

PHÂN LẬP, NHÂN NUÔI LƯU GIỮ VÀ ĐỊNH TÊN MỘT SỐ NẤM RỄ NỘI CỘNG SINH TRÊN CÂY LÚA VÀ CÀ CHUA Ở BẮC VIỆT NAM

Trần Thị Như Hằng^{1,*}, Trần Thị Hồng Hà¹, Nguyễn Đình Luyện¹, Posta Katalin²,
Lê Mai Hương¹

¹Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên,
Viện KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

²Viện bảo vệ thực vật, Đại học Szent Istvan, Hungary

*Email: hangmy97@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 10/4/2012; Chấp nhận đăng: 15/12/2012

TÓM TẮT

Trong đề tài của chúng tôi, lúa và cà chua là các cây nông nghiệp được lựa chọn để phân lập các bào tử nấm rễ nội cộng sinh (AM) và tìm hiểu mối quan hệ cộng sinh giữa nấm và cây. Trong bài báo này, chúng tôi xác định được cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*) là cây chủ tốt cho nhân nuôi lưu giữ để làm tăng số lượng bào tử AM. Đã định tên đến chi các bào tử nấm rễ AM phân lập được đó là các chi *Scutellospora*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, và *Entrophospora*.

Từ khóa: nấm rễ, mối quan hệ cộng sinh, cây chủ Mã đề (*Plantago lanceolata*).

1. MỞ ĐẦU

Nấm rễ (mycorrhizal) là một hình thức cộng sinh giữa thực vật và nấm. Đây là quần hợp nấm - thực vật được biết nhiều nhất và đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của thực vật cũng như nhiều hệ sinh thái, hơn 90 % các loài thực vật có quan hệ với nấm theo hình thức nấm rễ và phụ thuộc vào mối quan hệ này để tồn tại [1, 2]. Có hai loại nấm rễ: nấm rễ nội sinh, và nấm rễ ngoại sinh.

- Nấm rễ ngoại cộng sinh (ectomycorrhizal) là sợi nấm bao quanh rễ dinh dưỡng chưa hóa gỗ, không xuyên qua mô tế bào mà chỉ kéo dài giữa các vách tế bào.

- Nấm rễ nội cộng sinh (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AM) là nhóm cộng sinh bắt buộc với thực vật và thuộc ngành Glomeromycota [3]. Sự nội cộng sinh nấm và rễ là hình thức hỗ sinh trong đó nấm thâm nhập qua tế bào vỏ của rễ cây, màng sinh chất của tế bào chủ bao quanh sợi nấm, tạo ra những vòng xoắn của sợi nấm ở bên trong tế bào. Cả hai bên sử dụng chất dinh dưỡng trong mối quan hệ tương hỗ, nấm AM giúp thực vật lấy dinh dưỡng như photpho, sulfur, nitrogen và các vi lượng từ đất.

Sự cộng sinh nấm làm cải thiện khả năng hấp thụ và tuổi đời rễ, tăng cường hấp thu các dinh dưỡng đặc biệt là photphat và giảm khả năng nhiễm bệnh của cây [4, 5]. Các nấm này đồng thời cũng giảm stress gây bởi các vi sinh vật nhiễm vào rễ, đất mặn, hay bởi nước tù [6].

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu về nấm rễ nội cộng sinh đã thu được các kết quả có ý nghĩa quan trọng trong việc ứng dụng công nghệ AM có hiệu quả trên nhiều loài cây nông nghiệp, lâm nghiệp. Nhưng để sử dụng có hiệu quả thì việc đầu tiên là phải phân lập, lựa chọn được chủng nấm phù hợp, có hiệu quả cao đối với từng loài cây trồng.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

- Nguồn mẫu cho nghiên cứu là các mẫu đất quanh rễ từ cây lúa và cà chua được thu thập từ một số tỉnh phía bắc Việt Nam (Hà Nội, Vĩnh Phúc...).

- Cây dùng trong thí nghiệm nhân nuôi lưu giữ là cây *Mã đề Ribwort (Plantago lanceolata)*: sử dụng hạt giống gieo.

2.2. Phương pháp

Phương pháp lấy mẫu: Gạt bỏ 1 cm đất bề mặt để loại trừ thảm mục thực vật. Dùng xẻng đã được vô trùng bằng cồn đào lấy phần bầu đất quanh rễ cây (ở độ sâu 0 – 20 cm). Đào lấy rễ và đất từ từ để hạn chế đứt phần rễ non. Mẫu đất sau khi được thu thập về phòng thí nghiệm được để khô tự nhiên trong bóng mát, sau đó được đựng trong hộp nhựa kín, bảo quản ở nhiệt độ thấp (2 – 5 °C) tối thiểu 4 ngày trước khi sử dụng cho phân tích hoặc đồng nuôi cấy.

Phương pháp phân lập bào tử: Phân lập bào tử AM trong mẫu đất thu thập ở hiện trường theo phương pháp lọc ướm của Gerdeman và Nicolson [7].

- Lấy 100 gam đất ngâm với 2 lít nước, khuấy nhẹ tạo thành dung dịch huyền phù.

- Đổ từ từ dung dịch qua các rây có kích thước lần lượt là 1000, 250, 100 và 45µm

- Bỏ phần cặn trên rây 1000 µm vì ở rây này thường không có bào tử mà chủ yếu là các mảnh rác hữu cơ. Lấy phần cặn trên rây 250 µm, 100 và 45 µm rửa sạch ly tâm lần 1 ở 5000 vòng/ 5 phút với nước. Bỏ dịch trong trong các ống li tâm lấy phần cặn hòa tan trong dung dịch đường sucrose 480 g/l và li tâm lần 2 với tốc độ 2500 vòng/ phút trong 5 phút. Sau ly tâm, đổ dịch nổi qua rây 45 µm và rửa sạch bằng nước rồi cho vào đĩa Perti để quan sát. Sau đó từ các đĩa petri này, tiến hành phân lập và đếm bào tử.

Phương pháp phân lập bào tử từ mẫu đất nhân nuôi lưu giữ

- Tạo mẫu đất nhân nuôi lưu giữ: sử dụng cây chủ là cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*). Hạt giống Mã đề được khử trùng bằng cồn, NaOCl 3 % và rửa lại bằng nước cất. Tạo bầu đất theo tỉ lệ 1 cát vàng: 2 than bùn. Cho đất mẫu có chứa bào tử vào bầu đất, xịt đều nước đủ ẩm đất sau đó gieo hạt giống ngay lên trên phần đất mẫu. Mỗi bầu gieo từ 10 – 15 hạt. Sau khoảng 2 tuần hạt đã nảy mầm ổn định, tiến hành tỉa bỏ những cây không đạt tiêu chuẩn và chỉ giữ lại mỗi bầu đồng đều 10 cây.

- Sau 4 tháng lấy đất phân lập theo phương pháp lọc ướm của Gerdemann và Nicolson (1963).

Phương pháp làm tiêu bản và mô tả nhóm bào tử AM theo Sylvie, 2010 [8]

- Tất cả bào tử sau khi phân lập sẽ được chia thành các nhóm khác nhau dựa trên tiêu chí cơ bản về màu sắc và hình thái.
- Từ mỗi nhóm bào tử, chọn ra từ 5 – 10 bào tử tiêu biểu nhất cho nhóm để làm tiêu bản tạm thời bào tử bằng thuốc nhuộm PVLG và Melzer [9, 10].
- Quan sát bào tử ghi lại hình dạng, màu sắc, kích thước, số vách bào tử, kích thước vách bào tử dưới kính hiển vi điện tử ở các độ phóng đại 200 – 400.
- Phân loại sơ bộ bào tử phân lập được đến cấp chi/giống theo các tiêu chí tại INVAM [11].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các bào tử nấm rễ

Trước khi tiến hành nhân nuôi lưu giữ thì mỗi mẫu đất cho nhân nuôi đều được phân lập để xác định số lượng bào tử AM tổng số ban đầu để làm cơ sở đánh giá kết quả sau nhân nuôi.

Chúng tôi đã sử dụng phương pháp của Gerdemann và Nicolson (1963) để tiến hành phân lập bào tử trong các mẫu đất thu thập.

Kết quả số lượng bào tử tổng số trong 100 g đất/mẫu như sau:

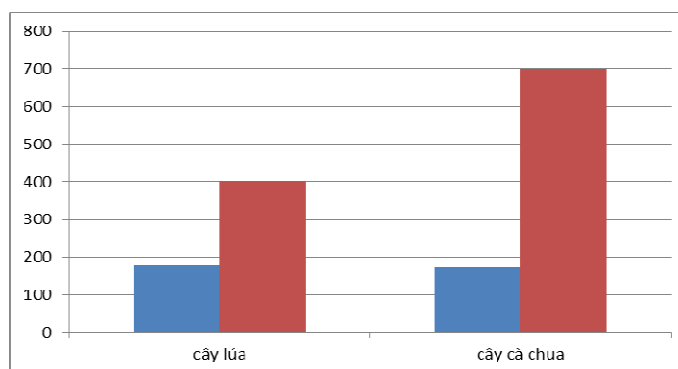
Số lượng bào tử AM tổng số trong mẫu đất quanh rễ từ cây cà chua trước nhân nuôi lưu giữ là 173 bào tử / 100 g đất.

Số lượng bào tử AM tổng số trong mẫu đất sau nhân nuôi lưu giữ của cà chua là 700 bào tử /100g đất.

Số lượng bào tử AM tổng số trong mẫu đất quanh rễ từ cây lúa trước nhân nuôi lưu giữ là 181 bào tử/100 g đất.

Số lượng bào tử AM tổng số trong mẫu đất sau nhân nuôi lưu giữ của cây lúa là 400 bào tử/100 g đất.

Kết quả số lượng bào tử AM tổng số trong 100 g đất phân lập được trước và sau khi nhân nuôi lưu giữ của cà chua và lúa thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Số lượng bào tử AM tổng số trên 100g đất phân lập được

Kết quả phân lập cho thấy trước khi nhân nuôi lưu giữ các mẫu đất từ cà chua và lúa đều cho số lượng bào tử AM tổng số là tương đương nhau.

Khi nhân nuôi lưu giữ các bào tử này trên cây Mã đề, các bào tử sẽ nảy mầm sinh trưởng tạo hệ sợi rồi hình thành bào tử. Số lượng bào tử sẽ tăng lên sau quá trình nhân nuôi.

Sau 4 tháng nhân nuôi bảo tồn trên cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*) thì số lượng bào tử AM tổng số của các mẫu tăng lên rõ rệt. Đặc biệt là đối với cây cà chua số lượng bào tử tăng từ 173 bào tử lên 700 bào tử /100 g đất (tăng 304,6 %). Đối với cây lúa số lượng bào tử tăng từ 181 bào tử lên 400 bào tử /100 g đất (tỉ lệ tăng sinh bào tử là 121 %).

Như vậy cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*) là cây chủ có hiệu quả tốt cho nhân nuôi bảo tồn để làm tăng số lượng bào tử với cả hai mẫu cây.

3.2. Định tên các bào tử nấm rễ AM

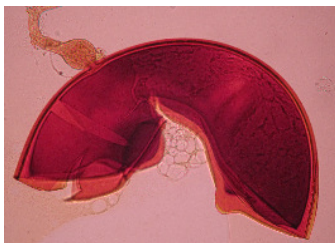
Trong bài báo này, chúng tôi định tên đến chi các bào tử phân lập được bằng phương pháp hình thái theo các tiêu chí phân loại hình thái của INVAM [11].

Sử dụng các bào tử phân lập được từ nhân nuôi lưu, dựa trên các đặc điểm cơ bản về hình thái, màu sắc, cuống sinh bào tử chúng tôi đã bước đầu phân loại các nhóm bào tử AM phân lập được từ các mẫu.

3.2.1. Từ cây cà chua phân loại được 3 nhóm bào tử

Nhóm 1: Bào tử hình cầu, bề mặt nhẵn, màu trắng; Thành bào tử có 2 lớp; Có cuống bào tử dạng củ hành.

Tên phân loại là *Scutelospora*



Nhóm 2: Bào tử hình cầu, bề mặt nhẵn, màu vàng trong; Có cuống bào tử dạng phễu ngược.

Tên phân loại là *Glomus*



Nhóm 3: Bào tử hình cầu, bề mặt nhẵn, màu vàng nhạt; Thành bào tử có 4 lớp; Không có cuống bào tử.

Phân lập, nhân nuôi lưu giữ và định tên một số nấm rễ nội cộng sinh trên cây lúa và cà chua ...

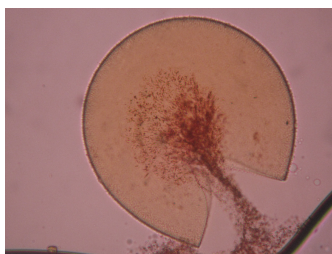
Tên phân loại là ***Entrophospora***



3.2.2. Từ cây lúa phân loại được 4 nhóm bào tử

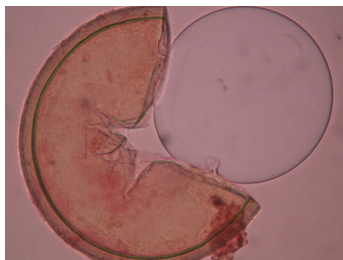
Nhóm 1: Bào tử hình cầu, bề mặt nhẵn, màu vàng nhạt; Thành bào tử có 2 lớp; Không có cuống bào tử.

Tên phân loại là ***Acaulospora***



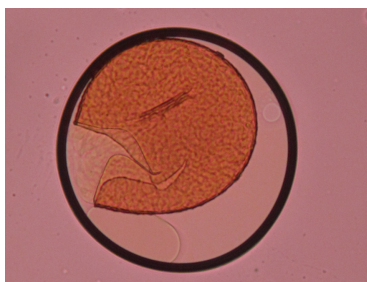
Nhóm 2: Bào tử màu trắng đục, bề mặt nhẵn; Không có cuống bào tử.

Tên phân loại là ***Gigaspora***



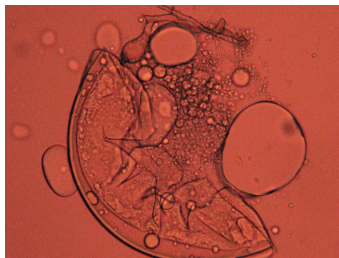
Nhóm 3: Bào tử màu vàng nhạt, bề mặt nhẵn; Thành bào tử có 4 lớp; Không có cuống bào tử.

Tên phân loại là ***Entrophospora***



Nhóm 4: Bào tử hình cầu, màu trắng, bề mặt nhẵn; Thành bào tử có 2 lớp; Có cuống bào tử dạng củ hành.

Tên phân loại đến chi là *Scutellospora*



Kết quả cho thấy mỗi mẫu đất đều có 3 - 4 nhóm bào tử khác nhau, bước đầu đã phân loại đến chi dựa trên các đặc điểm hình thái đó là các chi *Scutellospora*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, và *Entrophospora*. Đây là các chi thuộc nấm rễ nội cộng sinh, chúng có khả năng đâm xuyên vào tế bào vỏ rễ.

Tuy nhiên kết quả cũng nhận thấy trong 2 mẫu đất này có những nhóm bào tử giống nhau về hình thái, màu sắc và thuộc cùng một chi.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được số lượng bào tử AM tổng số từ đất quanh rễ của cây cà chua và lúa tương ứng là 173 bào tử/100 g và 181 bào tử/100 g.

Sau 4 tháng nhân nuôi bảo tồn trên cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*) số lượng bào tử AM tổng số của các mẫu tăng lên rõ rệt. Đối với cây cà chua tỷ lệ bào tử tăng 304,6 %. Với cây lúa tỉ lệ tăng sinh bào tử là 121 %.

Có thể sử dụng cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*) làm cây chủ trong nhân nuôi bảo tồn bào tử để tăng số lượng bào tử nấm rễ nội cộng sinh (AM).

Đã định tên đến chi các bào tử nấm rễ AM phân lập được đó là các chi *Scutellospora*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, và *Entrophospora*.

Lời cảm ơn. Đề tài được thực hiện trong khuôn khổ nhiệm vụ hợp tác quốc tế về Khoa học và Công nghệ theo nghị định thư Việt Nam - Hungary (2011-2012) "Nghiên cứu nấm rễ tạo chế phẩm nhằm tăng chất lượng cây thuốc và năng suất một số cây nông nghiệp", mã số: 53/2011/ HĐ - NĐT giữa Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên và Đại học nông nghiệp Szent Istvan, CH Hungary.

Các tác giả xin cảm ơn Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gianinazzi S. and Gianinazzi – Pearson V. - Progress and headaches in endomycorrhizal biotechnology, *Symbiosis* **2** (1986) 139-149.
2. Smith S. E., and Read D. J. - Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn, London, UK: Academic Press, 1997.
3. Schussler A., Schwarzott D., and Walker C. - A new phylum, the Glomeromycota; phylogeny and evolution, *Mycological Research* **105** (2001) 1413-1421.

4. Norris J. R., Read D., and Varma A. K. - Techniques for Mycorrhizal Research, Academic Press, 1994, pp. 928.
5. Werner D. - Symbiosis in plant and microbe, Champion & Hall, 1992, pp. 389.
6. Staddon P. L. and Fitter A. H. - The differential vitality of intraradical mycorrhizal structure and its implications, Soil botany and biochemistry **33** (2001) 129-132.
7. Gerdemann J. W. and T. H. Nicolson T. H. - Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting, Trans. Br. Mycol. Soc. **46** (1963) 235-244.
8. Sylvie Crannenbrouck. - Arbuscular mycorrhizal fungi, Description, Classification and Identification, Universiteit Gent, 1th April 2010.
9. Hall I. R., Abbott L. K. - Some Endogonaceae from South Western Australia, Transactions of the British Mycological Society **83** (2) (1984) 203-208.
10. Koske, R.E., - Glomus aggregatum emended: a distinct taxon in the Flomus fasciculatum complex, Mycologia **77**(4) (1985) 619-630.
11. <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm>

ABSTRACT

ISOLATION, INVIVO CULTURE AND IDENTIFICATION OF SOME ARBUSCULAR MYCORRHIZA ASSOCIATED WITH RICE AND TOMATO PLANTED IN THE NORTH VIETNAM

Hang Tran Thi Nhu ^{1,*}, Ha Tran Thi Hong ¹, Luyen Nguyen Dinh ¹, Posta Katalin²,
Huong Le Mai ¹

¹*Institute of Natural Products Chemistry, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

²*Plant Protection Institute, Szent Istvan University, Hungary*

*Email: hangmy97@yahoo.com

In our report, rice and tomato have been chosen as the targets for AM isolation and investigation the mutualistic relationship between fungi and plants. In this paper, its clear that the *Plantago lanceolata* tree is defined as a good host for growth and increase number of arbuscular spore before reinfection to rice and tomatoes. The identification of AM fungi belong to *Scutellospora*; *Glomus*, *Acaulospora* *Gigaspora*, and *Entrophospora*.

Keywords: Arbuscular mycorrhizae (AM), mutualistic relationship, *Plantago lanceolata*.