1995). Khi elicitor tương tác với receptor sẽ kích hoạt hệ thống phòng thủ của thực vật bằng việc tạo nên những tín hiệu nhận biết khởi đầu. Những tín hiệu này tiếp theo đó đã kích hoạt một chuỗi các tín hiệu khác trong cây (signal

transduction cascade). Tín hiệu được nhận từ receptor sẽ được thể hiện ở dạng chuyển năng lượng. Một gốc phosphate từ phân tử cho sẽ chuyển sang phân tử nhận. Cứ thế, tín hiệu tiếp tục di chuyển từ màng tế bào vào tận bên trong tế bào chất. Hiện tượng này còn được gọi là phản ứng phosphoryl hóa, cung cấp năng lượng cho quá trình truyền tín hiệu di truyền (B.C Bửu và N.T Lang 2000), dẫn đến một loạt các phản ứng sinh lý, sinh hóa được kích hoạt trong tế bào cây. Những phản ứng này bao gồm: tạo các nguyên tử oxy hoạt hóa hay làm hoạt động một loạt gene trong hệ thống bảo vệ. Những gene trong hệ thống bảo vệ gồm những gene mã hóa cho các hợp phần của vách tế bào, enzyme thủy phân và những gene liên quan đến việc sản xuất những sản phẩm thứ cấp có hoạt tính diệt nấm và vi khuẩn (phytoalexin, prohibitin). Hoạt động của những nguyên tử oxy hoạt hóa và các gene trong hệ thống bảo vệ dẫn đến việc tạo thành phản ứng siêu nhạy cảm (hypersensitive resistance reaction - HR). Hệ thống HR được biết là hiện tượng tự hy sinh của những tế bào xung quanh vị trí bị xâm nhiễm của tác nhân gây bệnh dẫn đến sự hạn chế, ngăn chặn sự phát triển, lây lan của mầm bệnh (Keen, 1990).



Hình 2.7. Cơ chế kích hoạt tính kháng bệnh ở thực vật

2.3.6. Chức năng và cấu trúc gene kháng

2.3.6.1. Khái niệm về họ gen

Một họ gene là một tập hợp các gene có sự tương đồng với nhau về cấu trúc và các motif trình tự. Các gene này thường có nguồn gốc tiến hoá từ một gene tổ tiên

và hiện diện ở nhiều loài khác nhau mã hoá cho những protein có quan hệ về chức năng. Sự tương đồng của các protein trong cùng một họ đảm bảo cho chúng thực hiện cùng một chức năng trong một cơ chế chung. Tuy nhiên, mỗi thành viên đều có một sự chuyên biệt để phù hợp với đặc tính của loài, giống và từng cá thể. Sự khác biệt giữa các thành viên có thể được sinh ra dưới tác dụng của tiến hoá (đột biến) hay áp lực chọn lọc (stress, sự tấn công của mầm bệnh...).

Đôi khi, thuật ngữ họ gene có thể được sử dụng để chỉ tập hợp những protein được mã hoá bởi những gene trong cùng một họ. Để kiểm tra sự tiến hoá của các gene trong cùng một họ người ta thường sử dụng các kỹ thuật khảo sát hệ thống phát sinh loài.

Một số họ gene tiêu biểu: Homeobox (Hox gene family); gene mã hoá cho các protein trong hệ thống miễn dịch; MHC (Major histocompatibility complex).

Một số họ protein: Myosin; Kinesin; Dynein; các protein truyền tín hiệu; G-protein; receptor tyrosine kinase.

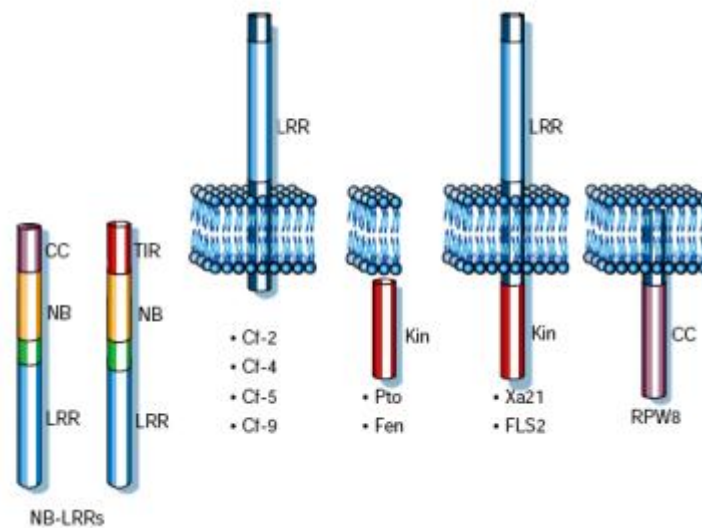
2.3.6.2. Các họ gene kháng

Nhiều năm qua, trên cơ sở những nguyên tắc của sinh học phân tử, người ta đã thành công trong việc nghiên cứu và clone hóa những gene kháng bệnh hại chính trên nhiều loài thực vật (Staskawicz và cs. 1995, Baker và cs. 1997). Phân tích chuỗi ký tự protein được dự đoán là sản phẩm của gene kháng, người ta thấy rằng chúng có những domain cấu trúc rất giống nhau, bao gồm: Leucine rich repeat - LRR, nucleotide binding site - NBS, ser/thr protein kinase - KIN, domain coiled coil - CC, domain thụ thể của Toll và interleukin – TIR. Những cấu trúc này có thể đứng đơn lẻ hoặc phối hợp lại để hình thành những tổ hợp định vị ở nhiều vị trí trong tế bào. Sự tổ hợp này thuận lợi cho tương tác giữa các protein hay cụ thể hơn là giữa gene kháng với gene avr của mầm bệnh cũng như những phân tử downstream trong con đường truyền tín hiệu.

Dựa trên những đặc điểm về cấu trúc, các tổ hợp gene kháng được chia làm 5 họ chính thể hiện qua Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các họ gene kháng chính

STT	Cấu trúc	Mầm bệnh	Loài tiêu biểu	Gene
1	Enzyme giải độc HC - toxin reductase	<i>Helminthosporium maydis</i>	Bắp	Hm1
2	Ser/thr kinase nội bào	<i>Pseudomonas syringae</i> (avr Pto)	Cà chua	Pto
3a	CC/NBS/LRR	<i>Pseudomonas syringae</i> (avr Rpt2)	<i>Arabidopsis</i>	RPS2
		<i>Pseudomonas syringae</i> (avrR pm1/avrB)	<i>Arabidopsis</i>	RPM1
3b	TIR/NBS/LRR	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Thuốc lá	N
		<i>Melampsora lini</i>	Flax	L6
		<i>Peronospora parasitica</i>	<i>Arabidopsis</i>	RPP5
4	LRR ngoại bào	<i>Cladosporium fulvum</i>	Cà chua	Cf-2 Cf-4 Cf-5 Cf-9
5	LRR ngoại bào/kinase domain	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Lúa	Xa21



Hình 2.8. Một số domain kháng, sự tổ hợp và phân bố của chúng trong tế bào.

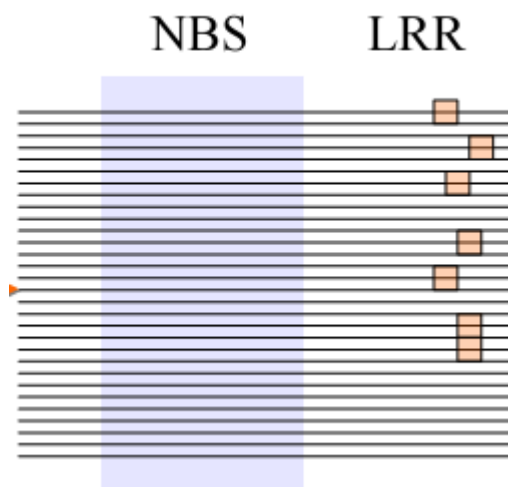
2.3.6.3. Họ gene NBS-LRR

Trong những họ gene kháng chính, NBS-LRR là tổ hợp phổ biến nhất trong genome của nhiều loài thực vật. Chẳng hạn, loài *Arabidopsis* có 163 gene, lúa có hơn 600 gene NBS-LRR (vander Linden và cs. 2004).

Trong tổ hợp NBS-LRR, NBS là cấu trúc có độ bảo tồn cao, chịu trách nhiệm chính trong việc tương tác với ATP hoặc GTP trên con đường truyền tín hiệu. NBS cũng là cấu trúc có chức năng chính trong sản phẩm của gene kháng (Walker và cs. 1982; Sarasteet và cs. 1990).

Ngược lại với NBS, LRR là cấu trúc có độ biến dị cao và có tính đáp ứng với hiện tượng chuyên tính. Nói một cách khác, đó là vùng ghi nhận pathogen một khi nó xâm nhập và là nguồn gốc của sự tiến hóa có tính chất thích nghi về tính kháng bệnh (Wang và cs. 1998a).

Tương quan về sự bảo tồn và biến dị của tổ hợp NBS-LRR còn được thể hiện qua Hình 2.13.



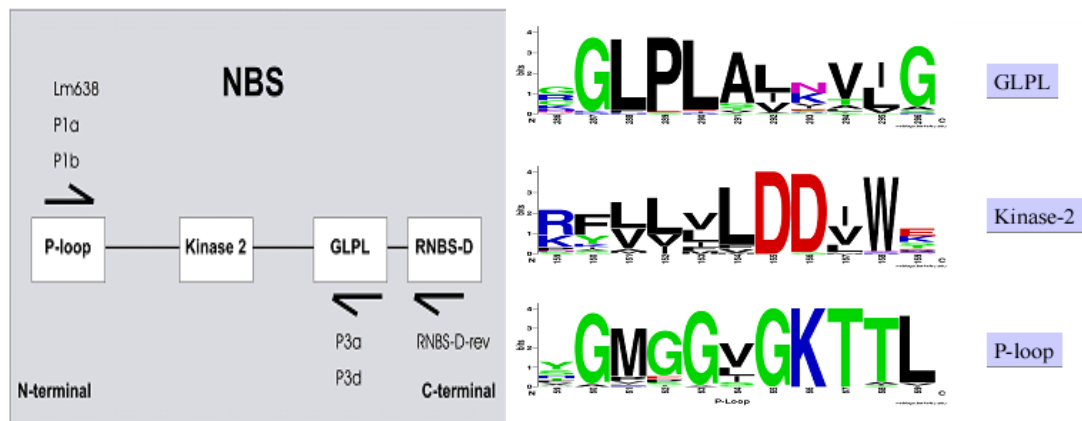
Hình 2.9. Tương quan về sự bảo tồn và biến dị của cấu trúc NBS-LRR.

Họ gene NBS-LRR được phân thành 2 lớp:

TIR/NBS/LRR: chứa domain TIR (Toll interleukin receptor) ở vùng upstream. Lớp này bao gồm các gene: N (thuốc lá), L6 (lanh), RPP5 (*Arabidopsis thaliana*) (Whitham và cs. 1994; Lawrence và cs. 1995; Anderson và cs. 1997; Parker và cs.1997).

CC/NBS/LRR chứa domain CC (coiled – coil domain) cũng ở vùng upstream. Lớp này bao gồm các gene: RPM1 (*Arabidopsis thaliana*), Dm3 (lettuce), Rx1 và Gpa2 (khoai tây), Prf và Mi (cà chua) (Salmeron và cs. 1996; Bent và cs. 1997; Botella và cs. 1998; Meyers và cs. 1998; Milligan và cs. 1998; van der Vossen và cs. 2000).

Vùng NBS chứa những motif phổ biến có độ bảo tồn cao như P loop (phosphate - binding domain), kinase-2, và GLPL (Saraste và cs. 1990; Traut 1994; Meyers và cs. 1999). Những motif này đã được sử dụng rộng rãi để phân lập các đoạn NBS nhiều loài khác nhau. Chủ yếu bằng cách khuếch đại trình tự giữa hai motif bảo tồn (Aarts và cs. 1998; Collins và cs. 1998; Leister và cs. 1998; Shen và cs. 1998; Mago và cs. 1999; Deng và cs. 2000; Noir và cs. 2001 Vicente và King 2001).



Hình 2.10. Sự phân bố và bảo tồn của các motif trong vùng

2.4. Phương pháp PCR thoái hoá trong nghiên cứu tính kháng thực vật

2.4.1. Một số chiến lược nghiên cứu tính kháng thực vật

Xem xét giá trị thích nghi của pathogen đối với gene kháng chuyên tính

Chiến lược này có thể thực hiện bằng phương pháp gây đột biến gene avr của pathogen chuyên tính. Giá trị đột biến được xác định bằng khả năng gây bệnh trên ký chủ, sau đó được so sánh với dòng nguyên thủy. Trong trường hợp sự khác biệt là có giá trị, áp dụng phương pháp DNA fingerprinting để nghiên cứu mức độ tiến hoá của các nòi trước và sau khi thích ứng với một tổ hợp gene kháng nào đó.

Chiến lược MAS và lập bản đồ QLT

Tính kháng số lượng từ lâu được xem như một loại hình lý tưởng cho tính kháng ổn định do bản chất không chuyên tính nòi của nó. Mặt khác, do những gene kháng chính có ảnh hưởng che khuất, nên rất khó khăn trong việc chọn lọc tính kháng số lượng. Do đó, lý thuyết về chọn giống nhờ marker phân tử (MAS - marker assisted selection) có thể được áp dụng để kết hợp gene đơn có tính kháng mạnh với gene số lượng không chuyên tính nòi. Tuy nhiên, vấn đề chung nhất của bản đồ QLT là hầu hết những marker gắn với QLT còn cách biệt quá xa với nhau, chưa đủ sức dự đoán chính xác cho một chương trình chọn lọc giống hiệu quả.

Áp dụng phân tử đánh dấu EST

Những đoạn phân tử đánh dấu EST (expressed sequence tag) về phản ứng tự vệ của cây khi gặp stress được phát hiện ngày càng nhiều. Nhiều EST được lập bản đồ trên những vùng của nhiễm sắc thể định vị cho những gene kháng bệnh đã biết. Như vậy, người ta có thể chuyển từ việc sử dụng các marker có tính chất ngẫu nhiên sang việc xác định các gene mục tiêu cho kỹ thuật QLT mapping. Phương pháp này đã được áp dụng khá thành công trong việc lập bản đồ gene kháng sâu đục quả bắp và trên một số đối tượng cây trồng khác.

Hiện nay, một số công nghệ mới như DNA chip cũng đã được sử dụng nhằm tăng khả năng khám phá chức năng gene ứng cử viên thông qua phân tích kiểu hình, kiểu gene đột biến và bố mẹ. Mặt khác, việc tạo ra những đột biến với những khiếm khuyết trong hệ thống gene kháng sẽ cho ta đánh giá được chức năng và giá trị cụ thể của từng gene. Tuy nhiên, các phương pháp này khá đắt và đòi hỏi phải có một cơ sở dữ liệu lớn về genome của đối tượng cần nghiên cứu.

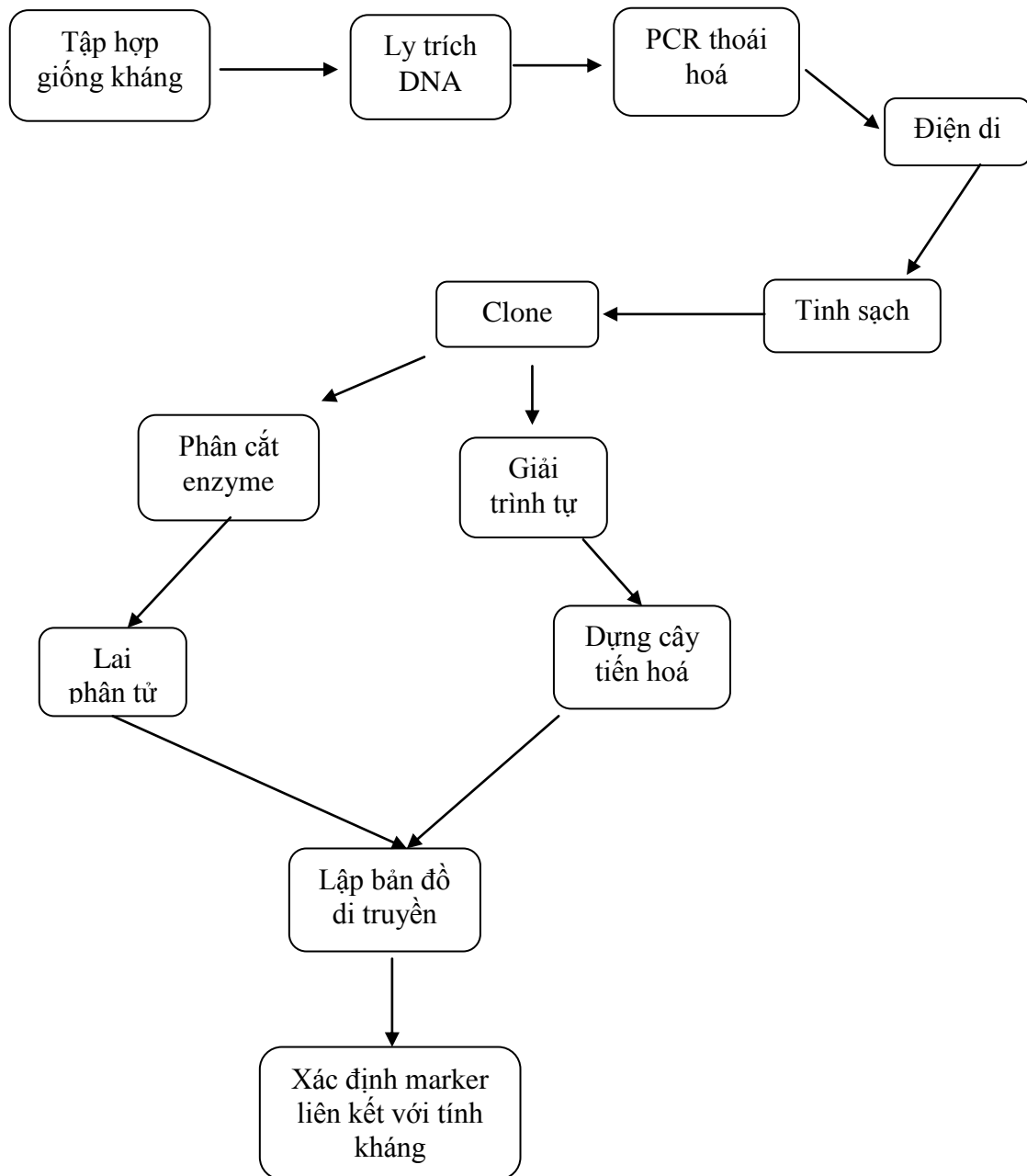
2.4.2. Sơ lược về quá trình sử dụng phương pháp PCR thoái hoá

Năm 1990, Compton đã sử dụng các oligonucleotide có chiều dài 14 nucleotide có khoảng 4 - 5 điểm thoái hoá như những primer xuôi và ngược trong phản ứng khuếch đại in vitro (PCR) đối với gene mã hoá glycoprotein B (gB) từ các loài *herpesvirus* có quan hệ họ hàng với nhau.

Theo đó, một chiến lược được đưa ra để định vị và phân lập những gene liên quan đến tính kháng là sử dụng kỹ thuật khuếch đại *in vitro* (PCR) với primer thoái hoá được thiết kế dựa trên những motif bảo tồn của các gene kháng đã biết, đặc biệt là vùng NBS. Những trình tự sau khi clone được sử dụng cho các phân tích tiếp theo với mục đích phát hiện những marker chuyên biệt cho tính kháng của từng loài. Mặt khác, việc phân tích trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu các loại gene kháng cho phép đánh giá được độ đa dạng di truyền cũng như sự tiến hoá của gene kháng trên đối tượng thực vật nghiên cứu. Các marker kháng còn rất hữu ích trong việc lập bản đồ những loci liên quan đến tính kháng và bổ sung thêm marker cho bản đồ di truyền. Chiến lược này đã được áp dụng khá hiệu quả và đã đạt được nhiều kết quả trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau:

Yu và cs. (1996) đã thiết kế những cặp primer trên cơ sở vùng NBS của gene kháng N và RPS2 để khuếch đại nhiều lần thể orthologs (thể tương đồng chính thống) của gene này trong đậu nành. Tác giả đã thu được 11 lớp (class) của chuỗi mã di truyền, đại diện cho một họ NBS. Trong số đó, 5 lớp đã được lập bản đồ gene kháng bệnh gây ra bởi *polyvirus* trên đậu nành.

Áp dụng phương pháp tương tự, Kanazin và cs. (1996) đã xác định được 9 lớp analog của gene kháng và lập bản đồ nhiều lớp định vị bên những gene kháng đã được biết trước đó ở đậu nành. Leister và cs. (1996) đã xác định được loci của những gene kháng ứng với gene Gro1 (kháng tuyến trùng) và R7 (kháng bệnh héo rũ) trên khoai tây. Các tác giả trên đã sử dụng một quy trình gần như tương tự. (xem Hình 2.11)



Hình 2.11. Tiến trình nghiên cứu tính kháng thực vật có sử dụng phương pháp PCR thoái hoá.

2.4.3. Thiết kế primer thoái hoá

Phương pháp PCR với primer thoái hoá về nguyên tắc thì gần như là tương tự với PCR truyền thống duy chỉ có một khác biệt chính. Đó là thay vì sử dụng primer chuyên biệt cho một trình tự đã biết, người ta sử dụng hỗn hợp primer. Hỗn hợp này

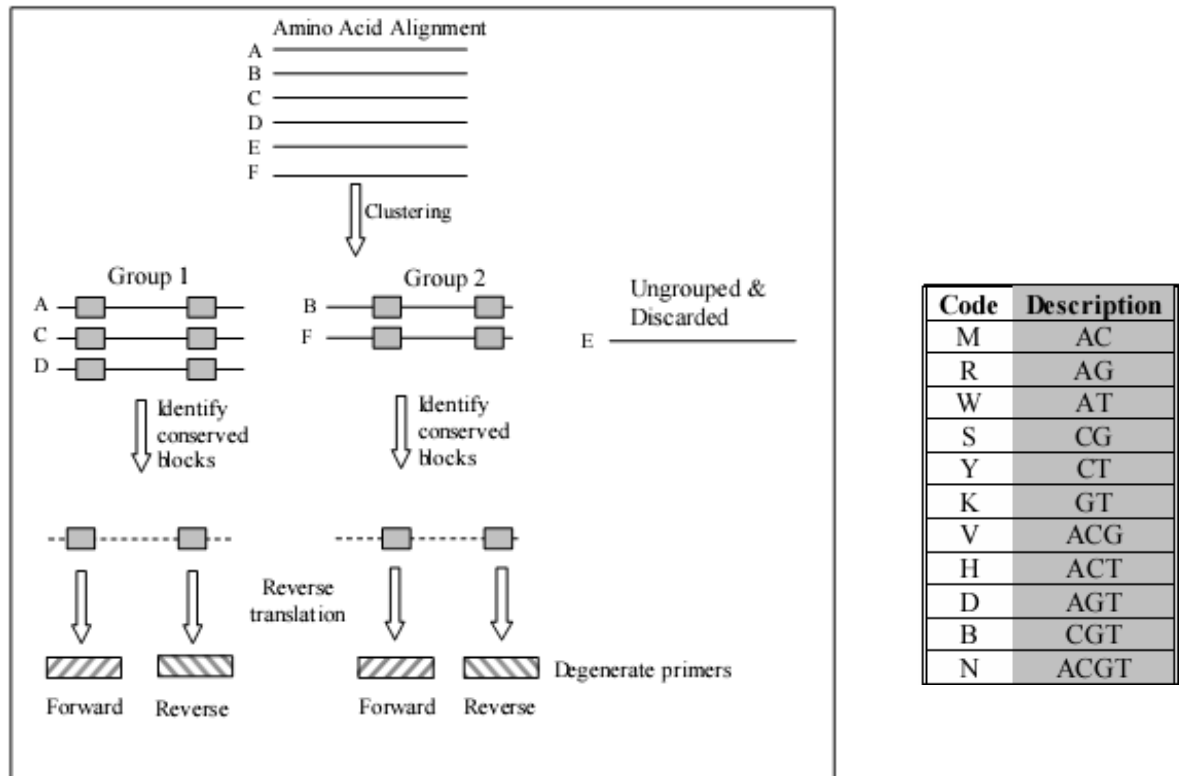
được tạo ra trong quá trình tổng hợp oligonucleotide một trình tự DNA thoái hoá. Một trình tự DNA được gọi là thoái hóa nếu một hoặc nhiều vị trí có thể được thay thế bằng một hoặc vài loại nucleotide khác.

Thiết kế primer cho phản ứng PCR thoái hoá là một bước rất quan trọng đảm bảo cho sự thành công của thí nghiệm và cần phải được thực hiện một cách thận trọng. Vì hầu hết các protein trong cùng một họ đều có cấu trúc khá tương đồng nên bằng việc sắp giống cột và phân tích cho phép phát hiện ra và sử dụng những motif bảo tồn để làm cơ sở cho việc thiết kế primer thoái hoá.

Việc thiết kế một primer bao gồm các bước:

- Sắp giống cột (align) trình tự gene hoặc protein (hoặc cả hai).
- Xác định ít nhất hai vùng bảo tồn trên chuỗi trình tự đã giống cột với điều kiện trình tự mục tiêu phải nằm giữa hai trình tự này.
- Bước cuối cùng là tìm cặp primer thỏa mãn các thuộc tính như nhiệt độ bắt cặp, hàm lượng GC, đầu dính (vùng 3') bắt cặp chính xác, độ thoái hóa thấp và khoảng cách hợp lý giữa hai vùng bảo tồn.

Thông thường, primer thoái hóa được thiết kế dựa trên các phần mềm như: geneFisher, CODEHOP, HYDEN, DePiCt...



Hình 2.12. Sơ đồ các bước thiết kế primer thoái hoá và bảng mã các nucleotide thoái hoá.

Ví dụ: Primer sau được thiết kế dựa trên một motif protein bảo tồn:

Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
5' TGG GAY ACN GCN GGN CAR GA 3'

Trong đó: Y = C hoặc T, R = G hoặc A, N = G, A, T hoặc C.

Tính tổ hợp ta sẽ có: $2(Y) \times 4(N) \times 4(N) \times 4(N) \times 2(R) = 256$ trình tự khác nhau trong một hỗn hợp primer. Và 256 cũng chính là độ thoái hoá của primer vừa thiết kế. Phương pháp tổng hợp primer thoái hoá đơn giản hơn, nhanh hơn và tiết kiệm hơn so với việc tổng hợp 256 primer riêng rẽ sau đó phối trộn lại.

* Những lưu ý trong việc thiết kế primer thoái hoá và PCR thoái hoá:

- Nếu đoạn amino acid bảo tồn được dùng để thiết kế primer chủ yếu là Ser, Arg và Leu thì primer thiết kế được sẽ có độ thoái hoá rất cao dẫn đến PCR không hiệu quả.

- Cũng có trường hợp gene đang tìm kiếm không tồn tại trong genome sinh vật được chọn. Ví dụ như domain TIR không tồn tại trong cây một lá mầm.
- Tránh việc thiết kế vùng 3' có độ thoái hoá cao, tốt nhất là nên sử dụng các codon không thoái hoá ở vùng 3' để cho sự bắt cặp hoàn hảo nhất.

Trong những ngày đầu tiên mới xuất hiện, phương pháp PCR thoái hoá cũng khuếch đại thành công với độ thoái hoá của primer trên 1000 lần. Tuy nhiên, những báo cáo như vậy là không nhiều. Trong khi những công bố gần đây cho thấy primer thoái hoá với độ thoái hoá từ 100 lần trở lại cho kết quả tốt. Có 5 phương pháp nhằm giảm độ thoái hoá trong việc thiết kế primer như sau:

- Chọn motif phù hợp để thiết kế primer

Motif được chọn để thiết kế primer phải là sự cân nhắc giữa những codon có độ bảo tồn cao nhất hoặc những codon có độ bảo tồn thấp hơn nhưng đáp ứng được yêu cầu về độ thoái hoá tổng thể.

- Sử dụng inosine như một base trung hòa.

Inosine là một purine xuất hiện trong thành phần tự nhiên của tRNA và có khả năng bắt cặp với cytidine, thymidine, and adenosine (mặc dù sự bắt cặp giữa inosine và adenosine là không chặt lăm trong cấu trúc DNA mạch kép). Gần đây, người ta có xu hướng sử dụng inosine ở những vị trí đòi hỏi có sự thay thế của cả 4 base. Do khi sử dụng inosine, độ thoái hoá sẽ giảm xuống, tuy nhiên, mismatch I:G sẽ tăng lên.

- Tổng hợp nhiều hỗn hợp oligo ở tại một vị trí

Một nỗ lực để sử dụng những primer có độ thoái hoá thấp là trên cùng một tổ hợp codon, tiến hành tổng hợp hai hay nhiều hỗn hợp primer thay vì chỉ tổng hợp một hỗn hợp chứa tất cả các codon. Mỗi hỗn hợp sau đó sẽ được sử dụng riêng rẽ trong phản ứng PCR.

- Chọn những codon đặc biệt ở đầu primer 3'

Nhiều codon mã hoá cho một amino acid hay một nhóm các amino acid tương đồng nhau thì thường giống nhau ở vị trí nucleotide đầu tiên hoặc thứ 2 và khác

nhau ở vị trí nucleotide thứ ba. Do đó, primer thiết kế sẽ có độ thoái hoá thấp hơn nếu loại bỏ hần nucleotide này của codon cuối cùng ở đầu 3'.

- Sử dụng những codon phổ biến cho sinh vật mục tiêu

Trong mỗi sinh vật, không phải tất cả codon mã hoá cho một amino acid đều hiện diện với xác suất ngang nhau trong genome. Thực tế có một vài codon sẽ chiếm ưu thế so với các codon cùng loại và xuất hiện nhiều hơn. Do đó, theo lý thuyết, có thể làm giảm độ thoái hoá của hỗn hợp primer bằng cách chỉ sử dụng những codon này cho sinh vật đang nghiên cứu.

2.4.4. Những khuyết điểm của phương pháp

Tuy có rất nhiều ưu điểm, nhưng phương pháp PCR thoái hoá trong xác định và phân lập gene kháng còn tùy thuộc vào tính chất giống nhau giữa các trình tự gene kháng. Hiện nay, vẫn chưa có ước đoán chính xác nào về tỉ lệ gene kháng có motif bảo tồn. Nhiều câu hỏi đang được đặt ra: Liệu rằng chúng ta có mất nhiều gene kháng khi chỉ sử dụng đơn điệu phương pháp này hay không? Có khác biệt cơ bản giữa gene kháng trội và gene kháng lặn hay không?

Hạn chế của phương pháp này còn thể hiện qua việc rất khó xác định chức năng của gene mục tiêu, cho dù chúng được phân lập bản đồ tại vùng có nhiều gene kháng đã biết vì những gene có vùng bảo tồn giống nhau có thể hoàn toàn khác nhau về chức năng sinh học trong tế bào thực vật. (trích dẫn bởi Bùi Chí Bửu. 2002).

2.5. Ly trích DNA thực vật

Hầu hết các nghiên cứu và ứng dụng sinh học phân tử đều có xuất phát điểm bằng việc thu nhận một lượng nucleic acid lớn và sạch để tiến hành các thí nghiệm kế tiếp. Các kỹ thuật tách chiết nucleic acid phải đảm bảo thu nhận các phân tử này ở trạng thái nguyên vẹn không bị phân hủy bởi các tác nhân cơ hay hóa học. Một quy trình ly trích DNA ở tế bào thực vật gồm 3 bước cơ bản:

Bước 1: Phá vỡ màng tế bào, màng nhân, giải phóng DNA

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

Bước 3: Tủa DNA.

Thông thường, cần phải tiến hành nhiều quy trình với nhiều thí nghiệm để có được quy trình ly trích nucleic acid ổn định, đáp ứng được về lượng và độ tinh sạch phù hợp với đối tượng nghiên cứu.

2.6. Định lượng DNA

Sau khi tinh sạch, để kiểm tra số lượng và chất lượng mẫu li trích người ta sử dụng một số phương pháp như: đo mật độ quang, siêu ly tâm, sắc kí, điện di... Trong đó, định lượng DNA bằng phân tử Mass dựa trên kỹ thuật điện di là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện nhất, có thể đáp ứng được việc phân tích mẫu cho các thí nghiệm kế tiếp một cách tương đối.

Phương pháp này dựa vào độ sáng của band cần định lượng so với band của phân tử Mass. Mẫu định lượng cần phải được pha loãng một lần, hai lần, ba lần, ..., n lần. Sau đó, các mẫu pha loãng được kiểm tra bằng điện di và được so sánh với phân tử Mass. Khi xác định được sự tương quan về kích thước và độ sáng giữa các band, từ đó, xác định được nồng độ của mẫu pha loãng. Với hệ số pha loãng có thể dễ dàng tính được nồng độ mẫu gốc.

Những hiểu biết về định lượng DNA bằng phân tử Mass sẽ là cơ sở cho việc định lượng, pha loãng mẫu sử dụng cho các phân tích tiếp theo trong nghiên cứu.

2.7. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Phương pháp PCR là phương pháp khuếch đại nhanh, nhiều các bản sao của đoạn DNA mục tiêu mà không cần phải qua tạo dòng. Phương pháp này được K. Mullis đưa ra năm 1985 và Saiki hoàn thiện năm 1988. Đây là phương pháp được thực hiện hoàn toàn trong ống nghiệm và trong một thời gian ngắn có thể thu rất nhiều bản sao DNA.

2.7.1. Nguyên tắc của phương pháp PCR

Nguyên tắc cơ bản của phương pháp PCR chủ yếu dựa trên khả năng nhân đôi, biến tính, và hồi tính theo nguyên tắc bán bảo tồn trong nhân bản DNA. Sự khuếch đại được thực hiện nhờ các chu trình nhiệt lặp lại cùng với sự hoạt động của DNA polymerase.

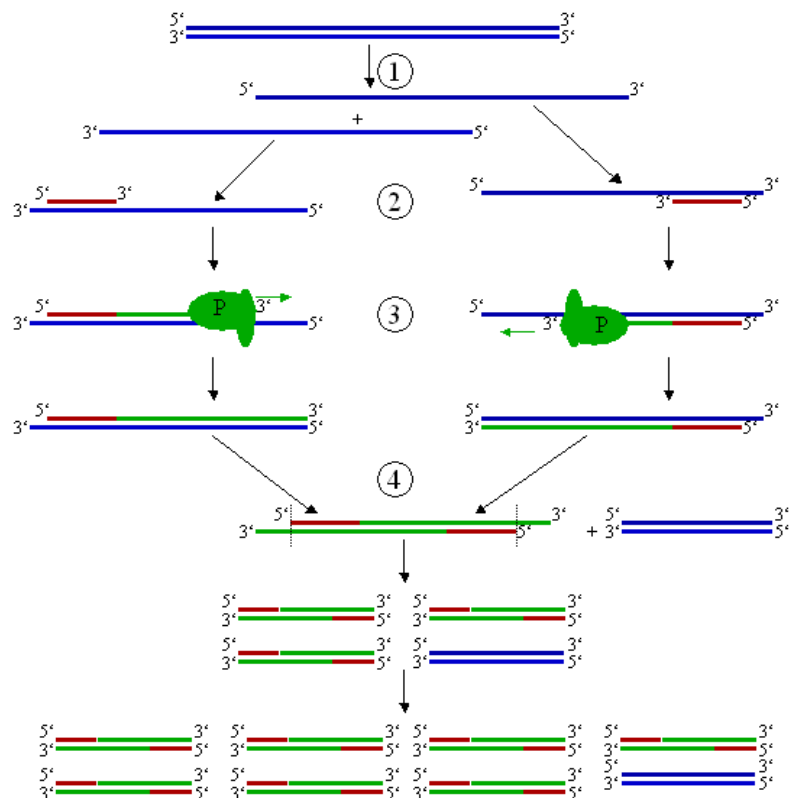
Phản ứng PCR gồm có nhiều chu kỳ, mỗi chu kỳ có 3 giai đoạn:

- Giai đoạn 1 (biến tính - denaturation): nhiệt độ được nâng lên 92 - 100°C. Ở nhiệt độ này, các mạch xoắn kép của DNA tách ra. Giai đoạn này kéo dài từ 30 giây đến 1 phút.

- Giai đoạn 2 (bắt cặp - hybridization): nhiệt độ được hạ nhanh xuống khoảng từ 50 – 60°C, phụ thuộc vào T_m của primer. Ở nhiệt độ này hai primer sẽ bắt cặp bổ sung với hai sợi DNA cùng theo hướng 5' – 3'. Giai đoạn này cũng kéo dài trong khoảng 30 giây đến 1 phút.

- Giai đoạn 3 (kéo dài - extension): nhiệt độ được nâng lên 68 - 72°C. Ở nhiệt độ này DNA - polymerase hoạt động để kéo dài các mạch DNA. Đoạn DNA nằm giữa 2 primer được tổng hợp.

Cứ sau 1 chu kỳ gồm 3 giai đoạn trên, từ 1 đoạn khuôn mẫu sẽ tạo ra được 2 đoạn DNA mới. Và cứ thế, sau mỗi lần lặp lại sẽ làm tăng gấp đôi lượng DNA mẫu của lần trước.



Hình 2.13. Quá trình của phản ứng PCR.

Chú thích: (1): biến tính; (2): bắt cặp; (3): kéo dài; (4): hoàn thành một chu kỳ; (P): DNA - polymerase.

2.7.2. Thành phần và các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR

2.7.2.1. DNA khuôn

DNA khuôn chứa trình tự cần khuếch đại có vai trò rất quan trọng, ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả PCR. Phản ứng PCR diễn ra tối ưu với các DNA khuôn hoàn toàn tinh sạch.

2.7.2.2. Dung dịch đệm (buffer)

Dung dịch đệm có tác dụng cung cấp lực ion cần thiết cho phản ứng xảy ra. Nồng độ các chất, pH của dung dịch đệm tùy thuộc vào nguồn enzyme DNA polymerase được dùng. Các thành phần của một dung dịch đệm điển hình gồm: KCl, gelatin và Tris - HCl (pH 8,5 ở nhiệt độ phòng).

2.7.2.3. MgCl₂

Nồng độ Mg²⁺ là yếu tố ảnh hưởng mạnh đến phản ứng PCR. Cụ thể, Mg²⁺ làm tăng hoạt động của DNA polymerase, tăng T_m của DNA. Nồng độ Mg²⁺ trong hỗn hợp phản ứng cuối cùng thường biến thiên trong khoảng từ 0,5 - 5 mM. Nồng độ MgCl₂ từ 1,5 – 2 mM thường được xem là tối ưu.

2.7.2.4. Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs)

Là nguyên liệu cần thiết cho phản ứng tổng hợp DNA. Hỗn hợp dNTP gồm 4 loại: dATP, dTTP, dCTP, dGTP và thường được sử dụng ở nồng độ 20 – 200 μM mỗi nucleotide. Điều quan trọng là phải giữ cho nồng độ của cả 4 loại dNTP bằng nhau vì sự mất cân bằng thành phần các nucleotide sẽ làm tăng lỗi sao chép của DNA polymerase.

2.7.2.5. Primer

Primer là một oligonucleotide thường có chiều dài từ 20 – 30 nucleotide. Đây là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả cũng như độ chuyên biệt của phản ứng PCR.

2.7.2.6. Taq – polymerase

Là một DNA polymerase chịu nhiệt, được tách chiết từ vi khuẩn suối nước nóng *Thermus aquaticus*. Taq - polymerase không bị phá hủy ở nhiệt độ biến tính của phản ứng PCR và hoạt động tối ưu ở 68 - 72°C.

Nồng độ enzyme *Taq* polymerase được sử dụng thông thường là 0,5 - 5 unit/100 μ l dung dịch phản ứng. Nếu nồng độ *Taq* quá cao có thể tạo ra những sản phẩm không chuyên biệt làm sai lệch kết quả. Nếu nồng độ *Taq* quá thấp, phản ứng sẽ không có đủ lượng enzyme cần thiết để tạo ra sản phẩm PCR theo mong muốn

2.7.2.7. Nhiệt độ bắt cặp

Phản ứng PCR rất nhạy cảm với nhiệt độ, đặc biệt là với nhiệt độ bắt cặp của môi. Vì thế bất cứ sự thay đổi nào của yếu tố này cũng có thể ảnh hưởng mạnh đến năng suất và độ chuyên biệt. Thông thường, số base của primer càng ít, nhiệt độ này càng thấp và ngược lại.

2.7.2.8. Số chu kỳ của phản ứng PCR

Số chu kỳ cho một phản ứng tùy thuộc vào số lượng bản sao ban đầu của mẫu. Ví dụ nếu lượng bản mẫu ban đầu là 10^5 thì cần 25 – 30 chu kỳ, nếu lượng bản mẫu là $10^2 - 10^3$ thì số lượng chu kỳ là 35 – 40.

2.8. Giới thiệu chung về đa dạng di truyền

Trong một loài, các giống khác nhau có trình tự bộ gene khác nhau. Trình tự bộ gene của các cá thể trong cùng một giống 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 giống. Sự khác biệt về di truyền như vậy được gọi là tính đa dạng di truyền.

Sự khác nhau về di truyền của các cá thể trong cùng một giống (hay giữa các giống trong cùng một loài) 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 giống), 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.

2.9. Phương pháp RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

2.9.1. Enzyme cắt giới hạn

Trong phân tích genome, restriction endonuclease (RE) là nhóm enzyme có nhiệm vụ cực kỳ quan trọng. Đó là nhóm của DNase, ghi nhận và cắt DNA tại vị trí chuyên biệt gọi là điểm giới hạn theo hai kiểu cắt khác nhau là cắt tạo đầu bằng và cắt tạo đầu so le. Hiện nay, đã có rất nhiều enzyme cắt giới hạn được phát hiện và được chia làm 3 loại:

Loại I: gồm các enzyme giới hạn nhận biết được trình tự đặc hiệu (vị trí giới hạn), di chuyển dọc theo DNA, đến cách vị trí giới hạn khoảng 1000 – 5000 nucleotide cắt tại đó và giải phóng khoảng vài chục nucleotide.

Loại II: gồm các enzyme giới hạn nhận biết vị trí giới hạn cắt ngay tại đó. Đây là loại thường được sử dụng nhất trong kỹ thuật gen và công nghệ DNA tái tổ hợp.

Loại III: gồm các enzyme giới hạn nhận biết vị trí giới hạn và cắt ở vị trí cách đó khoảng 20 nucleotide về phía trước.

Các RE có đặc tính cắt DNA không đặc hiệu loài, nghĩa là RE tách chiết từ vi khuẩn có thể cắt DNA của tế bào động vật, thực vật và vi khuẩn khác ở cùng vị trí giới hạn hay điểm giới hạn. Số lượng và kích thước đoạn cắt dài hay ngắn tùy thuộc vào số lượng điểm giới hạn trên phân tử DNA. Bản đồ trình tự các vị trí cắt bởi enzyme giới hạn gọi là bản đồ giới hạn. Mỗi loại enzyme giới hạn chỉ hoạt động tốt trong những điều kiện nhất định về nhiệt độ và dung dịch đệm thích hợp.

2.9.2. Nguyên tắc của phương pháp RFLP

Phương pháp RFLP – đa hình chiều dài các đoạn DNA cắt bởi các enzyme giới hạn (restriction enzyme), là phương pháp tạo nên các đoạn cắt khác nhau, phân biệt được bằng kỹ thuật điện di. Các đoạn cắt còn được gọi là các fingerprinting đặc trưng cho từng phân tử DNA. Xử lý các mẫu DNA bằng cùng một enzyme cắt giới hạn, các gen có cấu trúc khác nhau tạo nên số lượng đoạn cắt có chiều dài khác nhau, còn những gen có cấu trúc hoàn toàn giống nhau tạo nên các đoạn cắt giống nhau.

RFLP thường được sử dụng để nghiên cứu genome và cơ chất thường là DNA tổng số. Tuy nhiên, với mục đích phân biệt chỉ trên một vùng gene nào đó, người ta kết hợp cả hai phương pháp RFLP và PCR bằng cách phân cắt enzyme trực tiếp trên sản phẩm PCR trên vùng gene đó.

Quy trình phương pháp RFLP dựa trên PCR (phương pháp RFLP-PCR):

- Tách chiết DNA tổng số.
- Thực hiện phản ứng PCR để khuếch đại trình tự đích.
- Xử lý các sản phẩm PCR bằng enzyme cắt giới hạn.
- Phân tích trên gel các sản phẩm PCR đã được cắt.

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Nội dung, địa điểm và thời gian nghiên cứu

3.1.1. Nội dung

Khoá luận được thực hiện với 3 nội dung sau:

Nội dung 1: Lây nhiễm bệnh héo đờ đầu lá cho dứa Cayenne.

Nội dung 2: Phân lập vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập.

Nội dung 3: Phân tích RFLP vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập.

3.1.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Đề tài được thực hiện từ tháng 01/2007 đến tháng 09/2007 tại Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh Học và Môi Trường và Trại thực nghiệm bảo vệ thực vật, khoa Nông học Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.

3.2. Vật liệu

3.2.1. Vật liệu chủng bệnh

3.2.1.1. Mẫu thí nghiệm

Nguồn dứa nuôi cấy mô sạch bệnh được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ sinh học, 4 tháng tuổi, cao 15 cm, có 9 lá.

Nguồn dứa ngoài đồng được thu thập là những cây có và không có biểu hiện bệnh héo đờ đầu lá trên cả 3 giống Lâm Đồng, Thái Lan, Trung Quốc tại nông trường Phạm Văn Hai, xã Phạm Văn Hai, huyện Bình Chánh, Tp. Hồ Chí Minh.

3.2.1.2. Dụng cụ chủng bệnh

- Rệp sáp được cung cấp bởi Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa nông học.
- Bí đờ, mỗi trái nặng khoảng 2 kg.
- Thùng giấy.
- Đèn 5 W.
- Kéo.
- Cọ vẽ.
- Kính lúp.

- Cân phân tích 2 số.

3.2.2. Hoá chất và vật liệu dùng trong li trích DNA tổng số và PCR

3.2.2.1. Hoá chất

Hoá chất li trích DNA tổng số

- Nitơ lỏng.
- Dung dịch EB (extraction buffer):
 - CTAB 2% w/v.
 - NaCl 1,4 M.
 - Tris – HCl 100 mM pH 8.0.
 - EDTA 20 mM.
 - PVP 2%.
 - β – mercaptoethanol 0,1 % v/v.
- Dung dịch phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1).
- Isopropanol.
- Ethanol 70%.
- Dung dịch TE:
 - Tris – HCl pH 8,0 10 mM.
 - EDTA 1 mM.

Hoá chất PCR

- Taq polymerase (Promega).
- Taq buffer (Promega).
- MgCl₂ (Promega).
- dNTP mix (Promega).
- Nước cất 2 lần, hấp khử trùng và chiếu UV.
- Primer (IDT, Invitrogen).

Hoá chất điện di

- Agarose (Bio-rad).
- Dung dịch TAE 0,5X.
- DNA ladder 100 – 3000 bp (Bio-rad).
- Loading dye 6X.
- Ethidium bromide.

3.2.2.2. Dụng cụ

- Chén sứ và chày giã (Đức, Trung Quốc).
- Eppendorf 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml (Mỹ, Italia).
- Cân phân tích 4 số (Ohaus - Mỹ).
- Máy hút và tủ cấy vô trùng (Anh).
- Pipette các loại (Bio-Rad, Biohit).
- Đầu típ các loại (Đức, Italia).
- Máy siêu ly tâm (Hettich –Đức).
- Máy luân nhiệt (Biorad, Eppendof).
- Bộ dụng cụ điện di (bồn điện di, khay, lược đổ gel) (Bio-Rad).
- Máy chụp Geldoc (Bio-rad).
- Lò Viba (Electrolux).
- Máy định ôn (MemMert –Đức).
- Tủ lạnh các loại (Sanyo –Nhật).
- Máy votex (Đức).
- Găng tay (Malaysia).
- Nồi hấp autoclave (Nhật)
- Tủ sấy.

3.3. Phương pháp nghiên cứu

3.3.1. Nội dung 1: Lây nhiễm bệnh héo đỏ đầu lá cho dứa Cayenne.

Tiến hành lây nhiễm bệnh héo đỏ đầu lá từ những cây đã biểu hiện triệu chứng bệnh rõ ràng sang cây dứa Cayenne sạch bệnh thông qua tác nhân lây truyền là rệp

sáp. Những cây có và không biểu hiện bệnh trên nguồn dứa được chủng và nguồn dứa ngoài đồng ở cả ba giống Lâm Đồng, Thái Lan, Trung Quốc được thu thập để tiến hành các thí nghiệm ở Nội dung 2.

3.3.1.1. Nuôi rệp

Bí mua về rửa sạch, để khô. Lựa chọn những con rệp sáp trưởng thành, cấy từ 30 - 50 con/quả, cân trọng lượng của rệp trước khi cấy. Đặt những quả bí đã cấy rệp vào thùng kín đã chuẩn bị (có lót giấy để hút nhựa chảy ra từ quả bí). Rệp sáp phát triển mạnh trong điều kiện ánh sáng yếu hoặc tối, ẩm độ từ 65 - 70%, nhiệt độ từ 25 - 28°C. Sử dụng máy điều hoà nhiệt độ để điều khiển ẩm độ và nhiệt độ như mong muốn, quạt thông gió để hạn chế sự xếp tầng của không khí và giúp không khí lưu thông dễ dàng.



Hình 3.1. Chuyển rệp lên bí

Tiến hành cân trọng lượng của rệp sáp đã phát triển trên quả bí định kỳ.

Khối lượng rệp được định lượng một cách tương đối trên bí bằng cách cân số rệp được quét từ 3 vị trí khác nhau trên quả bí. Lấy trung bình của 3 trọng lượng này nhân với tỷ số giữa diện tích của quả bí và trung bình diện tích của 3 vị trí quét rệp.

Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại trên 3 quả bí.

3.3.1.2. Lây nhiễm bệnh

Chuyển rệp lên dứa bệnh

Chọn những cây dứa có biểu hiện triệu chứng bệnh nhưng vẫn còn tươi đủ để hấp dẫn rệp. Rệp được chuyển lên dứa bệnh bằng hai cách:

- Chuyển rệp bằng đèn

Dùng ánh sáng từ đèn 5 W để dẫn dụ rệp tự di chuyển sang cây dứa bệnh. Cây dứa đã cắt bớt lá được đặt trong thùng giấy, phía dưới đèn. Bí đã có rệp phát triển được đặt xung quanh cây dứa. Thùng phải kín để đảm bảo ánh sáng phát ra từ đèn là duy nhất.



Hình 3.2. Chuyển rệp bằng đèn

- Chuyển rệp trực tiếp

Rệp được chuyển bằng cách quét trực tiếp lên dứa bệnh bằng cọ mềm.

Quan sát định kỳ để theo dõi mức độ di chuyển và phát triển của rệp trong một tuần.

Chuyển rệp lên dứa sạch bệnh.

- Trồng và chăm sóc dứa

Các cây được trồng thành luống, giống nhau về điều kiện sinh trưởng, trồng theo kiểu nanh sấu, cách nhau 0,4 m trên luống 12 m x 1,5 m x 0,2 m. Chăm sóc theo hướng dẫn của Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải.

- Chuyển rệp từ dứa bệnh lên dứa sạch bệnh

Dứa bệnh đã có rệp phát triển được cắt thành nhiều mảnh nhỏ (có rệp ở trên). Đặt các mảnh này lên cây dứa sạch bệnh ở vị trí gốc lá gần sát mặt đất. Sau khi thả rệp, định kỳ kiểm tra sự hiện diện và đếm số rệp trên dứa 2 tuần/lần.

3.3.1.3. Thu thập mẫu

Chọn những cây dứa biểu hiện bệnh và không biểu hiện bệnh wilt trên cả hai nguồn dứa Cayenne, cây cấy mô chủng bệnh và ngoài đồng (trên cả 3 giống).

Sau khi đã chọn mẫu, tiến hành lấy mẫu lá. Lấy khoảng 7 - 9 lá còn non hay 3 lá đã trưởng thành, không lấy lá đã già, cắt bỏ phần ngọn, lau sạch rồi cho vào túi nilon đã ghi đầy đủ thông tin về mẫu và giữ mát trong thùng đá. Sau đó, mẫu được đem giữ ở tủ -20°C tại Viện Công nghệ Sinh Học và Môi Trường thuộc Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

3.3.2. Nội dung 2: Phân lập vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập.

Những mẫu dứa thu thập trong Nội dung 1 sẽ được phân tích tại Phòng Công nghệ sinh học thực vật, Viện Nghiên cứu công nghệ sinh học và môi trường, ĐH Nông Lâm qua các kỹ thuật ly trích DNA tổng số và PCR thoái hoá.

3.3.2.1. Ly trích DNA tổng số

Lá dứa Cayenne từ các mẫu thu thập được cắt ra thành từng mảnh nhỏ. Phần lá được dùng để ly trích DNA không quá non cũng không quá già (phần cách gốc lá khoảng 3 cm). Quy trình ly trích DNA được thực hiện theo phương pháp của Doyle (1990) như sau:

Bước 1: Nghiền 0,5 g lá đã rửa sạch trong nitơ lỏng thành bột mịn.

Bước 2: Thêm vào 1 ml dung dịch CTAB đã đun nóng ở 65°C , vortex đều và đem ủ ở 65°C trong 1h.

Bước 3: Ly tâm 10 phút (5000 vòng/phút, 4°C), hút lấy dịch trong.

Bước 4: Thêm 500 μl phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1), lắc đều, li tâm 15 phút (11.000 vòng/phút 4°C), hút lấy dịch trong.

Bước 5: Thêm vào dung dịch isopropanol lạnh một lượng tương đương 2/3 thể tích dịch trong. Để tủa ở -20°C trong khoảng 1 h (nên để qua đêm).

Bước 6: Ly tâm 20 phút (5000 vòng/phút, 4°C).

Bước 7: Đổ bỏ dịch trong, thêm vào 400 μ l ethanol 70% lạnh.

Bước 7: Ly tâm 20 phút (5000 vòng/phút, 4°C).

Bước 8: Đổ bỏ dịch, làm khô tự nhiên trong 1 h.

Bước 9: Cho vào 30 μ l TE 1X, ủ ở 37°C trong 1 h. Bảo quản ở -20°C.

Mẫu DNA sau khi được ly trích được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose. Cách thức tiến hành như sau:

Pha gel agarose với nồng độ 1%: Cân 0,125 g agarose cho vào 12,5 ml dung dịch TAE 0,5X. Đun sôi bằng lò viba ở bước sóng 650 W cho đến khi agarose tan hoàn toàn. Để nguội đến khoảng 60°C.

Đổ gel vào khuôn đã cắm lược tạo giếng, chờ gel đông.

Cho gel vào bồn điện di chứa dung dịch TAE 0,5 X.

Bơm mẫu vào các giếng với tỷ lệ 1 μ l loading dye : 2 μ l DNA mẫu.

Chạy điện di ở điều kiện 100 V, 400 mA, thời gian 20 phút.

Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromide 10 mg/ml khoảng 15 phút, vớt ra, rửa lại nhiều lần với nước. Chụp ảnh kết quả điện di bằng máy Gel doc thông qua phần mềm Quantity One.

3.3.2.2. Pha loãng mẫu DNA tổng số

Sản phẩm ly trích DNA được định lượng sơ bộ bằng phương pháp định lượng theo phân tử Mass. Tuy nhiên, do không có phân tử Mass nên chúng tôi sử dụng DNA ladder với nồng độ 400 ng mỗi band nếu sử dụng 2 μ l cho mỗi giếng trên gel điện di theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Bio-rad).

Để định lượng, chúng tôi tiến hành điện di tất cả các mẫu ly trích (tỷ lệ mẫu : loading dye là 1 : 2) và DNA ladder (tỷ lệ ladder : loading dye là 2 : 2). Dựa vào quan sát và đánh giá, tiến hành pha loãng mẫu về hàm lượng phù hợp với phương pháp PCR thoái hoá.

3.3.2.3. Tối ưu phương pháp PCR thoái hoá

Theo khảo sát, phương pháp PCR chưa từng được áp dụng trên đối tượng là cây dứa, đặc biệt là dứa Cayenne. Vì vậy, một giải pháp được cho là có tính khả thi là sử dụng những cặp primer thoái hoá đã được thiết kế và chứng minh là cho hiệu quả

khuếch đại cao trên nhiều đối tượng cây trồng khác như đậu nành (Kanazin, 1996), chuối (Georgio), cây có múi (Z. Deng, 2000), khoai tây (Linden)...Chi tiết về các primer được chọn thể hiện qua Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Các primer thoái hoá sử dụng trong nghiên cứu

Tên primer	Trình tự	Motif	Ta (°C)	Độ thoái hoá	Sản phẩm (bp)	Tác giả
LM638	5'-GGIGGIGTIGGIAAIACIAC-3'	P-loop	50	0	500	Kanazin
LM637	5'-ARIGCTARIGGIARICC-3'	GLPL	50	8		
F11	5'-GGDGTDDGGNAARACWAC-3'	P-loop	50	144	500	Z. Deng
R11	5'-AGI GCHAGNGGNAGNCC-3'	GLPL	50	192		
R16	5'-AGNGCHAGNGGYAANCC-3'	GLPL	50	384		
TIR1	5'-GGTATGGGTGGTGTGGTAARACNACN-3'	TIR	66	32	300	Xitao Wei
TIR2	5'-GGTATGGGTGGTGTGGTAARACNACN-3'	TIR	67	32		

(I - inosine - một purine, xuất hiện trong cấu trúc tự nhiên của tRNA, có thể bắt cặp với cytidine, thymidine adenosine).

Tạo thành các cặp primer: (LM638, LM637), (F11, R11), (F11, R16), (TIR1, TIR2).

Thí nghiệm 1: Xác định điều kiện ban đầu cho phản ứng PCR

Thí nghiệm này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định thành phần phản ứng và chu trình nhiệt độ PCR thoái hoá cho sản phẩm trên gel điện di.

Cách tiến hành : Thực hiện theo quy trình của Z. Deng và cs (2000), thành phần hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt độ của Thí nghiệm 1 được trình bày trong Bảng 3.2. Thực hiện PCR với 4 cặp primer: (LM638, LM637); (F11, R11); (F11, R16); (TIR1, TIR2) trên mẫu cho kết quả li trích tốt nhất.

Kết quả PCR được kiểm tra trên gel agarose 2%, chạy điện di với tỉ lệ mẫu:loading dye là 5:2 ở điều kiện 50 V, 250 mA trong 70 phút.

Chỉ tiêu theo dõi: sự xuất hiện band điện di với kích thước khoảng 500 bp

Bảng 3.2. Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR theo Z. Deng và cs (2000).

Thành phần (25µl/ống)	Chu trình nhiệt
<i>Taq</i> buffer 1X	92°C – 2 phút.
MgCl ₂ 2 mM	Lặp lại 42 chu kỳ:
dNTPs 800 µM	92°C – 1 phút;
Primer 25 µM mỗi loại	50°C – 1 phút
DNA mẫu 150 ng	72°C – 2 phút.
<i>Taq</i> polymerase 1 unit	72°C – 5 phút.
Nước vừa đủ 25 µl.	Giữ 4°C.

Tối ưu các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR

Do kết quả PCR chịu ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố nên chúng tôi thực hiện việc tối ưu dựa trên nhiều chỉ tiêu và thông số để tìm kết quả tốt nhất. Phản ứng PCR được thực hiện trên mẫu li trích tốt nhất. Chỉ tiêu theo dõi là độ sáng và rõ của band kháng chính (khoảng 500 bp). Nghiệm thức tốt nhất của thí nghiệm trước được áp dụng cho thí nghiệm sau. Chi tiết các phản ứng tối ưu PCR thoái hoá được trình bày trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Một số chỉ tiêu và các mức tiến hành tối ưu phản ứng PCR thoái hoá

Tên thí nghiệm	Chỉ tiêu tối ưu	Các mức tiến hành
TN 2.1	Loại primer	(LM637, LM638), (F11, R11), (F11, R16), (TIR1, TIR2)
TN 2.2	Nồng độ primer	1, 2, 3 pm/µl
TN 2.3	Nồng độ dNTP	150, 200, 300 µM
TN 2.4	Nồng độ Mg ²⁺	1; 1,5; 2 mM
TN 2.5	Nồng độ <i>Taq</i> polymerase	0,5; 1; 1,5 unit/25µl
TN 2.6	Nhiệt độ bắt cặp	47, 50, 53°C
TN 2.7	Số chu kỳ	37, 40, 45

Chú thích: TN - Thí Nghiệm

3.3.2.4. Reampify sản phẩm PCR

Mục đích của thí nghiệm nhằm làm sạch hơn (giảm độ smear) sản phẩm PCR lần thứ nhất để sử dụng cho các phân tích tiếp theo.

Cách tiến hành: Sử dụng dung dịch sản phẩm PCR lần thứ nhất (2 μ l) với vai trò làm DNA khuôn mẫu cho phản ứng PCR thoái hoá theo quy trình đã tối ưu.

Chỉ tiêu theo dõi: độ sáng và rõ của band kháng chính trên gel điện di.

3.3.2.5. PCR thoái hoá trên các mô khác nhau

Mục đích của thí nghiệm là khảo sát khả năng nhân bản của phương pháp PCR thoái hoá vùng gene NBS trên các loại mô khác nhau.

Phương pháp tiến hành: ly trích và thực hiện phản ứng PCR trên 3 loại mô: rễ, thân và lá của cây dứa Cayenne không có biểu hiện của triệu chứng bệnh. Phương pháp ly trích và PCR được tiến hành theo quy trình đã tối ưu.

Chỉ tiêu theo dõi: độ sáng rõ của các band ở cả 3 mẫu: lá, thân và rễ.

3.3.2.6. PCR thoái hoá phân lập vùng NBS trên các mẫu dứa thu thập

Thực hiện phản ứng PCR thoái hoá trên 9 mẫu dứa Cayenne thu thập theo quy trình đã tối ưu.

Chỉ tiêu khảo sát: sự hiện diện của band kháng chính trên gel điện di của từng mẫu.

3.3.2.7. Giải trình tự sản phẩm PCR thoái hoá

Mục đích: phân tích tính nhạy cảm và không nhạy cảm với bệnh wilt của cây dứa Cayenne dựa vào sự khác biệt về trình tự DNA của vùng gene NBS.

Cách tiến hành: Lựa chọn 2 mẫu có biểu hiện triệu chứng nhiễm rõ đối với bệnh héo đỏ đầu lá và 2 mẫu không biểu hiện bệnh (dự tuyển cho tính kháng). Thực hiện ly trích, PCR thoái hoá và reamplify theo quy trình đã tối ưu. Kiểm tra độ sạch của sản phẩm reamplify bằng điện di và gửi mẫu giải trình tự tại Viện Pasteur, TP. Hồ Chí Minh.

3.3.3. Nội dung 3: Phân tích RFLP vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập.

Nội dung được tiến hành với mục đích khảo sát sự đa hình của sản phẩm PCR thoái hoá từ các mẫu dứa Cayenne thu thập. Kết quả của thí nghiệm sẽ là cơ sở cho việc xác định marker định vị trên vùng gene NBS.

Sản phẩm PCR thoái hoá được phân cắt bởi enzyme *Hind III*.

Phản ứng cắt được thực hiện như sau:

- Ủ khoảng 1 µg DNA đã được khuếch đại với 1 unit enzyme cắt theo điều kiện nhà sản xuất (Roche) hướng dẫn. Thành phần của phản ứng thể hiện trong Bảng 3.5.

- Những đoạn DNA đã cắt được phân tách bằng điện di trên gel agarose 0,8%, 140V trong 60 phút. Sau đó, gel được nhuộm ethidium bromide. Đọc kết quả và chụp hình dưới tia UV.

Bảng 3.4. Thành phần phản ứng enzyme cắt

Thành phần phản ứng	Nồng độ đầu	Thể tích
Buffer	10X	2,5 µl
DNA	100 – 150 ng	6 – 10 µl
Restriction enzyme	10 UI	0,1 µl
Nước cất vô trùng		Vừa đủ thể tích 25 µl

Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Nội dung 1: Lây nhiễm bệnh héo đở đầu lá cho dứa Cayenne.

4.1.1. Nuôi rệp

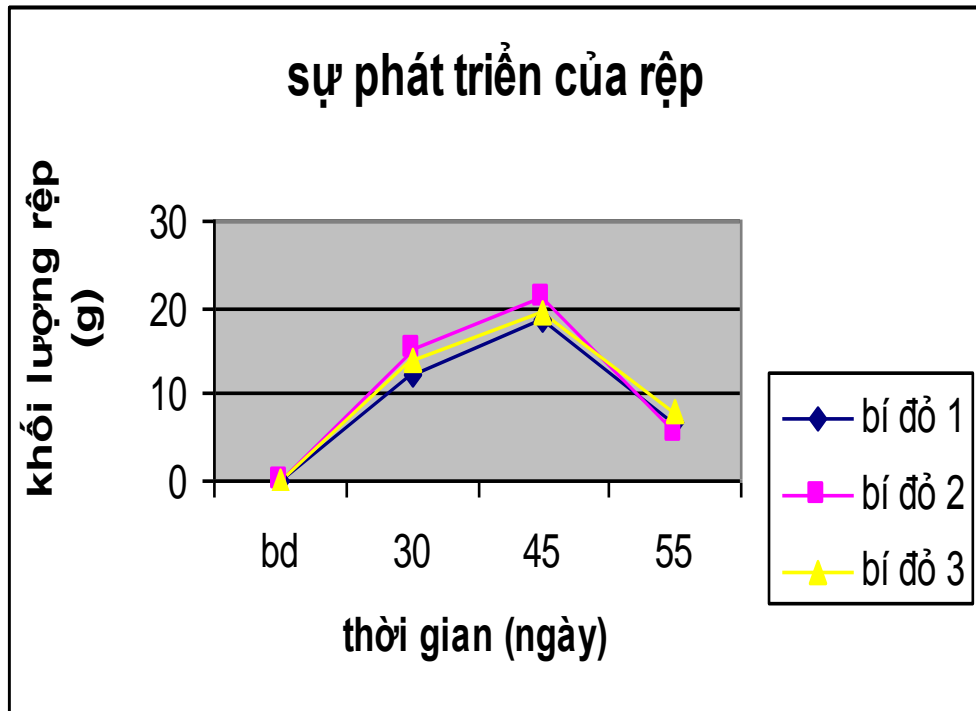
Kết quả nuôi rệp thể hiện qua Bảng 4.1.

Bảng 4.1. Kết quả nuôi rệp

STT	KL bắt đầu cấy		KL rệp sau 30 ngày	KL rệp sau 45 ngày	KL rệp sau 55 ngày
	KL Bí	KL Rệp			
1	506g	0,15g	12,2g	18,6g	6,7g
2	512g	0.15g	13,2g	18,2g	6,5g
3	612g	0.15g	14g	19,3g	8,2g

Chú thích: KL – khối lượng

Sự phát triển của rệp theo thời gian được thể hiện qua Biểu đồ 4.1 và Hình 4.1.



Biểu đồ 4.1. Sự phát triển của rệp theo thời gian



Hình 4.1. Sự phát triển của rệp trên bí đỏ sau 45 ngày.

Số lượng rệp có sự gia tăng đáng kể bắt đầu kể từ 2 tuần sau khi cấy. Số lượng rệp tăng mạnh nhất sau 6 tuần nuôi và bắt đầu suy giảm sau đó. Nguyên nhân vì bí nuôi rệp hư hoại dần do mức độ chích hút của rệp tăng lên cũng như nhiệt độ và độ ẩm cao (do sự hô hấp của bí) làm xuất hiện hiện tượng thối trái và nấm. Rệp tự điều chỉnh bằng cách phát triển dần lên cao, tránh xa phần dưới của quả bí đã bị ẩm, hư hoại.

Như vậy phương pháp nuôi rệp cho kết quả khá tốt và ổn định với hệ số nhân sau 6 tuần nuôi từ 124 – 129 lần, có thể ứng dụng để nhân sinh khối rệp phục vụ cho việc chủng bệnh.

4.1.2. Lây nhiễm bệnh

4.1.2.1. Chuyển rệp lên dứa bệnh

Chuyển rệp bằng đèn

Sau một tuần, chỉ có một số ít rệp di chuyển lên dứa, chủ yếu là rệp con, đa số rệp già không di chuyển. Ngoài ra có một số rệp tập trung trên đèn và chết. Nguyên nhân có thể do rệp không có khả năng di chuyển xa hoặc bí vẫn còn dinh dưỡng nên rệp không muốn di chuyển.

Chuyển rệp trực tiếp

Sau 7 ngày, rệp vẫn sống trên dứa tuy số lượng có giảm nhiều so với lúc ban đầu. Điều này có thể là do trong quá trình quét rệp bằng cọ, rệp bị tác động cơ học nên bị thương và chết. So với phương pháp chuyển rệp bằng đèn thì phương pháp

quét trực tiếp tuy lượng rệp hao hụt trong quá trình quét có nhiều nhưng phương pháp này nhanh hơn và rệp được chuyển qua dứa nhiều hơn.



Hình 4.2. Rệp phát triển trên dứa sau 7 ngày

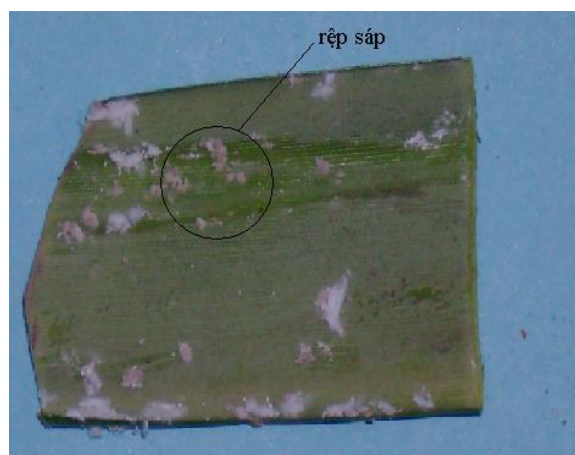
4.1.2.2. Chuyển rệp lên dứa sạch bệnh.

Trồng và chăm sóc dứa

Sau khi đem ra vườn trồng, nhìn chung, đa số các cây dứa đều thích nghi và sinh trưởng tốt ngoại trừ một số cây còn yếu không thích nghi được (sinh trưởng kém, chết) chiếm khoảng 8%.

Chuyển rệp từ dứa bệnh lên dứa sạch bệnh

Sau 1 tuần sống trên dứa bệnh, rệp hấp thu virus và được chuyển lên dứa sạch bệnh (xem Hình 4.3).



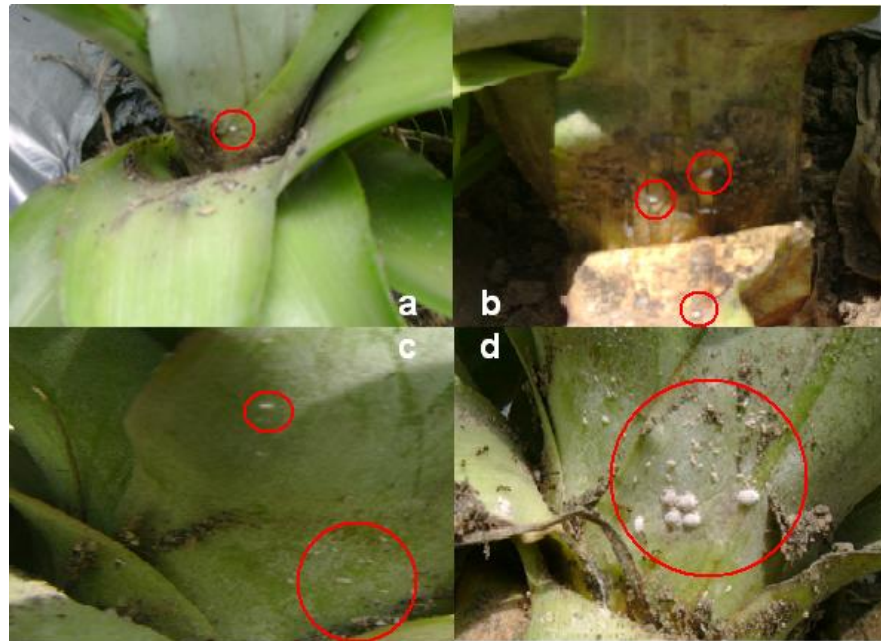
(a)



(b) (c)
Hình 4.3. Chuyển rệp lên dứa sạch bệnh.

(a) mảnh lá dứa có rệp, (b) và (c) chuyển rệp.

Sau khi thả rệp, định kỳ kiểm tra sự hiện diện và đếm số rệp trên dứa sau mỗi 2 tuần. Số lượng rệp giảm đi so với lúc chúng sau 2 tuần đầu tiên nhưng bắt đầu tăng lên từ tuần thứ 4. Có lẽ trong 2 tuần đầu rệp chưa thích nghi nên chết nhiều. Sau đó, rệp thích nghi dần và bắt đầu phát triển số lượng.



Hình 4.4. Rệp phát triển trên dứa sau khi chủng.

a: 2 tuần; b: 4 tuần; c: 6 tuần; d: 8 tuần

Do cây dứa 4 tháng tuổi chưa có biểu hiện bệnh héo đỏ đầu lá rõ rệt nên chúng tôi tiến hành chủng bệnh lần hai để đảm bảo sự truyền virus.

Sau khi chủng rệp 8 tháng (tính từ lần chủng rệp thứ nhất), cây biểu hiện triệu chứng như lá đỏ dần lên, kém trương nước, rìa lá cuộn về phía lưng, đầu lá cong xuống đất. Loại trừ các trường hợp cây biểu hiện triệu chứng tương tự nhưng không phải do bệnh, ước tính số cây biểu hiện bệnh là 107 cây chiếm tỷ lệ là 35,66%.



Hình 4.5. Dứa biểu hiện bệnh héo đỏ đầu lá sau khi chủng bệnh.

Như vậy sau khi tiến hành chủng virus PMWaV thông qua trung gian truyền bệnh là rệp sáp, chúng tôi đi đến kết luận: quá trình chủng rệp đã thành công với 35,66% cây dứa biểu hiện bệnh. Tuy nhiên, vẫn còn 64,34% số dứa không biểu hiện bệnh. Điều này có thể do dứa có khả năng chống chịu bệnh tốt hoặc do lượng rệp và virus chưa đủ để làm biểu hiện bệnh. Mặt khác, quá trình chủng bệnh được tiến hành cận mùa mưa. Do đó có thể bệnh biểu hiện nhưng không đủ mạnh để ghi nhận.

Song song với việc theo dõi sự tăng sinh của rệp, chúng tôi còn quan sát số lượng của kiến hiện diện trong vườn dứa. Kết quả nhận thấy rằng, những cây có biểu hiện triệu chứng bệnh thường xuất hiện thành từng cụm. Ở những cụm này, mức độ hiện diện và hoạt động của kiến (khoảng 30 con/cây) là cao so với các cụm khác. Mặt khác, do điều kiện mưa, không thuận lợi cho sự phát triển nên kiến không phân bố một cách đồng đều mà chỉ tập trung ở dưới những cây dứa có lá tương đối lớn.

4.1.3. Thu thập mẫu

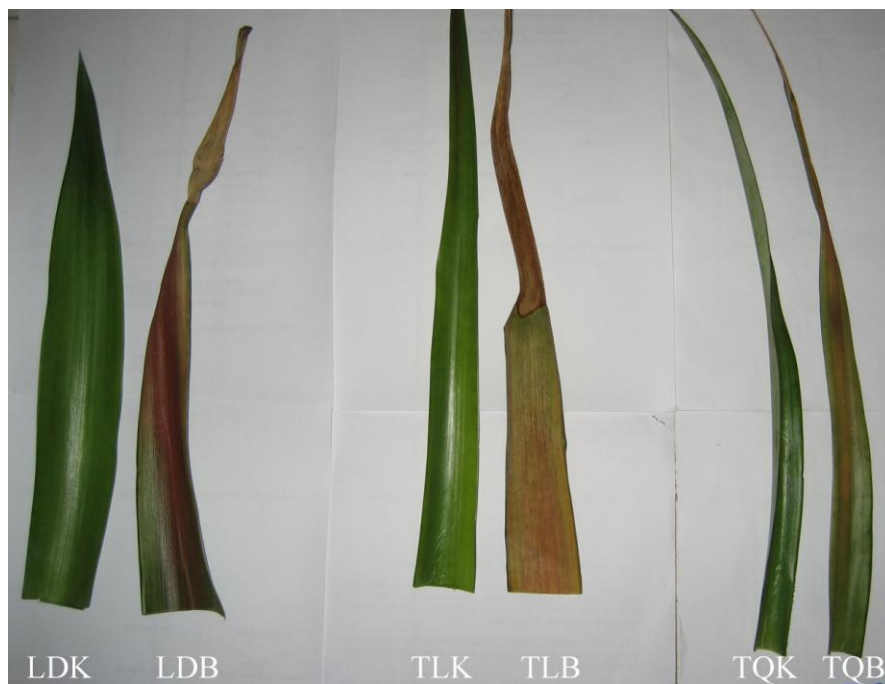
Các cây có biểu hiện triệu chứng bệnh rõ nhất và các cây không biểu hiện triệu chứng được chọn ra để tiến hành các phân tích kế tiếp.

Chi tiết về các mẫu thu thập thể hiện qua Bảng 4.2.

Bảng 4.2. Danh sách các mẫu thu thập

Nguồn dứa	Bệnh	Số lượng	Kí hiệu mẫu
Lâm Đồng	-	1	LĐK
	+	1	LĐB
Thái Lan	-	1	TLK
	+	1	TLB
Trung Quốc	-	1	TQK
	+	1	TQB
Cây cấy mô	-	2	CMK1, CMK2
	+	1	CMB
Tổng		9	

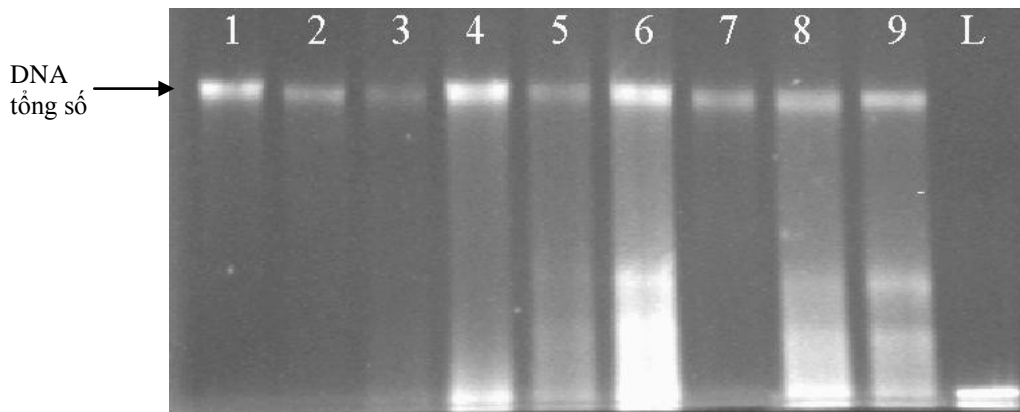
Chú thích: (+): có biểu hiện bệnh wilt, (-): không biểu hiện bệnh wilt.

**Hình 4.6. Một số mẫu dứa Cayenne thu thập.**

4.2. Nội dung 2: Phân lập vùng gene NBS trên các mẫu dứa thu thập

4.2.1. Kết quả ly trích DNA tổng số

Ban đầu, quy trình ly trích được hiện theo Doyle (1996). Kết quả điện di DNA tổng số của dứa Cayenne theo quy trình này không được tốt do có nhiều smear và tạp (protein và RNA). Do đó, phương pháp được cải tiến cho phù hợp hơn với đối tượng là cây dứa bằng cách tăng thêm một lần rửa protein bằng hỗn hợp PCI. Kết quả ly trích theo quy trình cải tiến thể hiện trên gel qua Hình 4.7.



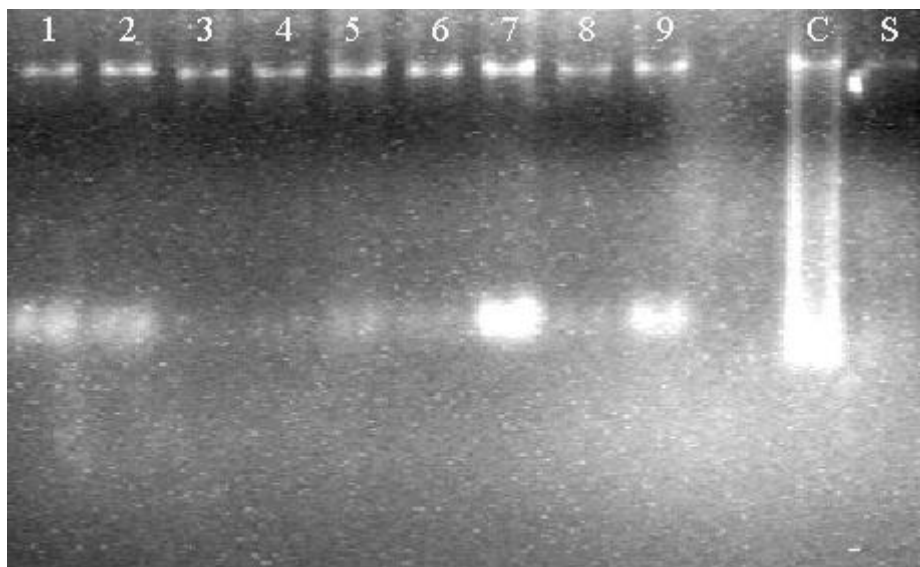
Hình 4.7. Kết quả điện di DNA tổng số theo quy trình cải tiến.

Chú thích: Từ 1 – 9 là các mẫu CMK1, CMK2, CMB, LDK, LDB, TLK, TLB, TQK, TQB (1 μ l). L là DNA ladder với nồng độ mỗi band là 400 ng (2 μ l)

Kết quả điện di cho thấy DNA genome đều xuất hiện ở tất cả các mẫu ly trích nhưng với hàm lượng không đồng đều. Một số mẫu có nhiều tạp. Tuy nhiên, smear từ band DNA tổng số là không có hoặc không đáng kể. Do đó, những mẫu này có thể tiến hành pha loãng, định lượng để sử dụng cho phản ứng PCR.

4.2.2. Kết quả pha loãng mẫu DNA tổng số

Trên gel điện di sản phẩm ly trích DNA tổng số (Hình 4.7), bố trí chạy DNA ladder (2 μ l) với nồng độ mỗi band là 400 ng để thuận lợi cho việc quan sát và định các hệ số pha loãng cho các mẫu tương ứng. Kết quả pha loãng thể hiện trên gel điện di qua Hình 4.8.



Hình 4.8. Kết quả pha loãng DNA.

Chú thích: Từ 1 – 9 là các mẫu CMK1, CMK2, CMB, LDK, LDB, TLK, TLB, TQK, TQB (3 μ l). C là đối chứng (mẫu DNA lan li trích), S là mẫu DNA hiệu chuẩn với nồng độ là 50 ng/ μ l (2 μ l).

Kết quả pha loãng cho thấy sự đồng đều giữa các mẫu về hàm lượng DNA. Đối chiếu với mẫu hiệu chuẩn, chúng tôi nhận thấy có thể sử dụng DNA pha loãng này cho phản ứng PCR (2 – 3 μ l khoảng 120 – 180 ng/phản ứng) theo yêu cầu của phương pháp (150 ng/phản ứng).

4.2.3. Tối ưu phương pháp PCR thoái hoá

Trong phần đầu của quá trình tối ưu phản ứng PCR thoái hoá, chúng tôi thực hiện theo quy trình của Z. Deng và cs (2000). Nhưng có lẽ do sự không tương hợp với mẫu DNA, các hoá chất PCR hay điều kiện máy móc của phòng thí nghiệm nên kết quả không có band trên gel điện di. Do đó, tham khảo một số quy trình khác, chúng tôi đã tiến hành chạy phản ứng PCR với nhiệt độ bắt cặp 43°C và nồng độ primer là 1,5 pm/ μ l thấp hơn so với quy trình của Z. Deng và cs. Đồng thời, tăng nhiệt độ biến tính lên 94°C và thời gian biến tính ban đầu lên 5 phút đảm bảo DNA biến tính hoàn toàn.

Do bản chất của Thí nghiệm 1 và Thí nghiệm 2.1 gần như giống nhau nên chúng tôi tiến hành và theo dõi chung.

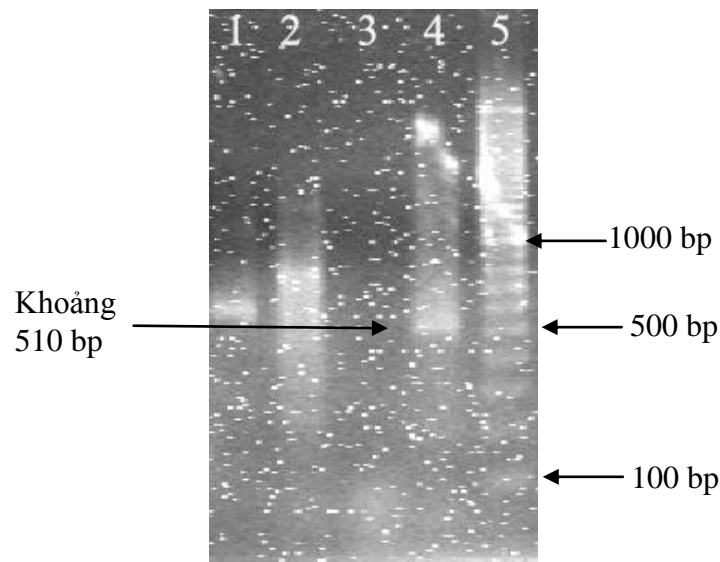
Thí nghiệm 1 và Thí nghiệm 2.1: Kết quả tối ưu các cặp primer trong việc khuếch đại gene kháng chính

Sử dụng qui trình của Z. Deng và cs (2000) có cải tiến, lần lượt chạy với 4 cặp primer (LM637, LM638), (F11, R11), (F11, R16), (TIR1, TIR2) trên cùng một mẫu (TLK) theo Bảng 4.3

Bảng 4.3. Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR thoái hoá cải tiến

Thành phần (25 µl/ống)	Nồng độ gốc	Nồng độ cuối	Lượng dùng (µl)	Chu trình nhiệt
PCR buffer	5 X	1 X	5	94°C – 5 phút
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2	Lặp lại 42 chu kỳ:
Primers xuôi	100 pm/µl	1,5 pm/µl	0,4	94°C – 1 phút
Primers ngược	100 pm/µl	1,5 pm/µl	0,4	43°C – 1 phút
dNTP	10 mM	200 µM	0,5	72°C – 2 phút
<i>Taq</i> polymerase	5 unit/µl	1 unit/25µl	0,2	72°C – 5 phút
DNA mẫu	60 ng/µl	150 ng/25µl	2,5	Giữ 4°C
Nước			14	
Tổng			25	

Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện qua Hình 4.10.



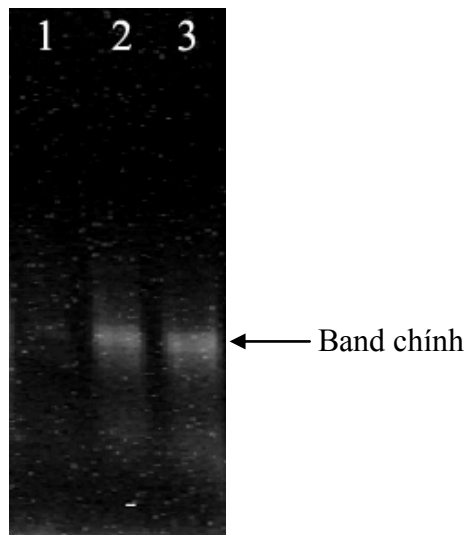
Hình 4.9. Kết quả PCR tối ưu 4 cặp primer theo quy trình của Z. Deng và cs có cải tiến

Chú thích: Từ trái qua phải các giếng 1, 2, 3, 4 lần lượt là phản ứng PCR với các cặp primer (LM637, LM638), (F11, R16), (TIR1, TIR2), (F11, R11); Giếng 5 - DNA ladder (2 µl).

Kết quả trên cho thấy quy trình PCR cải tiến có khả năng khuếch đại vùng gene kháng chính trên cây dứa. Trong số các cặp primer sử dụng, cặp primer (TIR1, TIR2) không cho sản phẩm. Nguyên nhân là do không thích hợp với nhiệt độ bắt cặp của phản ứng (T_m của cặp primer TIR là 66°C – theo tính toán của nhà sản xuất IDT). Ngoài ra, một nguyên nhân khác có thể có là trên cây dứa không có vùng mã hoá cho cấu trúc Tol. Ba cặp còn lại là (LM637, LM638), (F11, R11), (F11, R16) đều cho sản phẩm. Tuy nhiên, chỉ có cặp (F11, R11) có sản phẩm khuếch đại gần với mong muốn nhất (khoảng 510 bp). Đánh giá tổng thể, phản ứng PCR vẫn chưa đạt do còn quá nhiều sản phẩm phụ (smear) và band chính mờ. Do đó, cần phải tiếp tục tối ưu các yếu tố khác với cặp primer (F11, R11).

Thí nghiệm 2.2. Tối ưu nồng độ primer

Kết quả PCR trên gel điện di (Hình 4.11)



Hình 4.10. Kết quả PCR tối ưu nồng độ primer

Chú thích: Từ trái qua phải các giếng 1, 2, 3 là sản phẩm PCR với nồng độ primer sử dụng lần lượt là 1, 2, 3 pm/ μl .

Sản phẩm điện di tuy có nhưng khá mờ, chưa tạo thành vạch rõ. Trong đó, nồng độ 1 pm/ μl không cho sản phẩm, nồng độ 2 pm/ μl tạo ra band điện di mỏng và có phần rõ hơn so với nồng độ 3 pm/ μl . Do đó nồng độ primer 2 pm/ μl được sử dụng cho những nghiệm thức tối ưu kế tiếp.

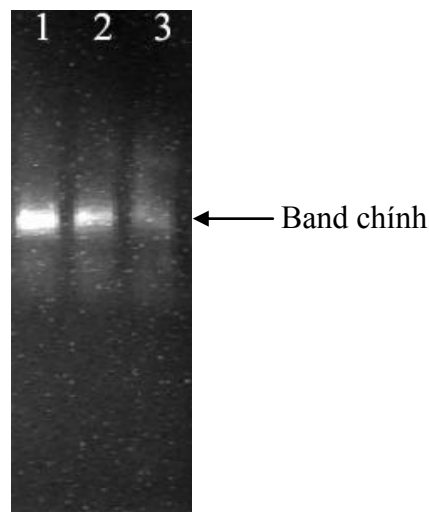
Kết quả PCR tối ưu nồng độ primer có vẻ mâu thuẫn với việc hạ nồng độ ở giai đoạn đầu. Lí giải cho việc này chúng tôi đưa ra nguyên nhân như sau. Primer thoái

hoá là một hỗn hợp gồm rất nhiều primer khác nhau và cùng tham gia vào phản ứng PCR với vai trò như nhau. Khi nồng độ primer quá cao, khả năng xảy ra hiện tượng bắt cặp giữa các primer là rất lớn. Hơn nữa, các primer có trình tự thích hợp cho phản ứng sẽ chịu sự cạnh tranh nhiều hơn từ các primer có trình tự gần giống nhưng không có khả năng hay khuếch đại không đúng vùng mong muốn. Do đó, phản ứng sẽ rất khó thành công ở nồng độ primer cao. Khi nồng độ primer thấp hơn, sự cạnh tranh và bắt cặp diễn ra không gay gắt làm cho lượng sản phẩm và lượng primer quay về mối quan hệ tỉ lệ thuận.

Mặt khác, khi so với nồng độ primer sử dụng trong các phản ứng PCR thông thường (single PCR, RAPD, SSR...) thì nồng độ primer sử dụng trong phản ứng PCR thoái hoá cao hơn nhiều. Điều này cũng có thể giải thích bằng bản chất của primer thoái hoá là hỗn hợp nhiều trình tự primer. Do đó, số primer có trình tự thích hợp để bắt cặp và có khả năng khuếch đại DNA khuôn mẫu chỉ chiếm một tỉ lệ nhỏ trong hỗn hợp sử dụng. Tỉ lệ này phụ thuộc vào độ thoái hoá của primer. Vì vậy, phải tăng nồng độ của cả hỗn hợp để tăng số primer có khả năng khuếch đại đảm bảo cho sản phẩm đạt yêu cầu về số lượng.

Thí nghiệm 2.3. Tối ưu nồng độ dNTP

Kết quả PCR thể hiện trên gel agarose (xem Hình 4.12).



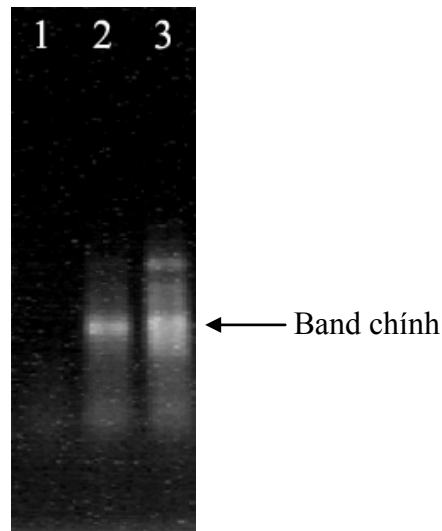
Hình 4.11. Kết quả PCR tối ưu nồng độ dNTP

Chú thích: 1, 2, 3 lần lượt là kết quả của phản ứng PCR ở nồng độ 300, 200, 100 μ M.

Kết quả điện di cho thấy độ sáng của band kháng chính giảm dần theo nồng độ dNTP. Ở mức nồng độ 300 μM band kháng chính lại khá nhoè. Do đó, nồng độ dNTP được giữ nguyên so với thí nghiệm của Z. Deng và cs (2000) và được áp dụng cho các thí nghiệm sau là 200 μM .

Thí nghiệm 2.4. Tối ưu nồng độ Mg^{2+}

Kết quả PCR thể hiện qua Hình 4.13.



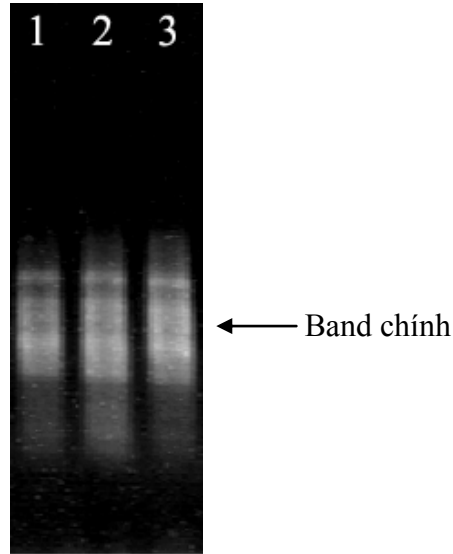
Hình 4.12. Kết quả PCR tối ưu nồng độ Mg^{2+}

Chú thích: Giếng 1, 2, 3 tương ứng với nồng độ Mg^{2+} lần lượt là 1, 2, 3 mM

Trong 3 nghiệm thức, chỉ có phản ứng với nồng độ Mg^{2+} ở 1 mM không cho sản phẩm. Hai nghiệm thức còn lại có sự hiện diện của band chính. Riêng nghiệm thức 2 (1,5 mM) cho kết quả khá tốt, độ tạp thấp. Điều này có thể giải thích vì Mg^{2+} là cofactor của *Taq* polymerase nên việc tăng hay giảm nồng của yếu tố này ảnh hưởng rất lớn đến sản phẩm PCR. Do đó nồng độ Mg^{2+} là 1,5 mM được cho là tối ưu và áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thí nghiệm 2.5. Tối ưu nồng độ *Taq* polymerase

Kết quả PCR tối ưu nồng độ *Taq* polymerase thể hiện qua Hình 4.14.



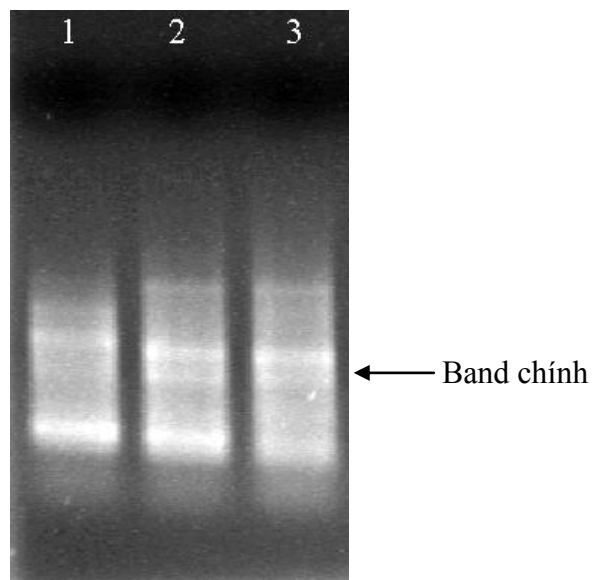
Hình 4.13. Kết quả PCR tối ưu nồng độ *Taq* polymerase

Chú thích: Giếng 1 – 1 unit/25 μ l; giếng 2 - 1,25 unit/25 μ l; giếng 3 - 1,5 unit/25 μ l.

Kết quả PCR thể hiện trên gel điện di cho khá nhiều tạp, xung quanh band kháng chính có nhiều smear, không có khác biệt lớn giữa các nghiệm thức khi sử dụng các nồng độ *Taq* khác nhau. Do đó nồng độ *Taq* polymerase tối ưu là 1 unit/25 μ l.

Thí nghiệm 2.6. Tối ưu nhiệt độ bắt cặp

Kết quả tối ưu nhiệt độ bắt cặp thể hiện qua Hình 4.15.



Hình 4.14. Kết quả tối ưu nhiệt độ bắt cặp

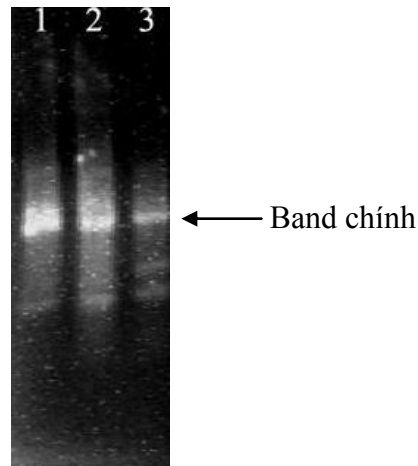
Chú thích: Từ trái qua phải các giếng 1, 2, 3 tương ứng với nhiệt độ bắt cặp 47, 50, 53 $^{\circ}$ C

Theo dõi độ sáng và độ rõ của band, nhiệt độ 47 $^{\circ}$ C so với hai mức nhiệt còn lại cho hiệu quả khuếch đại kém nhất đối với band chính (band chính không hiện rõ,

nhieu smear). Ở nhiệt độ 50°C và 53°C không có sự khác biệt đáng kể. Tuy nhiên, để giảm bớt lượng tạp cho các phản ứng kế tiếp, chúng tôi chọn 53°C là mức nhiệt độ tối ưu.

Thí nghiệm 2.7. Tối ưu số chu kỳ nhiệt

Kết quả PCR được ghi nhận qua Hình 4.16.



Hình 4.15. Kết quả PCR tối ưu số chu kỳ

Chú thích: Giếng 1 – 3 lần lượt là số chu kỳ của các phản ứng: 45, 40, 37.

Theo kết quả điện di, độ đậm của band kháng chính tỷ lệ thuận với việc tăng số chu kỳ của chu trình nhiệt. Ở 45 chu kỳ, phản ứng cho band rõ nhưng tạp khá nhiều. Như vậy, có thể giữ nguyên số chu kỳ theo thí nghiệm của Z. Deng và cs (2000) là 42.

Tổng kết qua các thí nghiệm, có thể kết luận rằng gene kháng bệnh tồn tại trong genome của cây dứa và được phân lập bằng phương pháp PCR thoái hoá. Tuy nhiên sản phẩm PCR thể hiện trên gel điện di chưa được rõ, mức độ tạo tạp và sản phẩm phụ còn cao. Có thể tạm lý giải điều này như sau:

Primer sử dụng là một hỗn hợp primer khác nhau, do đó trong quá trình xảy ra phản ứng không thể tránh khỏi sự cạnh tranh giữa các primer trong việc bắt cặp với DNA mẫu.

Lượng primer dư có thể tạo dimer làm xuất hiện tạp.

Mặc khác, do độ thoái hoá cao so với vùng gene kháng chính nên một số primer có thể bắt cặp với các vùng gene khác tạo nên các band phụ.

Nhiệt độ bắt cặp của phản ứng 53°C chưa đủ lớn để có thể loại trừ hiện tượng bắt cặp không chuyên biệt.

Dung hoà các yếu tố, có thể đi đến qui trình cho phản ứng PCR thoái hoá phân lập gene kháng ở cây dứa Cayenne (xem Bảng 4.1.)

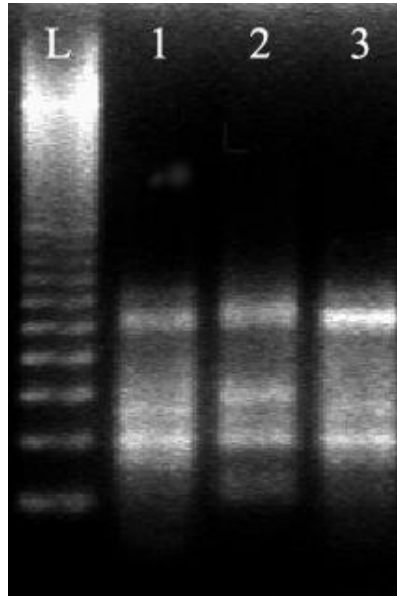
Bảng 4.4. Quy trình PCR thoái hoá tối ưu cho cây dứa Cayenne

Thành phần (25 µl/ống)	Nồng độ cuối	Chu trình nhiệt
PCR buffer	1 X	94°C – 5 phút
MgCl ₂	2 mM	Lặp lại 42 chu kỳ:
Primers xuôi	1,5 pm/µl	94°C – 1 phút
Primers ngược	1,5 pm/µl	53°C – 1 phút
dNTP	200 µM	72°C – 2 phút
<i>Taq</i> polymerase	1 unit/25µl	72°C – 5 phút
DNA mẫu	150 ng/25µl	Giữ 4°C
Nước cất	Vừa đủ 25 µl	

4.2.4. Reamplify sản phẩm PCR

Để tăng tăng hàm lượng cũng như độ sạch của sản phẩm PCR cho các phân tích tiếp theo, chúng tôi tiến hành khuếch đại lại (reamplify) sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR trực tiếp trên genome (PCR lần thứ nhất) được sử dụng làm mẫu (2 µl) cho phản ứng khuếch đại lại (PCR lần thứ hai). Ngoài ra, các yếu tố như nồng độ các chất và chu kỳ nhiệt đều giữ nguyên như đã tối ưu.

Kết quả PCR biểu hiện trên gel điện di qua Hình:



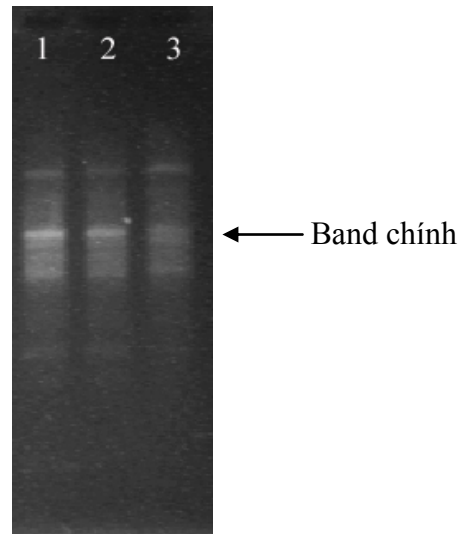
Hình 4.16. Kết quả khuếch đại lại sản phẩm PCR lần 1 của một số mẫu dứa

Chú thích: Từ trái qua phải, các giếng L, 1, 2, 3 lần lượt là DNA ladder, CMK1, CMK2, CMB.

Sau khi khuếch đại lần thứ 2, sản phẩm PCR cho ra band rõ và đẹp hơn so với PCR lần thứ nhất. Điều này có thể lý giải do mẫu của phản ứng PCR lần thứ hai là những đoạn DNA có kích thước nhỏ nên không có hiện tượng bắt cặp nhầm vào các trình tự khác của genome. Do đó sản phẩm sẽ chuyên biệt hơn. Sản phẩm PCR biểu hiện trên gel cho thấy hàm lượng của PCR đủ lớn để các thể tiến hành các phân tích tiếp theo như phân cắt enzyme.

4.2.5. PCR trên các loại mô khác nhau

Thực hiện phản ứng PCR với quy trình đã được tối ưu ở trên đối với mẫu lá, thân và rễ của cùng một cây. Kết quả điện di sản phẩm thể hiện qua Hình 4.18.



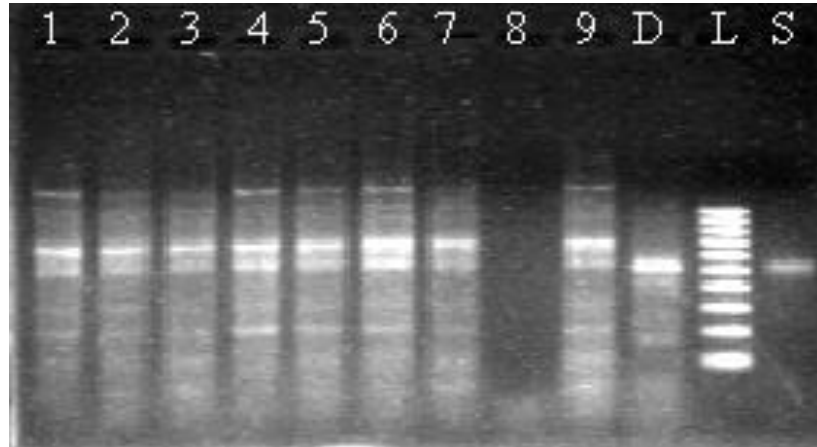
Hình 4.17. Sản phẩm PCR với quy trình đã tối ưu trên các loại mô khác nhau

Chú thích: Từ trái qua phải, các giếng 1, 2, 3 lần lượt là sản phẩm PCR của mô lá, thân, rễ

Band kháng chính đều xuất hiện ở cả ba loại mô. Tuy nhiên, độ sáng rõ của band tăng dần tương ứng với mô rễ, thân và lá. Nguyên nhân khác có thể là do quy trình ly trích mẫu chỉ phù hợp với lá. Do đó, với các loại mô khác như rễ và thân, quy trình không cho phép loại bỏ các tạp chất trong các mô này. Vì vậy, những chất này có thể cản trở phản ứng xảy ra một cách tối ưu. Như vậy lá là loại mô thích hợp nhất cho việc li trích DNA mẫu dùng cho phản ứng PCR thoái hoá.

4.2.6. PCR thoái hoá clone vùng NBS trên các mẫu dứa Cayenne

Thực hiện quy trình PCR thoái hoá tối ưu trên 9 mẫu DNA li trích, kết quả thể hiện trên gel điện di như sau:



Hình 4.18. Kết quả PCR thoái hoá trên 9 mẫu dứa Cayenne

Chú thích. Sản phẩm PCR thoái hoá: từ 1 – 9 các mẫu CMK1, CMK2, CMB, LDK, LDB, TLK, TLB, TQK, TQB; D: mẫu lan Dendrobium; L: DNA ladder;

S: sản phẩm PCR thoái hoá được tinh sạch với kích thước khoảng 510 bp.

Hầu hết các mẫu dứa đều tạo sản phẩm PCR thoái hoá với rất nhiều band. Trong đó chỉ có hai band sáng và rõ nhất (khoảng 510 bp, khoảng 700 bp), band có kích thước lớn hơn 1000 bp (khoảng 1400) mờ và không đồng đều giữa các mẫu, các band còn lại khá mờ. Band khoảng 700 bp có phần sáng hơn so với band khoảng 510 bp. Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR không có sự khác biệt lớn giữa các mẫu dứa (ngoại trừ mẫu 8 - TQK không cho sản phẩm – có thể do sai sót trong pha loãng hay ly trích cho nhiều tạp). Điều này cho thấy các mẫu biểu hiện và không biểu hiện triệu chứng của bệnh héo đọt đầu lá không có sự khác biệt khi kiểm tra bằng phương pháp PCR thoái hoá và điện di.

Mẫu lan Dendrobium cũng cho kết quả clone vùng gene NBS khá tốt (band sáng rõ, kích thước khoảng 510 bp). So sánh kết quả PCR thoái hoá giữa mẫu lan Dendrobium và dứa Cayenne cho thấy chỉ có sự giống nhau ở band khoảng 510 bp (vùng gene mã hoá cho cấu trúc NBS). Các band còn lại rất khác biệt nhau (mẫu lan không có band khoảng 700 bp, các band mờ có kích thước nhỏ hơn cũng không có sự tương đồng). Điều này chỉ ra rằng vùng gene mã hoá cho cấu trúc NBS có độ bảo tồn rất cao trên các loài cách xa nhau về phân loại.

4.2.7. Giải trình tự sản phẩm PCR thoái hoá

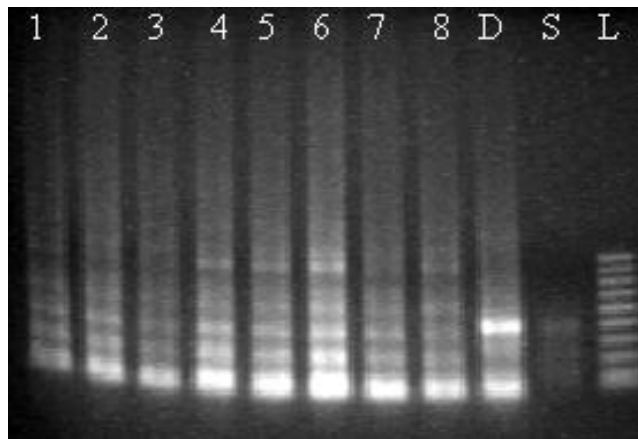
Việc có được trình tự của những thành viên họ gene NBS cho phép phân tích sâu hơn về tính kháng trên cây dứa Cayenne. Tuy nhiên, cố gắng giải trình tự trực

tiếp sản phẩm PCR thoái hoá đã không thành công. Nguyên nhân là do môi sử dụng là môi thoái hoá thay vì môi chuyên biệt như thông thường. Do đó hiện tượng nhiễu xảy ra gây khó khăn cho việc đọc trình tự.

Mặt khác, sản phẩm PCR thoái hoá thường là một hỗn hợp đa trình tự. Vì vậy, mẫu sau khi đã tinh sạch để đưa vào máy đọc vẫn có thể là một hỗn hợp nhiều gene. Và điều này cũng là một nguyên nhân gây nhiễu.

4.3. Nội dung 3: Phân tích RFLP vùng gene NBS các mẫu dưa thu thập.

Kết quả phân cắt bằng các mẫu PCR thoái hoá thể hiện như sau:



Hình 4.19. Kết quả phân cắt enzyme *Hind III* sản phẩm PCR thoái hoá

Chú thích. Các giếng 1-8: CMK1, CMK2, CMB, LDK, LDB, TLK, TLB, TQB; D: mẫu lan *Dendrobium*; S: sản phẩm PCR được tinh sạch với kích thước khoảng 510 bp; L: DNA ladder

Theo kết quả điện di, những khác biệt so với sản phẩm PCR ban đầu mà việc xử lý enzyme tạo ra là:

Trên mẫu lan *Dendrobium*, band sản phẩm PCR (510 bp) vẫn không có sự thay đổi. Chứng tỏ trên trình tự sản phẩm khuếch đại của cây lan *Dendrobium* không có sự hiện diện của site cắt phù hợp với enzyme *Hind III*.

Trên mẫu dưa, các band sáng rõ ban đầu (510 bp, 700 bp, 1400 bp) biến mất hay hiện diện rất mờ. Thay vào đó là sự xuất hiện của các band mới (< 100 bp, 300 bp, 430 bp, 600 bp, 900 bp). Tuy nhiên, sản phẩm phân cắt lại không cho thấy sự đa hình giữa các mẫu dưa. Do đó, có thể nói vẫn chưa xác định được marker liên kết với tính kháng bệnh héo đờ đầu lá.

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Qua những nội dung đã thực hiện trong khoá luận, chúng tôi đưa những kết luận sau:

Nội dung 1:

Đã nuôi rệp và lây nhiễm bệnh thành công với tỉ lệ biểu hiện là 35,66%.

Nội dung 2:

Có thể sử dụng quy trình li trích của Doyle có cải tiến để li trích DNA tương đối tinh sạch sử dụng cho phản ứng PCR thoái hoá khuếch đại vùng gene mã hoá cho cấu trúc NBS trên cây dứa Cayenne.

Đã cải tiến được chu trình nhiệt và nồng độ các thành phần tham gia phản ứng PCR thoái hoá cho phép khuếch đại thành công vùng NBS trên cây dứa Cayenne. Đây sẽ là cơ sở cho việc ứng dụng các phương pháp sinh học phân tử cho phép phân tích chính xác hơn để tìm ra vùng gene liên quan đến tính kháng bệnh héo đờ đầu lá trên cây dứa Cayenne.

Nội dung 3:

Không có sự đa hình cho phép xác định marker liên quan đến tính kháng virus PMWaV khi phân cắt sản phẩm PCR thoái hoá với enzyme *HindIII*.

5.2. Đề nghị

Tuyển lựa và thành lập những giống dứa Cayenne kháng với bệnh héo đờ đầu lá, tạo điều kiện thuận lợi để có thể thu thập mẫu một cách chính xác, phân biệt giữa giống kháng và giống nhiễm.

Tiếp tục phân tích RFLP trên vùng gene NBS với nhiều enzyme cắt hơn để tìm ra marker liên kết với tính kháng virus PMWaV. Thực hiện clone, giải trình tự sản phẩm PCR thoái hoá để có thể phân tích sâu hơn các RGA, nhằm xác định và lập bản đồ các marker liên kết với tính kháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Bùi Chí Bửu, 2002. *Cơ sở di truyền tính kháng sâu bệnh hại cây trồng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, TP. Hồ Chí Minh. 272 trang.
2. Nguyễn Phú Dũng, 2005. *Xây dựng quy trình phát hiện virus PMWaV-1 gây bệnh héo đổ đầu lá (Mealybug Wilt) trên cây dứa Cayenne bằng phương pháp RT-PCR*. Khoá luận tốt nghiệp Kỹ sư Công nghệ sinh học, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
3. Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, 1998. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Giáo Dục. 300 trang.
4. Võ Thị Mỹ Hân, 2004. *Điều tra tình hình bệnh hại trên cây dứa (Ananas comosus) ở huyện Tân Phước, Tiền Giang*. Khoá luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông học, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
5. Võ Thị Thúy Huệ, 2003. *Điều tra tình hình bệnh hại trên cây dứa (Ananas comosus) ở huyện Bến Lức, Long An và huyện Bình Chánh, Tp. Hồ Chí Minh*. Khoá luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông học, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
6. Phạm Văn Khánh, 2003. *Điều tra bệnh trên dứa ở Đức Trọng – Lâm Đồng và nông trường Thọ Vực – Xuân Lộc – Đồng Nai*. Khoá luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông học, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
7. Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2005. *Sinh học phân tử giới thiệu phương pháp và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, TP. Hồ Chí Minh. 240 trang.
8. Tôn Bảo Linh, 2005. *Nghiên cứu tạo cây dứa Cayenne in vitro sạch virus gây bệnh héo đổ đầu lá (PMWaV- Pineapple mealybug wilt associated virus)*. Khoá luận tốt nghiệp Kỹ sư Công nghệ sinh học, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
9. *Tài liệu thống kê ngành Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn*, 1996. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
10. Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải, 2000. *Kỹ thuật trồng dứa*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.

TIẾNG NƯỚC NGOÀI

11. Deng Z., Huang S., Ling P., Chen C., Yu C., Weber C. A., Moore G. A and Gmitter F. G., 2000. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance - gene candidate sequences in citrus. *Theor Appl Genet* 101: p. 814 – 822. Springer – Verlag.
12. Kanazin V., Marek L. F and Shoemaker R. C., 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: p. 11746 - 11750. Genetics.
13. Kenneth G. Rohrbach, John W. Beardsley, Thomas L. German, Neal J. Reimer, and Wallace G. Sanford, 1988. Mealybug wilt, Mealybugs and Ants on Pineapple. *Plant Dis.* 72 (7).
14. Leister D., 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: p. 370 - 375.
15. Melzer, M. J., Karasev, A. V., Sether, D. M., and Hu, J. S., 2001. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. *Journal of General Virology* 82: 1-7.
16. Pamela C. Ronald., 1997. The molecular basis of disease resistance in rice. *Plant Molecular Biology* 35: p. 179–186. Kluwer Academic Publishers.
17. Sambrook J., and Russell D. W., 2001. *Molecular cloning*, vol. 2. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
18. Sether D. M., Karasev A. V., Okumura C., Arakawa C., Zee F., Kislán M. M., Busto J. L and Hu J. S., 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. *Plant Disease* 85: p. 856-864.
19. Sether D. M., Ulman D. E., and Hu J. S., 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology* 88: p. 1224-1230.
20. Yu Y. G., Buss G. R., Maroof S., 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: p. 11751–11756. Genetics.