

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

LÊ THỊ THỦY

**NGHIÊN CỨU HỆ NẤM
CỘNG SINH *ARBUSCULAR MYCORRHIZA*,
TRONG ĐẤT VÀ RỄ CAM TẠI QUỲ HỢP - NGHỆ AN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2012

MỞ ĐẦU

Sự cộng sinh giữa nấm và rễ cây trồng được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1885 do A.B.Fank – nhà bệnh cây lâm nghiệp người Đức. Nhưng phải đến năm 80 của thế kỷ 20 mới được tập trung nghiên cứu và ứng dụng trong sản xuất.

Nấm rễ cộng sinh là hiện tượng rất phổ biến trong tự nhiên, có khoảng 60 – 80% các loài thực vật trên thế giới có mối quan hệ cộng sinh với nấm nội cộng sinh. Đây là mối quan hệ cộng sinh không thể tách rời: Nấm không có rễ thì không thể tồn tại, cây không có nấm cây sinh trưởng yếu và chết [11]. Đã có nhiều công trình khoa học chứng minh vai trò của nấm cộng sinh mang lại những lợi ích to lớn, thiết thực đối với quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trong điều kiện bất lợi của môi trường, bởi vậy chỉ trong điều kiện đất đai khô hạn, nghèo dinh dưỡng thì nấm rễ mới phát huy tốt vai trò cộng sinh của mình. Chính vì vậy, hình thức cộng sinh này đã và đang được nghiên cứu (về phân loại, sinh học phân tử, ảnh hưởng của chúng đối với thực vật...) và ứng dụng vào thực tiễn sản xuất nông – lâm nghiệp ở nhiều nước trên thế giới.

Ở Việt Nam, diện tích đất trồng trên cạn là rất lớn (3 317 270 ha), chủ yếu là các loại cây trồng có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, trong phát triển sản xuất thường gặp khó khăn về vấn đề nước tưới, đất chua và dinh dưỡng. Vì vậy, việc nghiên cứu áp dụng kỹ thuật phát triển nấm cộng sinh *Mycorrhiza* cho một số cây trồng chính tại các vùng sinh thái phục vụ sản xuất Nông – Lâm nghiệp bền vững ở nước ta nhằm nâng cao năng suất cây trồng, duy trì và bảo vệ và nâng cao độ phì nhiêu của đất là vấn đề cấp bách cần được quan tâm hiện nay. Cho đến nay, một số nhà khoa học của Viện Lâm nghiệp, Viện Công nghệ sinh học, Viện Thổ nhưỡng nông hóa... cũng đã công bố những nghiên cứu cơ bản về nấm rễ cộng sinh. Kết quả của những nghiên cứu này

mới chỉ dừng lại ở mức phân lập, lưu giữ bào tử nấm cộng sinh và nghiên cứu xử lý đất ô nhiễm chì có sử dụng nấm *Mycorrhiza*. Tuy nhiên vẫn chưa có nghiên cứu về khả năng cộng sinh của nấm cộng sinh trên cây cam nhằm tạo ra chế phẩm làm tăng năng suất và chất lượng.

Trong các loại cây ăn quả, Cam Vinh là một loại cây ăn quả đặc sản truyền thống có giá trị dinh dưỡng cao, đồng thời cũng rất có giá trị về kinh tế. Tuy nhiên, diện tích trồng cam ở đây đang dần bị thu hẹp và chất lượng của cam đang ngày càng bị mai một. Với mong muốn có thể góp phần nào đó vào việc cải thiện năng suất, chất lượng cam, nhóm nghiên cứu tiến hành nghiên cứu đề tài: “NGHIÊN CỨU HỆ NẤM CỘNG SINH ARBUSCULAR MYCORRHIZA, TRONG ĐẤT VÀ RỄ CAM TẠI QUỲ HỢP - NGHỆ AN”. Với mục tiêu và nội dung nghiên cứu sau:

Mục tiêu nghiên cứu :

Nghiên cứu hệ nấm nội cộng sinh (*Arbuscular Mycorrhiza Fungi*) trên đất trồng cam ở Xã Minh Tân - Phủ Quỳnh – Nghệ An. Trên cơ sở đó, góp phần đề xuất các giải pháp về phân bón, canh tác nhằm làm tăng năng suất, chất lượng chè, ổn định độ phì nhiêu, cải thiện môi trường đất vùng trồng cam.

Nội dung nghiên cứu:

- Xác định thành phần loài AMF tại vùng nghiên cứu.
- Xác định đặc điểm phân bố AMF trong đất trồng cam tại Phủ Quỳnh – Nghệ An.
- Xác định loài AMF trong đất trồng cam bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

CHƯƠNG I

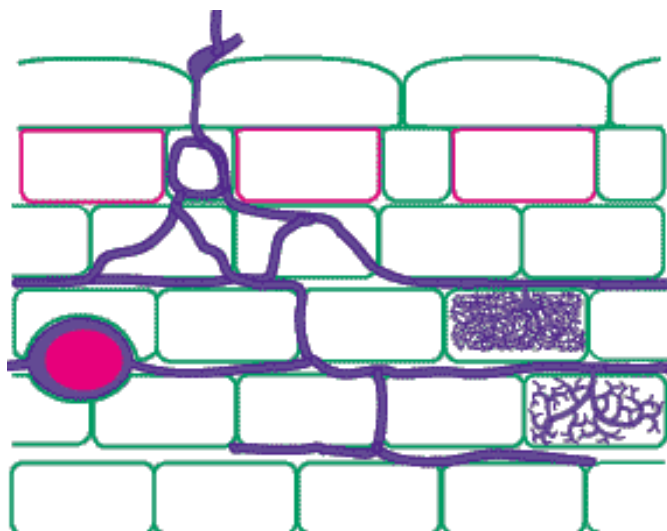
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. LỊCH SỬ HÌNH THÀNH TÊN GỌI *ARBUSCULAR MYCORRHIZA FUNGI* (AMF)

Thuật ngữ “*Mycorrhiza*” lần đầu tiên được Frank – nhà bệnh cây lâm nghiệp người Đức – đưa ra vào năm 1885 để chỉ mối quan hệ đặc biệt giữa rễ cây và nấm ngoại cộng sinh [53]. Sự cộng sinh của *Mycorrhiza* với rễ được mô tả như (hình 1.1). Thuật ngữ này bắt nguồn từ chữ Hy Lạp: *Mykes* (nấm) và *Rhiza* (rễ). Năm 1887, Frank đã chỉ ra sự khác biệt giữa nấm ngoại cộng sinh và nấm nội cộng sinh, thực chất là sự khác biệt giữa *Ericaceous* và *Orchid*, từng được gọi là “*Phycomycetous Endomycorrhiza*” để phân biệt với dạng cộng sinh của nấm bậc cao với các loài trong họ *Ericaceae* và *Orchidaceae*. Tuy nhiên, tên gọi này tồn tại không lâu vì không có ý nghĩa [33]. Những nghiên cứu tiếp theo về cấu trúc đã dẫn đến sự thay đổi tên gọi của hình thức cộng sinh này. Năm 1897, tác giả Janse đã gọi cấu trúc dạng bong bóng bên trong tế bào rễ của thực vật bị nhiễm nấm *Mycorrhiza* là “*Vesicules*” (gọi là thể V). Năm 1905, Gallaud gọi những cấu trúc dạng bụi (chùm) trong tế bào thường được quan sát thấy là “*Arbuscular*” (gọi là thể A). Do vậy, tên gọi “*Vesicular – Arbuscular Mycorrhiza*” (viết tắt là VAM) được hình thành và tồn tại cho đến thời gian gần đây [19]. Bên cạnh đó, một số bài báo và công trình khoa học khác còn sử dụng tên gọi “*Vesicular – Arbuscular Mycorrhiza Fungi*” để chỉ loại hình cộng sinh này [23]. Những nghiên cứu sau này cho thấy, thể A là đặc điểm chung nhất của các chi nhưng không phải tất cả nấm nội cộng sinh đều hình thành thể V. Do vậy, loại hình

cộng sinh này có thể được đổi tên là “*Arbuscular Mycorrhiza*”. Nói chung, tên gọi của nó vẫn chưa hoàn toàn thống nhất.

Năm 2005, Hội nghị Quốc tế về *Mycorrhiza* lần thứ 17 được tổ chức tại Lisboa – Bồ Đào Nha đã quyết định lấy tên “*Arbuscular Mycorrhiza Fungi*” (AMF) để chỉ loại hình cộng sinh này. Do vậy, trong các tài liệu mới được công bố, thuật ngữ “*Arbuscular Mycorrhiza Fungi*” (viết tắt là AMF) đã được thống nhất sử dụng thay cho thuật ngữ “*Vesicular – Arbuscular Mycorrhiza*” vào năm 2008 [28].



Hình 1.1. Sự cộng sinh của AMF trong rễ cây trồng.

1.2. PHÂN LOẠI MYCORRHIZA

Đặc điểm nhận dạng của một số loài bào tử AMF (dựa theo phân loại của Gerdemann, 1963) [32] bảng 1.1.

Bảng 1.1. Đặc điểm nhận dạng của một số loại bào tử AMF

Tên chi	Tên loài	Hình dạng	Màu sắc	Kích thước (µm)	Đặc điểm
<i>Glomus</i>	<i>Aggregatum</i>	Hình cầu, hình trứng, có cuống nhỏ	Có màu nâu, màu nâu đỏ, một số có màu vàng nhạt	120-175	Thành bào tử mỏng, có 2 lớp.
	<i>Ambisporum</i>	Hình cầu hoặc hình trứng	Màu nâu, nâu đậm	100-150	Thành bào tử mỏng.
	<i>Marcaropus</i>	Hình cầu hoặc hình trứng	Nâu hoặc màu vàng nhạt	100-125	Thành bào tử mỏng, có quả bào tử.
<i>Acaulospora</i>	<i>Appendiculata</i>	Hình cầu	Có màu vàng nhạt	150-175	Thành bào tử dày, 1-6 µm.
	<i>Delicate</i>	có quả bào tử, hình cầu	Có màu nâu, nâu đậm	100-175	Thành bào tử dày.
	<i>Dilatata</i>	Hình cầu, có quả bào tử	Có màu nâu, đen	125-200	Thành bào tử dày, có nhiều lớp.
	<i>Myriocarpa</i>	Có quả bào tử, hình cầu hoặc gần hình cầu.	Có màu nâu hoặc nâu nhạt	120-175	Thành bào tử dày, có vách ngăn.
	<i>Bireticulata</i>	Hình cầu, dạng quả lê	Có màu nâu nhạt hoặc vàng nhạt	150-200	Thành bào tử dày, có 3-4 lớp.
	<i>Lacunose.</i>	Hình cầu	Có màu nâu hoặc nâu nhạt	120-175	Thành bào tử mỏng, 1-2 lớp
<i>Entrophora</i>	<i>colombiana</i>	Hình cầu hoặc hình trứng	Có màu nâu nhạt hoặc màu vàng nhạt	120-200	Thành bào tử có 3 lớp chia làm 2 nhóm
	<i>schneckii.</i>	Hình cầu, hình tròn	Có màu nâu nhạt hoặc màu vàng	150-200	Thành dày chia bào tử thành 3 lớp.
<i>Sclerocystis</i>	<i>Coccogena</i>	Bào tử có dạng hình cầu, gần hình cầu, elip	Có màu nâu nhạt	100-150	Thành bào tử mỏng có 2 lớp.
	<i>Coremioides</i>	Bào tử có hình cầu,	Có màu nâu, nâu đậm	120-180	Thành bào tử có 3 lớp, chia làm 2 nhóm.
<i>Glomites</i>	<i>Rhyniensis</i>	Hình cầu hoặc hình elip	Có màu nâu đậm	150-200	Thành bào tử có cấu trúc kiểu liên tiếp, gồm nhiều lớp.
<i>Gigaspora</i>	<i>Candida,</i>	Bào tử thường có hình cầu và gần hình cầu, một số có hình elip	Có màu nâu, nâu đậm, màu nâu đỏ	120-160	Thành bào tử có 3 lớp chia làm 2 nhóm
	<i>Albida</i>	Bào tử có dạng hình cầu, hoặc elip	Có màu vàng nhạt	120-150	Thành bào tử có cấu trúc nối tiếp, gồm 3 - 5 lớp.

Căn cứ về mặt hình thái có thể chia nấm rễ thành 3 loại chủ yếu: Nấm rễ ngoại cộng sinh, nấm rễ nội cộng sinh và nấm rễ nội ngoại cộng sinh.

* Nấm rễ ngoại cộng sinh (*Ectomycorrhiza*): Đây là một loại nấm hình thành mạng lưới Hartig trong gian bào tầng vỏ rễ và mô sợi nấm dày đặc trên bề mặt rễ của cây, không có mũ rễ, không có lông hút. Nấm rễ ngoại cộng sinh thường có màu sắc và hình dạng nhất định (có thể nhận thấy bằng mắt thường).

* Nấm rễ nội cộng sinh (*Endomycorrhiza*): Đặc trưng là không có sự biến đổi màu sắc và hình thái của rễ, có lông hút, không có thể sợi nấm và không có mạng lưới Hartig. Nấm rễ nội cộng sinh gồm 2 loại là: nấm rễ nội cộng sinh không có màng ngăn (AEM) và sợi nấm nội cộng sinh có màng ngăn (SEM). Với loại SEM, khi giải phẫu sẽ thấy bên trong tế bào biểu bì rễ có các túi bọt (*Vesicular*) và chùm (*Arbuscular*).

* Nấm rễ nội – ngoại cộng sinh (*Ectendomycorrhiza*): Mang đặc trưng của 2 loại nội cộng sinh và ngoại cộng sinh về hình thái cũng như sinh lý.

Hiện nay, người ta nhận thấy có 7 hình thức cộng sinh:

* *Arbuscular Mycorrhiza Fungi* (AMF): Cộng sinh kiểu tạo bụi (chùm).

* *Ectomycorrhizas* (ECM): Nấm rễ ngoại cộng sinh.

* *Orchid Mycorrhizas*: Nấm rễ cộng sinh với các cây họ Lan (*Orchidaceae*).

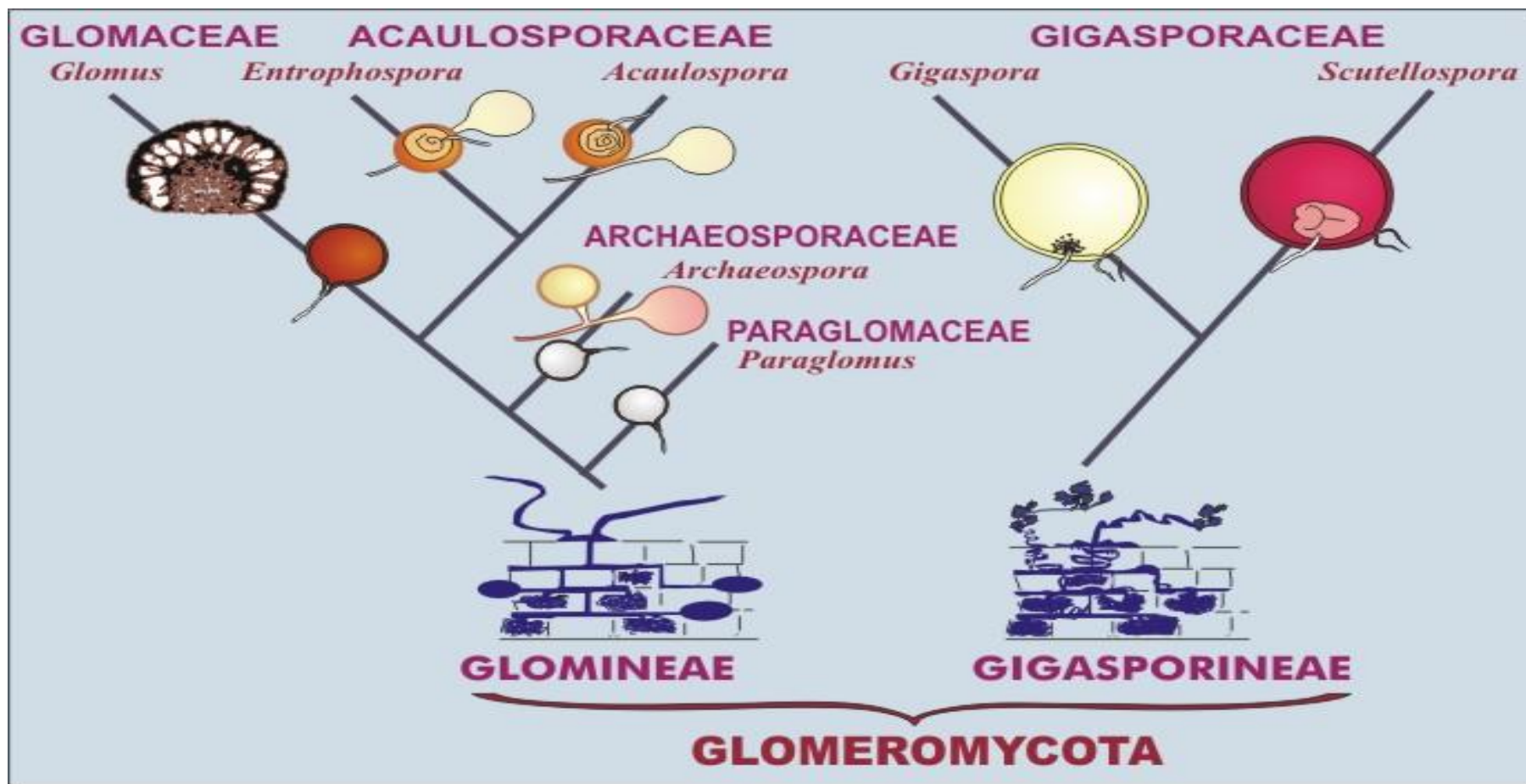
* *Ericoid Mycorrhizas*: Nấm rễ cộng sinh với các cây thuộc bộ Đỗ Quyên (*Ericales*).

* *Ectendo Mycorrhizas*: Nấm rễ nội – ngoại cộng sinh.

* *Arbutoid Mycorrhizas*: Nấm rễ có cả nội cộng sinh và ngoại cộng sinh nhưng chỉ xuất hiện giới hạn trong các chi *Arbutus*, *Arctostaphylos* và *Arctous* của họ Đỗ Quyên (*Ericaceae*).

* *Monotropoid Mycorrhizas*: Nấm rễ cộng sinh xuất hiện trong họ *Monotropaceae* của bộ Đỗ Quyên (*Ericales*).

Theo thống kê của Harley (1959), khoảng 3% số cây có hoa ở các loài cây gỗ và cây bụi có ECM, 90% các loài cây thân cỏ có AMF, ngoài ra một số loài cây gỗ có cả ECM và AMF [32].



Hình 1.2. Biểu đồ cây phát sinh chủng loại AMF

(<http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza> [62])

1.3. PHÂN LOẠI BÀO TỬ AMF

Thông thường, việc phân loại nấm nội cộng sinh chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái và cấu trúc (Bảng 1.1). Một trong những cơ sở quan trọng để phân loại theo hình thái là bảng màu của Morton. Phương pháp ADN và giải phẫu sẽ được dùng để đánh giá quan hệ ở mức cao hơn do Smith và Tinker đề xuất 1997 [51].

Nhìn chung, hệ thống phân loại AMF đang áp dụng dựa trên cơ sở hệ thống phân loại của Morton và Benny đưa ra vào năm 1990 và được hoàn chỉnh dần nhờ hàng loạt các nhà nghiên cứu tiếp đó [39].

Lịch sử hình thành hệ thống phân loại này trước hết phải kể đến việc hình thành chi *Endogone* năm 1808. Tiếp đó là chi *Glomus* do anh em Tulasne mô tả năm 1844. Đến năm 1849, tác giả Fries xây dựng nên họ *Endogonaceae*, sau đó họ này bị thay đổi do loài mới phát hiện có rất ít đặc điểm chung. Đây là thời điểm để hoàn thiện sự phân loại và phương pháp nhận biết tất cả các loại bào tử của AMF.

Năm 1959, Moss (nhà Giải phẫu thực vật) và Bowen (nhà Sinh thái học) đã đưa ra hệ thống mô tả dựa trên cấu trúc vách tế bào, màu sắc và đặc điểm tế bào chất [40]. Tuy nhiên, khi áp dụng phương pháp này thì Gerdermann đã phát hiện ra rằng *Endogone* có số lượng loài rất lớn, cần phải xem xét lại và tác giả đã chia *Endogone* thành 7 chi với 3 chi không cộng sinh: *Endogone*, *Modicella*, *Glaziella* và 4 chi cộng sinh: *Glomus*, *Sclerocystics*, *Gigaspora*, *Acaulospora* (trong đó *Gigaspora* và *Acaulospora* là 2 chi mới) [31].

Với hệ thống phân loại của Gerdermann, Viện Nghiên cứu sinh học – Viện Hàn lâm khoa học Ấn Độ đã phân lập từ đất vườn ươm 4 chi AMF: *Glomus*, *Sclerocystics*, *Gigaspora*, *Acaulospora* và 1 chi không cộng sinh (*Endogone*).

Năm 1982, Trappe và Schenck đã đề xuất đưa 5 loài AMF ra khỏi chi *Sclerocystis* để hình thành chi mới *Scutellospora* [58], đến năm 1987 Walker cũng đề xuất như trên [60]. Năm 1990, tác giả Morton và Benny đặt 5 chi của Walker vào 3 họ: *Glomaceae*, *Gigasporaneae*, *Acaulosporaceae* và 2 bộ phụ: *Glomineae*, *Gigasporineae*, trong đó 2 bộ phụ này được đặt trong bộ mới *Glomales* [39].

Năm 1998, Trung tâm Nghiên cứu AMF của Đài Loan (*Arbuscular mycorrhizal fungal Collection center in Taiwan – ACT*) đề nghị công nhận 2 chi mới là *Glomites* và *Jimtrappea*. Hiện nay, hệ thống phân loại của ACT thường được sử dụng ở các nước châu Á.

Năm 2008, Shipra Singh và đtg tiếp tục công bố thêm 2 họ AMF là: *Archacosporaceae* và *Paraglomaceae* với 2 chi mới là: *Archacospora* và *Paraglomus* [49].

1.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MYCORRHIZA

Phương pháp tách bào tử

Muốn tiến hành phân loại thì công việc đầu tiên là tách bào tử từ đất. Thông thường, bào tử được tách bằng sàng ướt và lọc. Phương pháp này được sử dụng để lọc tuyến trùng từ đất do Gerdermann đã cải biên cho phù hợp với nấm nội cộng sinh [32]. Trên cơ sở đó nhóm tác giả Daniel và Skipper (1982) và tiếp sau đó tác giả Tommerup (1992) đã cải tiến thành phương pháp sàng ướt (*wet sieving*) qua rây kết hợp với ly tâm trong thang nồng độ của sucrose (dịch 50%) [25, 56].

Quan sát, đếm số lượng bào tử

Tùy vào kích cỡ, quá trình quan sát bào tử có thể được thực hiện trên kính lúp hoặc kính hiển vi có độ phóng đại nhỏ. Số lượng bào tử được xác định bằng phương pháp đếm trực tiếp trên màng lọc có chia ô của hãng Satorrius [24].