

XÁC ĐỊNH NẤM CỘNG SINH Mycorrhiza TRÊN RỄ CÂY HỒ TIÊU

Identification of Mycorrhiza in Blackpepper Roots

Lê Thị Kim Duyên¹, Trần Trọng Nghĩa¹, Trần Đỗ Hoàng²,
Trần Đào Uyên Đa³ và Lê Đình Đôn¹

Ngày nhận bài: 27.2.2019

Ngày chấp nhận: 11.3.2019

Abstract

Mycorrhiza was determined in rhizosphere and root of blackpepper trees by using the stained root samples collected from the fields and the inoculation test with mycorrhiza commercialized. Results indicated that four endomycorrhizae were detected such as *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Scutellopora*, with a frequency of mycorrhizal colonisation into roots from 5 to 31.3% and those spores were variation in sharps and abundance in rhizosphere of blackpepper tree. Data suggested that a technology for balancing and adapting of fertilizers imputed in order to reducing the costs and improving the sustainability based on organic model.

Keywords: Mycorrhiza, *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Scutellopora*,

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm cộng sinh (AMF) với thực vật là một hiện tượng phổ biến trong tự nhiên. Nhiều công trình nghiên cứu chứng minh vai trò của nấm cộng sinh như thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của cây trong điều kiện bất lợi của môi trường, ổn định cấu trúc và đặc tính sinh học của đất (Nguyễn Thị Giang, 2012). Các nghiên cứu của Anandaraj và cs. (1994) cho thấy AMF giúp tăng chất lượng cây hồ tiêu giống Panniyur-1 giai đoạn vườn ươm, giúp bộ rễ phát triển và hấp thu đầy đủ lân (P) (Thanuja và cs, 2002).

Nấm cộng sinh hiện diện trên rễ hồ tiêu trồng tại Việt Nam chưa được xác định và nghiên cứu. Nhằm sử dụng nấm cộng sinh như chỉ thị sinh học cho phục hồi vườn hồ tiêu bị “suy thoái” theo hướng hữu cơ và bền vững trước thực trạng biến đổi khí hậu, thâm canh lệch hướng, và giá hồ tiêu thay đổi như hiện nay, vai trò của AMF cần được minh chứng và xác định giúp định hướng cho người trồng hồ tiêu sử dụng AMF như tác nhân sinh học trong hệ canh tác hồ tiêu bền vững.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
2. Công ty Công ty Cổ phần Tập đoàn Lộc Trời
3. Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Phương pháp tách bào tử và nhận diện

AMF: Tháng 12 năm 2017, 50 mẫu rễ và đất được thu thập tại 5 vườn hồ tiêu giống Vĩnh Linh được trồng thuần, xen canh chuối, cà phê và điều, tại xã Láng Lớn, Xà Bang và Kim Long, huyện Châu Đức, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Bào tử nấm cộng sinh phân lập từ đất theo kỹ thuật sàng ướt (wet sieving) kết hợp với ly tâm trong dung dịch 50% sucrose (Brundrett và cs, 1996). Thu bào tử trên sàng rây 40 µm và đếm số bào tử dưới kính soi nổi. Nhận dạng nấm cộng sinh dựa vào hình dạng bào tử theo mô tả của Gerdermann (1963), Gerdemann và Trappe (1974). Dựa trên hình thái xâm nhiễm của sợi nấm, túi, cấu trúc cộng sinh theo mô tả của Brundrett và cs (1996).

Phương pháp chủng AMF vào rễ hồ tiêu:

Hom tiêu giống Vĩnh Linh được thu từ vườn tiêu không bổ sung nấm cộng sinh. Hom tiêu có 1 đốt được ngâm 2 phút trong Mexyl MZ 0,45% (w/v) và giâm vào cát đã hấp khử trùng. Sau 1 tháng lựa chọn những hom tương đồng về chiều cao chồi và số lá chuyển vào chậu chứa cát khử trùng, mỗi chậu 4 hom. Khi cây được 1 tháng bổ sung Rhizomyx 2.5G (Nhà cung cấp Novozymes - Mỹ) chứa 8 loài AM *Glomus mosseae*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus entunicatum*, *Glomus deserticola*, *Glomus clarum*, *Glomus monosporum*, và *Gigaspora margarita*. Đối chứng chủng nhiễm sử dụng cây con Cao lương và Ngô gieo từ hạt được xử lý bề mặt hạt.

Xác định nấm cộng sinh trên rễ: Sau chủng 2, 4, 6, 8 tuần, mẫu rễ (dài 1cm) được xử lý KOH 10% (w/v) trong 12 giờ, ngâm trong HCl 2% (v/v) trong 10 phút, sau đó rửa mẫu bằng nước cất. Rễ được nhuộm với trypan blue 0,02% (w/v) trong 12 giờ, quan sát dưới kính hiển vi để xác định sự hiện diện nấm cộng sinh.

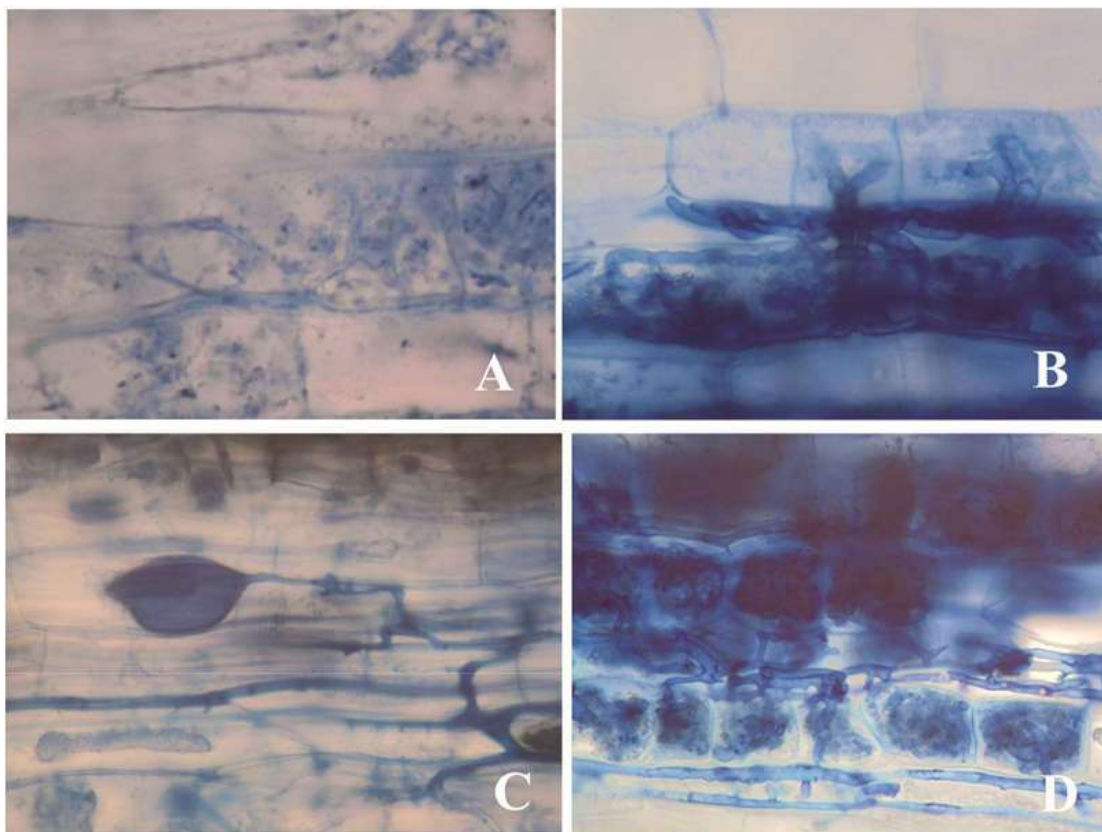
$$\text{Tỷ lệ rễ có cộng sinh} = \frac{\text{Tổng số đoạn rễ hiện diện AMF}}{\text{Tổng số đoạn rễ quan sát}} \times 100$$

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

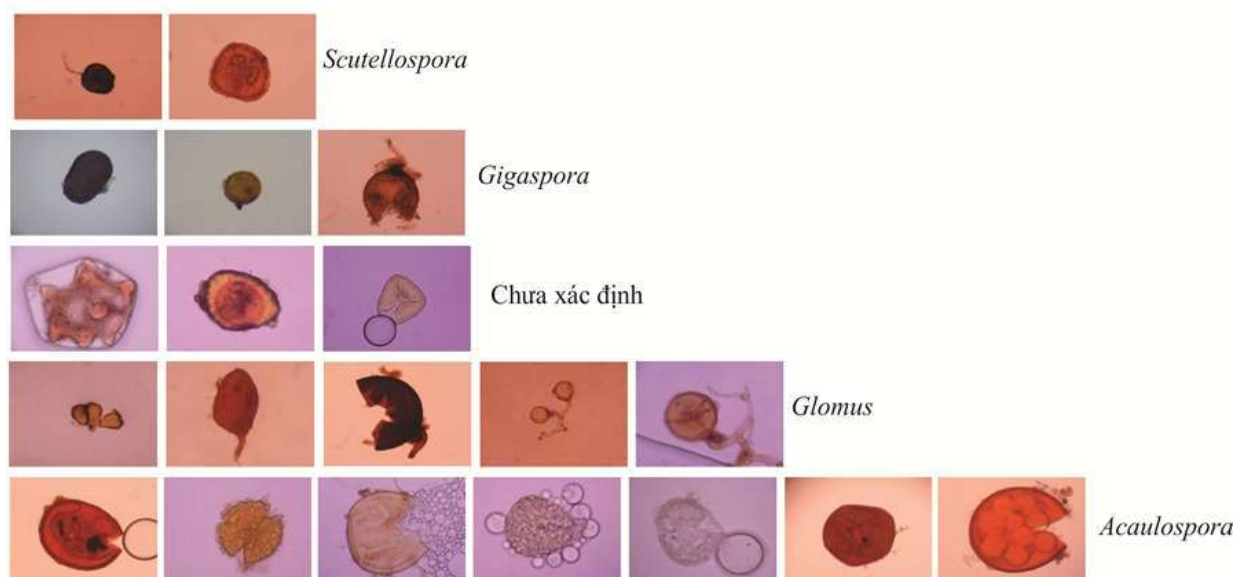
3.1. Xác định sự hiện diện nấm cộng sinh AMF trong đất và rễ cây hồ tiêu

Căn cứ vào kiểu xâm nhiễm, hình dạng cấu trúc dạng bụi (arbuscules) và túi (vesicles) theo mô tả của Brundrett và cs. (1996), có ít nhất 4 chi nấm cộng sinh được ghi nhận hiện diện trong rễ

cây hồ tiêu gồm *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora* và *Scutellospora*. Các chi nấm thuộc nhóm nội cộng sinh thiết lập hệ sợi và cấu trúc chuyên biệt trong mô rễ hồ tiêu giống Vĩnh Linh, trong đó chi *Acaulospora* phổ biến với tỷ lệ 100%, *Gigaspora* chiếm 80%, *Glomus* 40% và 20% mẫu rễ có *Scutellospora*. Dựa vào đặc điểm hình dạng, màu sắc, cuống bào tử, thành bào tử như được mô tả bởi Gerdermann (1963), Gerdemann và Trappe (1974), Brundrett và cs. (1996), đã phân lập được 17 kiểu hình bào tử, trong đó chi *Glomus* có 5 kiểu hình bào tử và *Acaulospora* xuất hiện nhiều nhất với 7 kiểu hình (hình 2). Sự xuất hiện nhiều kiểu hình bào tử cho thấy môi trường vùng rễ hồ tiêu trong các vườn lấy mẫu là phù hợp cho sự tồn tại của AMF và cần thiết xây dựng công thức dinh dưỡng cân bằng giúp AMF thiết lập quan hệ với rễ hồ tiêu.



Hình 1. Dạng cấu trúc sợi, bụi (arbuscules) và túi (vesicles) nấm AMF trong rễ hồ tiêu
 A. chi *Acaulospora*; B. chi *Gigaspora*; C. chi *Glomus*;
 D. *Scutellospora*, hình chụp ở vật kính 40X.



Hình 2. Các dạng bào tử AMF ghi nhận trong đất vùng rễ hồ tiêu Vĩnh Linh (Vật kính 40X)

Bảng 1. Mức độ cộng sinh với AMF trên hồ tiêu có điều kiện canh tác khác nhau

Vườn (mẫu)	Tuổi cây	Cây trồng xen	Cây phủ đất	Tỉ lệ (%) trung bình rễ có cộng sinh (thấp – cao nhất)	Số bào tử trong 50 g đất (thấp – cao nhất)	Chi AMF hiện diện trong rễ
V 1 (10)	7	Không	Cỏ	21 (10-50)	138 (83 – 209)	<i>Acaulospora</i> , <i>Gigaspora</i>
V 2 (10)	4	Chuối	Không cỏ	11 (0 – 23)	126 (81 – 164)	<i>Acaulospora</i> , <i>Glomus</i>
V 3 (10)	15	Điều + Cà phê	Không cỏ	14 (0 – 36)	132 (49 – 200)	<i>Acaulospora</i> , <i>Gigaspora</i>
V 4 (10)	5	Cà phê	Không cỏ	5 (0 – 20)	113 (83 – 148)	<i>Acaulospora</i> , <i>Gigaspora</i>
V 5 (10)	10	Điều + Cà phê	Cỏ	31 (0 – 80)	125 (82 – 208)	<i>Acaulospora</i> , <i>Gigaspora</i> , <i>Glomus</i> , <i>Scutellospora</i>

Tỉ lệ rễ cộng sinh không liên quan với mật số bào tử AMF trong đất, tuổi cây hồ tiêu, và loại cây hiện diện trong vườn hồ tiêu (bảng 1), tỉ lệ rễ có nấm cộng sinh rất thấp (0%) cho dù bào tử nấm luôn hiện diện trong đất vùng rễ tiêu, với ít nhất 49 bào tử/50 gram đất. Kết quả cho thấy, nấm nội cộng sinh, endomycorrhiza, hiện diện trong vùng rễ hồ tiêu và thiết lập hệ cộng sinh có đặc điểm của nhóm Arbuscular Mycorrhiza với cấu trúc chuyên biệt đã được phân lập và quan sát.

3.2 Xác định nấm cộng sinh AMF trên rễ cây hồ tiêu bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo

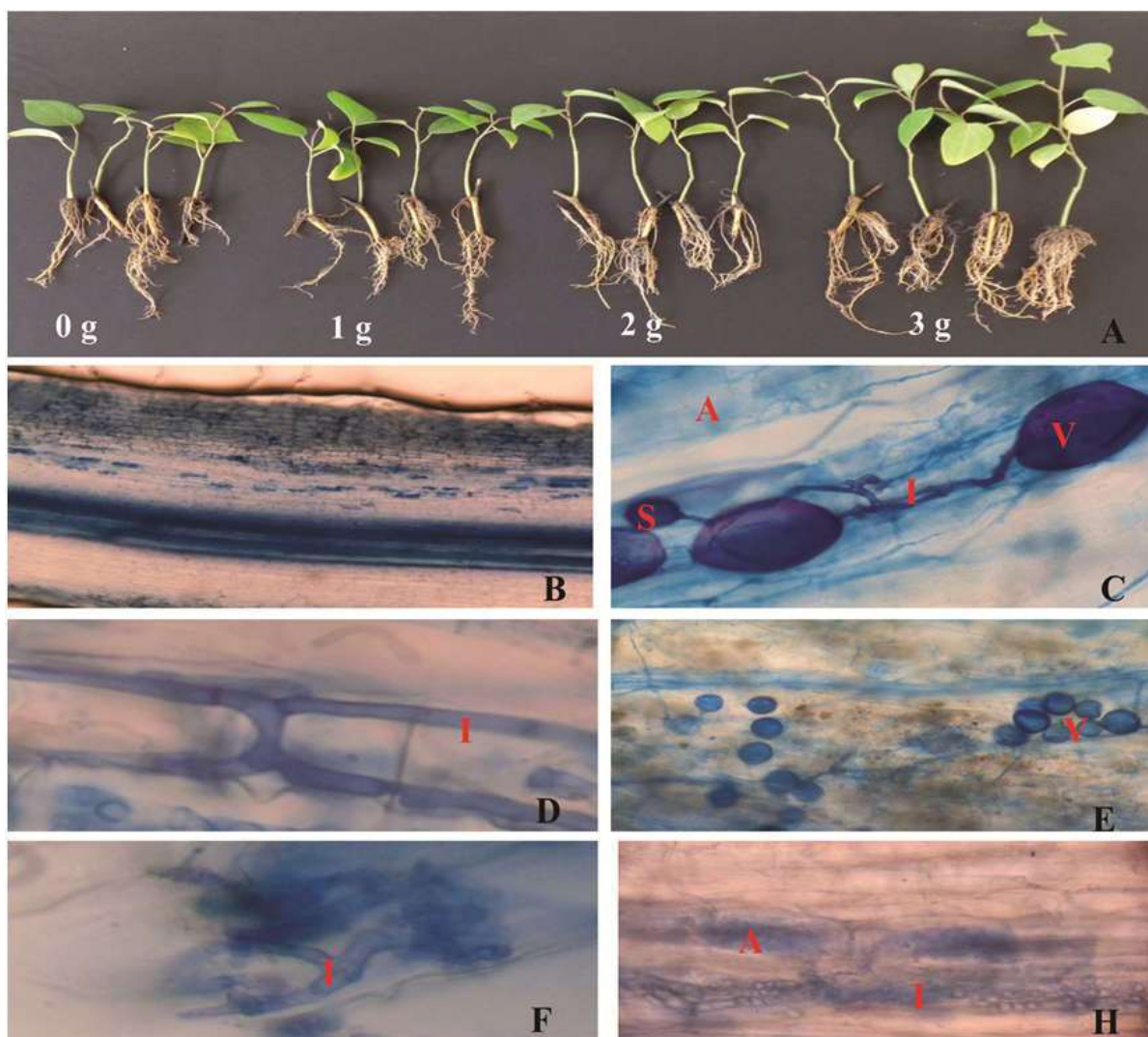
Trong điều kiện chủng thí nghiệm, sau 8 tuần

đã ghi nhận cấu trúc điển hình của AMF trong mô rễ hồ tiêu dưới kính hiển vi quang học (vật kính 40X), quan hệ cộng sinh có thể được thiết lập sớm hơn tuy nhiên khó phát hiện bởi kỹ thuật nhuộm tế bào. Ở đối chứng chủng nhiễm, rễ cây cao lương và ngô chỉ sau 2 tuần đã xác định có cấu trúc cộng sinh trên rễ. Quan sát tiêu bản mô rễ, ghi nhận sợi nấm nội bào (I) phát triển dọc theo chiều dài đoạn rễ, khi phân nhánh có dạng chữ “H” về 2 phía và bắt màu sẫm với trypan blue. Trong rễ, xuất hiện các túi (V) có màu sẫm hình bầu dục hoặc elip nằm giữa các tế bào rễ, cấu trúc bụi (A) trong rễ phân nhánh hình chữ “T”, đây là đặc điểm của chi *Glomus*.

Như vậy *Gigaspora margarita* không thiết lập thành công quan hệ cộng sinh với hồ tiêu, trong khi chi *Gigaspora* đã được ghi nhận trong rễ hồ tiêu trong điều kiện thực địa (hình 1) và *G. margarita* thiết lập quan hệ cộng sinh trên rễ ngô và cao lương (hình 3).

Bảng 2. Tỷ lệ rễ hồ tiêu thiết lập quan hệ cộng sinh với AMF được lây nhiễm nhân tạo

Công thức	Tỷ lệ cộng sinh (%)			
	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần
Hồ tiêu (không chủng)	0	0	0	0
Ngô (chủng 1 g Rhizomyx 2.5G)	5,3	64,0	-	-
Cao lương (chủng 1 g Rhizomyx 2.5G)	2,0	18,0	-	-
Hồ tiêu (chủng 1 g Rhizomyx 2.5G)	0	0	0	35,3
Hồ tiêu (chủng 2 g Rhizomyx 2.5G)	0	0	0	34,0
Hồ tiêu (chủng 3 g Rhizomyx 2.5G)	0	0	0	64,0



Hình 1. Nấm cộng sinh trong rễ hồ tiêu và cây chủng nhiễm Cao lương và Ngô
 C, cấu trúc điển hình của AMF; D, E, cấu trúc sợi và túi trong mô rễ Ngô; F, H, cấu trúc búi và sợi nấm trong mô rễ Cao lương. Vật kính 40X.

Nhiều nghiên cứu đã xác định nấm AMF có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng và phát triển của cây hồ tiêu, rõ nhất trong giai đoạn vườn ươm (Thanuja và cs, 2002). Mala và ctv (2010) xác định *Glomus mosseae* làm tăng sự phát triển của hệ rễ cây tiêu, đặc biệt trong điều kiện dinh dưỡng thấp. Wimalarathne và ctv (2014) cho rằng bón nấm AMF (*Funneliformis mosseae*) là phương pháp hữu ích để tăng cường sự phát triển của hom tiêu. Kandianan và ctv (2000) nhận thấy khi kết hợp 2 - 3 loại phân bón sinh học có nấm mycorrhiza làm tăng chiều cao, diện tích lá, và sinh khối vảy hồ tiêu trong vườn ươm. AMF cũng được chứng minh đã kiểm soát *Phytophthora capsici* trong đất, làm giảm tỉ lệ cây chết cây hồ tiêu con sau 9 tuần (Norma và cs, 2017). Đặc biệt, nấm AMF cộng sinh trong rễ đã kích thích sinh tổng hợp các chất thứ cấp, tinh dầu, và kháng oxi hóa ở phần trên của cây (Shirley và cs, 2016).

Kết quả đã xác định cây hồ tiêu và nấm AMF đã thiết lập quan hệ cộng sinh trong thực tế đồng ruộng và chủng nhân tạo, là cơ sở cho sử dụng AMF như là tác nhân sinh học trong bảo vệ cây hồ tiêu, chuyển hóa dinh dưỡng, cải thiện sức khỏe của cây, và là chỉ thị sinh học cho sức khỏe của đất vùng rễ hồ tiêu.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã xác nhận cây hồ tiêu đã thiết lập quan hệ cộng sinh với ít nhất 4 chi nấm thuộc nhóm nội cộng sinh gồm *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* và *Scutellopora*, với tỉ lệ rễ cộng sinh từ 5 đến 31,3% và bào tử nấm rất đa dạng kiểu hình hiện diện phổ biến trong đất vùng rễ hồ tiêu.

Glomus cần ít nhất 8 tuần để thiết lập quan hệ cộng sinh với hồ tiêu, với tỉ lệ rễ có nấm cộng sinh liên quan đến nguồn chủng ban đầu.

Đề nghị

Sử dụng chế phẩm chứa nấm rễ cộng sinh AMF vào giai đoạn giâm hom hồ tiêu giống hoặc bón vào thời điểm trồng sẽ giúp thiết lập hệ cộng sinh cho cây hồ tiêu. Cần nghiên cứu bón phân hữu cơ và cân đối lượng phân vô cơ, đặc biệt đạm và lân nhằm duy trì và gia tăng tỉ lệ rễ cộng sinh giúp gia tăng sức chống chịu của cây và duy trì sức khỏe của đất.

Lời cảm ơn

Các tác giả cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Thuận hỗ trợ nguồn kinh phí, Công ty Harris Freeman Việt Nam và Công ty Cổ phần Tập đoàn Lộc Trời đã tạo điều kiện cho thực hiện một phần nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brundrett, M.C., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., and Malajczuk, N., 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
2. Gerdemann, J.W., 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Brit. mycol. Soc. 46:235 - 244.
3. Gerdemann, J.W and Trappe, J.M., 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir* 5: 1 - 76.
4. Kandianan, K., Sivaraman, K., Anandaraj, M. and Krishnamurthy, K.S., 2000. Growth and nutrient content of black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings as influenced by inoculation with biofertilizers. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 9:145-147.
5. Nguyễn Thị Giang, 2012. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường và giá thể mô rễ đến khả năng nhân sinh khối cộng sinh nấm rễ *Arbuscular mycorrhiza* in vitro. Luận văn Thạc sĩ Sinh học. Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.
6. Norma Fauziyah, Bambang Hadisutrisno, and S Suryanti, 2017. The roles of arbuscular mycorrhizal fungi in the intensity of the foot rot disease on pepper plant from the infected soil. *Journal of Degraded and Mining Lands Management* 4: 937 – 943.
7. Shirley F. M. da Luz, Laiany de A. Reis, Oriel F. de Lemos, José Guilherme S. Maia, Andréa H. de Mello, Alessandra R. Ramos, and Joyce Kelly R. da Silva, 2016. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the essential oil composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.). *International Journal of Applied Research in Natural Products* 9:10-17.
8. Thanuja T.V., Ramakrishna V. Hegde, and M.N. Sreenivasa, 2002. Induction of rooting and root growth in black pepper cuttings (*Piper nigrum* L.) with the inoculation of arbuscular mycorrhizae. *Scientia Horticulturae* 92: 339-346.

Phản biện: TS. Ngô Vĩnh Viễn