

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

**NGUYỄN THỊ GIANG**

**NGHIÊN CỨU**  
**ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG VÀ GIÁ THỂ MÔ RỄ ĐẾN**  
**KHẢ NĂNG NHÂN SINH KHỐI CỘNG SINH NĂM RỄ AM**  
**(*ARBUSCULAR MYCORRHIZA*)*IN VITRO***

**Chuyên ngành: VI SINH VẬT HỌC**

**Mã số: 60 42 40**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: TS.LÊ QUỐC HUY**

**Hà Nội– Năm 2012**

## LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ của các thầy cô, các anh chị và gia đình.

*Với tất cả tấm lòng chân thành, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Lê Quốc Huy*, Phòng Công nghệ vi sinh và Sinh học môi trường, Trung tâm Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, người đã tận tình giúp đỡ, chỉ bảo, hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu, góp ý và sửa chữa để tôi hoàn thiện luận văn này.

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến tập thể cán bộ, giáo viên bộ môn Vi sinh vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật*, những người Thầy đã giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập, tạo mọi thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám Hiệu, Phòng Đào Tạo sau Đại Học Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi, hướng dẫn, giúp đỡ tôi thực hiện luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn CN. Ngô Thị Thanh Huệ và tập thể cán bộ Phòng Công nghệ vi sinh và Sinh học môi trường cũng như tập thể cán bộ thuộc Trung tâm Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam đã dành cho tôi sự giúp đỡ quý báu và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện đề tài.

Xin cảm ơn các bạn đã động viên, ủng hộ tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới gia đình thân yêu của tôi, những người đã luôn ở bên tôi, ủng hộ, động viên và là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập hoàn thành khóa học này./.

*Hà Nội, ngày 15 tháng 11 năm 2012*

**Tác giả luận văn**

*Nguyễn Thị Giang*

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học của tôi.

Các số liệu và kết quả trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác./.

**Tác giả luận văn**

*Nguyễn Thị Giang*

## MỤC LỤC

<b>MỞ ĐẦU</b> .....	1
1.1. Đặt vấn đề.....	2
1.2. Mục tiêu đề tài.....	2
1.2.1. Mục tiêu chung.....	2
1.2.2. Mục tiêu cụ thể.....	2
1.3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.....	2
1.3.1. Ý nghĩa khoa học.....	2
1.3.1. Ý nghĩa thực tiễn.....	2
1.4. Phạm vi nghiên cứu.....	2
<b>Chương 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU</b> .....	3
1.1. Tổng quan về nấm rễ nội cộng sinh AM.....	3
1.1.1. Khái niệm.....	3
1.1.2. Đặc điểm của Nấm rễ nội cộng sinh AM( <i>Arbuscular mycorrhiza</i> ).....	4
1.1.3. Vai trò của nấm rễ nội cộng sinh với cây chủ.....	9
1.2. Tổng quan về vi khuẩn <i>Agrobacterium rhizogense</i> .....	12
1.3. Nghiên cứu nấm rễ nội cộng sinh trên Thế giới và Việt Nam.....	13
1.3.1. Trên thế giới .....	13
1.3.2. Trong nước .....	19
<b>Chương 2. VẬT LIỆU - NỘI DUNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> ...	22
2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	22
2.2. Nội dung nghiên cứu.....	23
2.2.1. Nghiên cứu tạo vật liệu giá thể mô rễ <i>in vitro</i> .....	23
2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân sinh khối cộng sinh nấm rễ AM <i>in vitro</i> .....	23
2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân sinh khối cộng sinh nấm rễ AM <i>in vitro</i> .....	23
2.2.4. Đánh giá ảnh hưởng của giá thể mô rễ đến khả năng nhân sinh khối cộng sinh nấm rễ AM <i>in vitro</i> .....	23
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	24

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm.....	24
2.3.2. Phương pháp tạo vật liệu mô rễ <i>in vitro</i> .....	24
2.3.3. Phương pháp cấy chuyển và nhân sinh khối mô rễ .....	28
2.3.4. Phương pháp tạo cộng sinh AM <i>in vitro</i> .....	28
2.3.5. Phương pháp nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> .....	29
2.3.6. Phương pháp thu thập, phân tích và xử lý thống kê số liệu thí nghiệm.....	29
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN</b> .....	31
3.1. Kết quả tạo vật liệu giá thể mô rễ <i>in vitro</i> .....	31
3.2. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> .....	32
3.3. Đánh giá ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> .....	38
3.4. Đánh giá ảnh hưởng của giá thể mô rễ đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> .....	44
<b>Chương 4. KẾT LUẬN - TỒN TẠI - KIẾN NGHỊ</b> .....	50
4.1. Kết luận.....	50
4.2. Tồn tại và kiến nghị.....	51
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	52
<b>PHỤ LỤC</b> .....	58

## BẢNG NHỮNG TỪ VIẾT TẮT TRONG LUẬN VĂN

STT	Viết tắt	Viết đầy đủ
1	AM	<i>Arbuscular mycorrhiza</i>
2	EM	<i>Ectomycorrhiza</i>
3	IBA	Indole butylic acid
4	IP	Infective propagules
5	M	Minimal medium
6	MS	Murashige and Skoog medium
7	MSR	Strullu and Romand medium
8	PCR	Polymerase chain reaction
9	Ri-tDNA	Root inducing –transfer Deoxyribonucleic acid
10	rRNA	Ribosomal Ribonucleic acid
11	TY	trypton-yeast extract medium
12	VAM	<i>Vesicular arbuscular mycorrhiza</i>
13	VM	<i>Vesicular mycorrhiza</i>

## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng 3.1:</b> Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng 41833 với giá thể mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA.....	32
<b>Bảng 3.2:</b> Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng M7 với giá thể mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA.....	34
<b>Bảng 3.3:</b> Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng 41833 với giá thể mô rễ Medicago chuyển gen Ri-tDNA.....	35
<b>Bảng 3.4:</b> Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng M7 với giá thể mô rễ Medicago chuyển gen Ri-tDNA.....	36
<b>Bảng 3.5:</b> Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng 41833 với giá thể mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA.....	38
<b>Bảng 3.6:</b> Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng M7 với giá thể mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA.....	40
<b>Bảng 3.7:</b> Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng 41833 với giá thể mô rễ Medicago chuyển gen Ri-tDNA.....	41
<b>Bảng 3.8:</b> Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng M7 với giá thể mô rễ Medicago chuyển gen Ri-tDNA.....	42
<b>Bảng 3.9:</b> Ảnh hưởng của các loại giá thể mô rễ khác nhau đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> trên chủng 41833.....	45
<b>Bảng 3.10:</b> Ảnh hưởng của các loại giá thể mô rễ khác nhau đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> trên chủng M7.....	48

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

<b>Biểu đồ 3.1:</b> Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng 41833 với giá thể mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA.....	33
<b>Biểu đồ 3.2:</b> Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng M7 với giá thể mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA.....	35
<b>Biểu đồ 3.3:</b> Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng 41833 với giá thể mô rễ Medicago chuyển gen Ri-tDNA.....	36
<b>Biểu đồ 3.4:</b> Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng M7 với giá thể mô rễ Medicago chuyển gen Ri-tDNA.....	37
<b>Biểu đồ 3.5:</b> Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng 41833 với giá thể mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA.....	39
<b>Biểu đồ 3.6:</b> Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng M7 với giá thể mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA.....	41
<b>Biểu đồ 3.7:</b> Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng 41833 với giá thể mô rễ Medicago chuyển gen Ri-tDNA....	42
<b>Biểu đồ 3.8:</b> Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> giữa chủng M7 với giá thể mô rễ Medicago chuyển gen Ri-tDNA.....	43
<b>Biểu đồ 3.9:</b> Kết quả nhân sinh khối AM <i>in vitro</i> của 41833-Cà rốt Ri-tDNA, M7-Cà rốt Ri-tDNA, 41833-Medicago Ri-tDNA, M7-Medicago Ri-tDNA trên môi trường MSR 0,5% agar, pH 5,5.....	44
<b>Biểu đồ 3.10:</b> Ảnh hưởng của các loại giá thể mô rễ khác nhau đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> trên chủng 41833.....	46
<b>Biểu đồ 3.11:</b> Kết quả nhân sinh khối AM <i>in vitro</i> của 4 loại giá thể mô rễ	



cộng sinh với chủng 41833 trên môi trường MSR 0,5% agar, pH 5,5.....	47
<b>Biểu đồ3.12:</b> Ảnh hưởng của các loại giá thể mô rễ khác nhau đến nhân sinh khối cộng sinh AM <i>in vitro</i> trên chủng M7.....	49
<b>Biểu đồ3.13:</b> Kết quả nhân sinh khối AM <i>in vitro</i> của 4 loại giá thể mô rễ cộng sinh với chủng M7 trên môi trường MSR 0,5% agar, pH 5,5.....	49

## DANH MỤC HÌNH

<b>Hình 1.1:</b> Cây phân loại nấm rễ nội cộng sinh AM.....	5
<b>Hình 1.2.a:</b> Búi sợi nấm ( <i>Arbuscules</i> ).....	6
<b>Hình 1.2.b:</b> Túi sợi nấm ( <i>Vesicules</i> ).....	6
<b>Hình 1.3.a :</b> Sợi nấm ngoại bào(extraradical hyphae) .....	7
<b>Hình 1.3.b :</b> Bào tử (spores) .....	7
<b>Hình 1.4:</b> Sơ đồ cấu trúc AM điển hình.....	8
<b>Hình 1.5.a:</b> Cây <i>Medicago truncatula</i> phát triển bình thường.....	11
<b>Hình 1.5.b:</b> Cây <i>Medicago truncatula</i> có cộng sinh nấm rễ.....	11
<b>Hình 1.6:</b> Cấu trúc vòng Ri-plasmids của vi khuẩn <i>A. rhizogenes</i> (Veena and Taylor 2007).....	13
<b>Hình 2.1.a:</b> Gieo hạt <i>Medicago</i> .....	24
<b>Hình 2.1.b:</b> Rễ <i>Medicago</i> phát triển sau 5 ngày.....	24
<b>Hình 2.2.a:</b> Hạt Cà rốt nảy mầm sau 4 ngày gieo hạt.....	25
<b>Hình 2.2.b:</b> Rễ Cà rốt không chuyển gen Ri-tDNA phát triển sau 30 ngày.....	25
<b>Hình 3.1.a :</b> Rễ Cà rốt không có gen Ri-tDNA.....	31
<b>Hình 3.1.b :</b> Rễ Cà rốt có gen Ri-tDNA.....	31
<b>Hình 3.2.</b> Phân tích PCR cho mô rễ Cà rốt chuyển gen Ri-tDNA và không chuyển gen Ri-tDNA. Bảng 1: có gen rolB; bảng 2: có gen rolC (cho mẫu chuyển gen); bảng 3 và 4: không có gen rolB và rolC (cho mẫu không chuyển gen); M: DNA thang chuẩn 100 bp (Fermentas).....	32
<b>Hình 3.3.a:</b> Rễ <i>Medicago</i> không có gen Ri-tDNA.....	32
<b>Hình 3.3.b:</b> Rễ <i>Medicago</i> có gen Ri-tDNA.....	32
<b>Hình 3.4.a:</b> Rễ cộng sinh phát triển trên môi trường MSR 0,5% agar.....	37
<b>Hình 3.4.b:</b> Rễ cộng sinh phát triển trên môi trường MSR lỏng.....	37
<b>Hình 3.4.c:</b> Rễ cộng sinh phát triển trên môi trường MS 0,5% agar.....	37
<b>Hình 3.5.a:</b> AM cộng sinh vào rễ Cà rốt và sinh trưởng sợi nấm mới.....	45
<b>Hình 3.5.b:</b> AM cộng sinh vào rễ <i>Medicago</i> và sinh trưởng sợi nấm mới.....	45
<b>Hình 3.6.a:</b> Sinh sản bào tử AM trên giá thể Cà rốt có Ri-tDNA sau 1 tháng.....	50
<b>Hình 3.6.b:</b> Sinh sản bào tử AM trên giá thể Cà rốt có Ri-tDNA sau 4 tháng.....	50