

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



NGUYỄN ĐÌNH LUYỆN



**PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ
HIỆU QUẢ SỬ DỤNG CHẾ PHẨM NẤM VÙNG RỄ TRÊN
MỘT SỐ CÂY NÔNG NGHIỆP**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC



Hà nội, 2013

LỜI CẢM ƠN

Trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Lê Mai Hương đã tận tình chỉ bảo, hướng cho tôi những phương pháp luận hết sức căn bản nhưng vô cùng giá trị để tôi có những định hướng cho luận văn của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Trần Thị Như Hằng chủ nhiệm đề tài nghị định thư Việt nam – Hungary đã tạo điều kiện cho tôi được đi đào tạo tại nước ngoài giúp tôi nâng cao kiến thức cũng như nội dung của luận văn được tốt hơn.

Tôi xin cảm ơn GS. Katalin. Posta và cộng sự., trường Đại học quốc tế Szen Isvam, Cộng hòa Hungary. Đã giúp đỡ tôi học các kỹ thuật về phân lập bằng sinh học phân tử để hoàn thành kết quả luận văn.

Tôi xin cảm ơn các anh chị, bạn bè đồng nghiệp tại phòng sinh học thực nghiệm và Viện Hóa học các hợp chất Thiên nhiên đã tạo điều kiện về công việc, thời gian giúp tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn Lãnh đạo Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật, phòng đào tạo và các thầy cô giáo tại cơ sở đào tạo sau đại học Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã luôn quan tâm giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập tại Viện.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè đã luôn động viên, khuyến khích để tôi hoàn thành luận văn này./.

Hà nội, ngày tháng năm 2013

Tác giả luận văn

Nguyễn Đình Luyện

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học của tôi và tập thể phòng sinh học thực nghiệm. Các số liệu được sử dụng tham khảo có nguồn gốc trích dẫn rõ ràng, các kết quả trong luận văn là hoàn toàn trung thực.

Nguyễn Đình Luyện

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Al	Nhôm
AM	Arbuscular mycorrhizza
CĐTHN	Cường độ thoát hơi nước
CPU	Colony Forming Unit – Đơn vị hình thành khuẩn lạc
ĐDKK	Độ dẫn khí không
EM	Ectomycorrhiza
Fe	Sắt
IAA	Indole-3-acctic acid
MT	Môi trường
N	Nitơ
P	photpho
SPAD	Hàm lượng diệp lục
TCA	Trichloacetic acid (axit tricloaxetic)
VAM	Vesicular-Arbuscular mycorrhizza
VSV	Vi sinh vật
VSVKĐ	Vi sinh vật kiểm định

PHỤ LỤC

Mở Đầu	1
1.1 ĐÀI CƯƠNG VỀ NẤM CỘNG SINH VÙNG RỄ.....	5
1.2. PHÂN LOẠI NẤM VÙNG RỄ.....	6
1.2.1 Nấm ngoại cộng sinh (Ectomycorrhiza (EM).....	6
1.2.2. Nấm rễ nội cộng sinh (Endomycorrhizal, AM).....	7
1.2.3. Các loại nấm rễ khác.....	8
1.3. SINH HỌC VÀ SINH THÁI HỌC NẤM VÙNG RỄ.....	9
1.3.1. Sự hình thành nấm cộng sinh vùng rễ.....	9
1.3.2. Tính chuyên hóa của nấm cộng sinh vùng rễ.....	11
1.4. VAI TRÒ NẤM CỘNG SINH VÙNG RỄ.....	12
1.4.1. Tăng khả năng hấp thụ P và dinh dưỡng của cây chủ.....	12
1.4.2. Hình thành chất kích thích sinh trưởng.....	13
1.4.3. Nâng cao sức chống chịu và thích nghi với môi trường của cây trồng....	13
1.4.4. Cải thiện môi trường xung quanh.....	14
1.4.5. Tăng khả năng kháng bệnh của cây trồng.....	15
1.5. NHỮNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG NẤM CỘNG SINH VÙNG RỄ.....	15
1.5.1. Trên thế giới.....	15
1.5.2. Ở Việt Nam.....	18
1.6. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT NÔNG NGHIỆP Ở VIỆT NAM.....	20
CHƯƠNG II: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	21
2.1. NGUYÊN LIỆU.....	23
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	23
2.1.2. Hóa chất và thiết bị thí nghiệm.....	23
2.1.2.1. Hóa chất.....	23
2.1.2.2. Thiết bị thí nghiệm.....	23
2.1.3. Môi Trường.....	23
2.1.3.1. Môi trường phân lập nấm vùng rễ.....	23
2.1.3.2. Môi trường nuôi cấy, lên men và giữ giống.....	24
2.1.3.3. Môi trường thử hoạt tính enzyme.....	24
2.1.3.4. Môi trường đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng.....	24
2.1.4. Các dung dịch nhuộm.....	25
2.1.4.1. Dung dịch nhuộm rễ.....	25
2.1.4.2. Dung dịch nhuộm bào tử.....	25
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	25
2.2.1. Phân lập nấm vùng rễ.....	25
2.2.1.1. Phương pháp thu thập mẫu.....	25
2.2.1.2. Phương pháp phân lập bào tử AM.....	25
2.2.1.3. Phương pháp phân lập các chủng nấm vùng rễ (EM).....	26
2.2.2. Phương pháp phân loại bằng hình thái và sinh học phân tử.....	26
2.2.2.1. Phân loại các chủng nấm AM.....	26

2.2.2.2. Phân loại các chủng nấm EM	27
2.2.3. Tuyển chọn các chủng nấm hữu hiệu để sản xuất chế phẩm thử nghiệm	28
2.2.3.1. Phương pháp thử hoạt tính enzyme phosphatase của nấm vùng rễ (EM).....	28
2.2.3.2. Phương pháp định lượng khả năng phân giải photphat khó tan	28
2.2.3.3. Xác định khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của các chủng nấm vùng rễ.....	29
2.2.3.4. Xác định khả năng đối kháng giữa các chủng nấm vùng rễ.....	29
2.2.3.5. Kiểm tra tính an toàn của các chủng nấm lựa chọn	29
2.2.4. Tạo chế phẩm thử nghiệm trong quy mô phòng thí nghiệm.	30
2.2.4.1. Lên men các chủng nấm lựa chọn tạo sinh khối vi sinh vật.....	30
2.2.4.2. Quy trình phối trộn tạo chế phẩm ở quy mô phòng thí nghiệm	31
2.2.4.3. Kiểm tra mật độ vi sinh trong chế phẩm theo thời gian.....	31
2.2.5. Thử nghiệm chế phẩm.....	32
2.2.5.1. Thử nghiệm chế phẩm trên cây lúa	32
2.2.5.2. Thử nghiệm chế phẩm trên cây cà chua.....	32
2.2.5.3. Thử nghiệm trên cây khoai tây.....	33
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	33
3.1. THU THẬP MẪU	35
3.2. PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH TÊN CÁC CHỦNG NẤM RỄ	35
3.3. PHÂN LẬP CÁC CHỦNG NẤM RỄ (EM) TỪ CÁC MẪU RỄ CÂY.	40
3.4. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ENZYME NGOẠI BÀO CÁC CHỦNG NẤM (EM)	40
3.4.1. Hoạt tính enzyme của các chủng nấm vùng rễ (EM)	41
3.4.2. Định lượng khả năng phân giải photphat khó tan.	42
3.4.3. Đánh giá khả năng sinh tổng hợp indolacetic axit (IAA) thô của các chủng nấm	43
3.4.4. Xác định khả năng đối kháng của các chủng nấm vùng rễ.	44
3.4.5. Kiểm tra độ an toàn của các chủng nấm lựa chọn.....	44
3.4.6. Định tên phân loại một số chủng nấm vùng rễ và lựa chọn tạo chế phẩm thử nghiệm.....	45
3.4.7. Nghiên cứu các điều kiện lên men tạo chế phẩm thử nghiệm.....	53
3.4.7.1. Ảnh hưởng của môi trường lên men.....	53
3.4.7.2. Ảnh hưởng của pH môi trường lên men.	54
3.4.7.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ	54
3.4.7.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi.....	55
3.4.8. Tạo chế phẩm thử nghiệm.....	56
3.4.9. Thử nghiệm chế phẩm.....	57
3.4.9.1. Thử nghiệm trên cây lúa.....	55
3.4.9.2. Thử nghiệm trên cây cà chua.	63
3.4.9.3. Thử nghiệm trên cây Khoai tây.....	67
KẾT LUẬN	71
KIẾN NGHỊ.....	72

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN LUẬN VĂN
TÀI LIỆU THAM KHẢO
PHỤ LỤC

PHỤ LỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh nấm rễ ngoại cộng sinh	7
Hình 1.2. Hình ảnh nấm rễ nội cộng sinh.....	8
Hình 3.1. Số lượng bào tử AM tổng số trên 1g đất phân lập được.....	36
Hình 3.2. Hình ảnh bào tử phân lập được dưới kính hiển vi điện tử.....	36
Hình 3.3. Hình ảnh khả năng cộng sinh của bào tử AM sau nhân nuôi bảo tồn trên cây Mã đề Ribwort.	37
Hình 3.4. Khả năng sinh tổng hợp IAA thô và phân giải phot phát khó tan của các chủng nấm lựa chọn	44
Hình 3.5. Hình ảnh khuẩn lạc và bào tử của chủng NR1	46
Hình 3.6. Ảnh hiển vi của <i>Penicillium vermiculatum</i> NR4.....	47
Hình 3.7. Ảnh hiển vi của <i>Penicillium levitum</i> NR5	48
Hình 3.8. Ảnh cuống sinh bào tử, bào tử (trái) và thể quả (ảnh phải) của chủng NR7	49
Hình 3.9. Khuẩn lạc và cơ quan sinh sản của chủng NR8	50
Hình 3.10. Khuẩn lạc và cơ quan sinh sản của chủng NR11.....	51
Hình 3.11. Khuẩn lạc và cơ quan sinh bào tử của chủng NR12.....	52
Hình 3.12. Ảnh hiển vi của <i>Trichoderma konilangbra</i> NR13.....	53

PHỤ LỤC BẢNG

Bảng 3.1. Số lượng bào tử AM tổng số /1g đất phân lập	35
Bảng 3.2. Bảng mô tả hình thái của một số bào tử nấm rễ.....	37
Bảng 3.3: Định tên một số bào tử nấm rễ.....	39
Bảng 3.4. Đánh giá hoạt tính enzyme phosphatase	41
Bảng 3.5. Khả năng phân giải phot phat của các chủng nấm lựa chọn	42
Bảng 3.6. Khả năng sinh tổng hợp IAA thô của các chủng nấm.....	43
Bảng 3.7. Khả năng đối kháng giữa các chủng lựa chọn	44
Bảng 3.8. Kết quả đánh giá độ an toàn của các chủng lựa chọn	45
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của môi trường nuôi đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm	53
Bảng 3.10. Ảnh hưởng pH của môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm	54
Bảng 3.11. Ảnh hưởng nhiệt độ đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm	54
Bảng 3.12. Ảnh hưởng thời gian nuôi đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm	55
Bảng 3.13. Mật độ vi sinh trong chế phẩm ở thời gian khác nhau.....	57
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm tới diện tích lá của giống lúa KD18 (dm ² /cây).....	58
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm tới khối lượng rễ khô của giống KD18 (g/cây)	59
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm tới khối lượng khô toàn cây của giống lúa KD18.	60
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm tới năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của giống lúa KD18.....	61
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm tới hàm lượng đạm, lân và kali trong đất (mg/100g đất)	62
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của nấm rễ với lượng lân bón khác nhau đến động thái tăng trưởng chiều cao thân chính của cây cà chua (đơn vị tính: cm)	64
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm đến sinh khối khô của cây cà chua.....	65
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm đến khả năng ra hoa đậu quả và năng suất cây cà chua Savior.....	66
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm tới kích thước quả cà chua.	66
Bảng 3.23. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm đến chiều dài thân chính và số lá trên thân chính qua các tuần theo dõi.	68
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm rễ đến khối lượng chất khô qua các giai đoạn sinh trưởng.....	68
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của các loại chế phẩm nấm rễ đến các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất	69
Bảng 3.26. Ảnh hưởng của các loại chế phẩm nấm rễ đến kích thước củ lúc thu hoạch (%)	69

