

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN VĂN QUANG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP NHÂN TẠO ĐỂ LÂY
NHIỄM VIRUS GÂY BỆNH XOĂN VÀNG LÁ CÀ CHUA**

Chuyên ngành : Công nghệ sinh học

Mã số: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Thị Hải Yên

Thái nguyên tháng 10 - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan những nội dung trình bày trong luận văn này là do tôi nghiên cứu, dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Thị Hải Yến và sự giúp đỡ của các cộng sự trong nhóm nghiên cứu. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn đã được sự đồng ý của cán bộ hướng dẫn và nhóm nghiên cứu, các tài liệu trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả

Nguyễn Văn Quang

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới TS. Nguyễn Thị Hải Yến, giảng viên Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu để tôi hoàn thành đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy, cô giáo và các cán bộ phòng thí nghiệm Sinh học – Khoa Khoa học Sự sống – Trường Đại học Khoa học, Phòng Công nghệ Tế bào thực vật - Viện Công nghệ Sinh học đã truyền đạt kiến thức, tạo điều kiện và tận tình giúp đỡ tôi hoàn thành các thí nghiệm trong luận văn.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè và đồng nghiệp luôn động viên, khuyến khích và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian qua.

Thái nguyên, ngày 10 tháng 9 năm 2014

Học viên

Nguyễn Văn Quang

MỤC LỤC

MỤC	Trang
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Giới thiệu về cây cà chua và một số bệnh hại cà chua.....	3
1.1.1. Nguồn gốc và Phân loại.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học.....	4
1.1.3. Một số bệnh hại cà chua.....	5
1.2. Virus gây bệnh xoăn vàng lá cây cà chua.....	7
1.2.1. Triệu chứng biểu hiện bệnh.....	7
1.2.2. Phân loại virus gây bệnh xoăn vàng lá cây cà chua.....	8
1.2.3. Đặc điểm hình thái và cấu tạo.....	8
1.2.4. Đặc điểm lây lan và môi giới truyền bệnh.....	10
1.2.5. Một số biện pháp phòng bệnh xoăn vàng lá cho cà chua.....	13
1.3. Các phương pháp lây nhiễm TYLCV trong thực nghiệm.....	16
Chương 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. Vật liệu.....	19
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	19

2.1.2. Chủng vi khuẩn	20
2.1.3. Hoá chất, thiết bị máy móc.....	20
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	21
2.2.1. Phương pháp lây nhiễm bằng bọt phân	21
2.2.2. Phương pháp lây nhiễm bằng ghép áp.....	22
2.2.3. Phương pháp lây nhiễm bằng Agro - inoculation	22
2.2.4. Phương pháp quang phổ hấp thụ (đo quang phổ - đo OD).....	23
2.2.5. Các chỉ tiêu đánh giá mức độ biểu hiện bệnh.....	23
2.2.6. Phương pháp phân tích sự có mặt của virus TYLCV.....	24
2.2.6.1. Thu thập mẫu và tách chiết DNA tổng số.....	24
2.2.6.2. Phương pháp điện di trên gel agarose.....	25
2.2.6.3. Phương pháp PCR nhân gen của TYLCV	26
Chương 3 : KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	27
3.1. Kết quả tạo nguồn bệnh.....	27
3.1.1. Kết quả lây nhiễm virus trong vườn có nguồn bệnh.....	27
3.1.2. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của virus trên cây bệnh.....	28
3.2. Kết quả lây nhiễm TYLCV cho cà chua bằng bọt phân	30
3.3. Kết quả lây nhiễm TYLCV bằng phương pháp ghép cây lành với cây bị bệnh.....	32
3.4. Kết quả lây nhiễm TYLCV bằng <i>Agro - inoculation</i>	35
3.5. Đánh giá hiệu quả lây nhiễm TYLCV của các phương pháp lây nhiễm nhân tạo.....	38
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	41
1. KẾT LUẬN.....	41

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU

Từ viết tắt	Nghĩa tiếng Việt	Nghĩa tiếng Anh
Bp	Cặp base	base pair
CTAB	CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid
CP	protein vỏ	Coat protein
DNA	Axit Deoxyribonucleic	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
EDTA	EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EtBr	EtBr	Ethidium Bromide
GB	GB	Gel binding buffe
Kb	Kb	kilobyte
ORF	trình tự đọc mở	Open reading frame
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp	Polymerase Chain Reaction
Primer F	Mồi xuôi	Primer Forward
Primer R	Mồi ngược	Primer Reverse
Taq	Vi khuẩn chịu nhiệt	Thermus aquaticus
IR	Vùng liên gen	Intergenic region
Rep	Tái bản	Replication
SCR	vùng vệ tinh	Satelite Conserved Region
TYLCV	Virus gây bệnh xoắn vàng lá cà chua	Tomato Yellow Leaf Curl Virus
TB	Trung bình	
RAPD	nhân bản ngẫu nhiên những đoạn DNA	Random Amplified Polymorphic DNA

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
2.1	Nồng độ các hoá chất trong dung dịch đệm tách DNA tổng số	24
2.2	Thành phần phản ứng PCR nhân gen từ mẫu DNA tổng số	26
3.1	Kết quả tạo nguồn bệnh trong vườn có áp lực bệnh cao	27
3.2	Kết quả theo dõi mức độ biểu hiện bệnh của các giống cà chua sau lây nhiễm qua bọt phấn	31
3.3	Kết quả theo dõi mức độ biểu hiện bệnh của các giống cà chua sau lây nhiễm bằng ghép áp	33
3.4	Kết quả giá trị OD ở bước sóng 660 nm của các chủng khuẩn sau nuôi lắc phục vụ thí nghiệm lây nhiễm	35
3.5	Kết quả theo dõi biểu hiện bệnh sau lây nhiễm TYLCV bằng <i>Agro-inoculation</i> vào các giống cà chua	36
3.6	Tổng hợp kết quả theo dõi biểu hiện bệnh trung bình của thí nghiệm lây nhiễm TYLCV vào cây cà chua bằng 3 phương pháp	38

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Sơ đồ cấu trúc genome của TYLCV	9
1.2	Chu kỳ sinh trưởng của bọ phấn (<i>Bemisia tabaci</i>)	11
2.1	Sơ đồ quy trình nghiên cứu	21
2.2	Các mức độ biểu hiện bệnh xoắn vàng lá cà chua	24
3.1	Hình ảnh cây cà chua bị bệnh xoắn vàng lá do virus TYLCV trồng tại vườn có nguồn bệnh sau 50 ngày	27
3.2	Kết quả điện di sản phẩm tách DNA tổng số của một số dòng cà chua nhiễm bệnh	28
3.3	Kết quả PCR kiểm tra gen CP của TYLCV trong các mẫu cà chua nhiễm bệnh	29
3.4	Kết quả PCR nhân gen CP của TYLCV kiểm tra sự có mặt của virus trong các dòng cây thí nghiệm sau lây nhiễm bằng bọ phấn.	32
3.5	Kết quả PCR nhân gen CP của TYLCV kiểm tra sự có mặt của virus trong các dòng cây thí nghiệm sau lây nhiễm bằng phương pháp ghép.	34
3.6	Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra TYLCV sau 10 ngày lây nhiễm bằng <i>Agro-inoculation</i>	37
3.7	Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra TYLCV sau 50 ngày lây nhiễm bằng <i>Agro-inoculation</i>	37

TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tên đề tài: “Nghiên cứu một số phương pháp nhân tạo để lây nhiễm virus gây bệnh xoăn vàng lá cà chua”.

2. Người hướng dẫn: TS. Nguyễn Thị Hải Yến

3. Người thực hiện: Nguyễn Văn Quang

4. Mục tiêu nghiên cứu

Tìm được phương pháp lây nhiễm virus TYLCV phù hợp để lây bệnh cho cà chua nhằm tạo phương pháp chuẩn để đánh giá khả năng kháng virus này cho cà chua trong điều kiện nhà lưới và vườn thí nghiệm.

5. Nội dung nghiên cứu

1. Thu thập các giống cà chua miễn cảm với virus, kháng tự nhiên với virus.
2. Gieo trồng và chuẩn bị nguồn bệnh cho thí nghiệm lây nhiễm.
3. Tiến hành các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo cho cà chua
4. Theo dõi và phân tích kết quả, đánh giá mức độ biểu hiện bệnh sau khi lây nhiễm.
5. Đưa ra quy trình lây nhiễm nhân tạo virus TYLCV cho cà chua.

6. Kết quả nghiên cứu

(1) Thu thập giống cà chua phục vụ thí nghiệm:

+ Giống PT 18 do viện rau quả Việt Nam cung cấp. Cà chua PT18 có chiều cao trung bình 80 – 100 cm, dạng cây gọn, màu lá xanh nhạt, phân cành ít, sinh trưởng hữu hạn. PT18 là giống khá miễn cảm với bệnh xoăn vàng lá do TYLCV.

+ Giống F₁ GM - 2008, là giống nhập nội có nguồn gốc từ Pháp. Quả của F₁ GM - 2008 có dạng tròn dẹt, chín có màu đỏ tươi, thịt dày, rắn chắc. F₁ GM - 2008 sinh trưởng hữu hạn, chịu lạnh và nóng rất tốt, giống F₁ GM2008 được lai tạo theo hướng kháng bệnh xoăn vàng lá do virus TYLCV.