

Dự thảo

TCVN.....:2017

**PHÂN BÓN VI SINH VẬT – PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH MẬT
ĐỘ NẤM RỄ NỘI CỘNG SINH. PHẦN 2. KỸ THUẬT XÁC
ĐỊNH KHẢ NĂNG CỘNG SINH CỦA CÁC CHỦNG NẤM RỄ
NỘI CỘNG SINH VỚI CÂY TRỒNG**

*Microbial fertilizers - Method for the determination of Endomycorrhizae density.
Part 2. Assessment technique of infectivity ability of Endomycorrhizae with crops*

HÀ NỘI – 2017

Lời nói đầu

TCVN:2017 do Viện Thổ nhưỡng Nông hóa biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Phân bón vi sinh vật – Phương pháp xác định mật độ nấm rễ nội cộng sinh Phần 2. Kỹ thuật xác định khả năng cộng sinh của các chủng nấm rễ nội cộng sinh với cây trồng

Microbial fertilizers - Method for the determination of Endomycorrhizae density. Part 2. Assessment technique of infectivity ability of Endomycorrhizae with crops

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định mật độ nấm rễ nội cộng sinh Mycorrhiza (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) trong phân bón vi sinh vật bằng kỹ thuật xác định khả năng cộng sinh của các chủng nấm rễ nội cộng sinh với cây trồng.

2 Tài liệu viện dẫn

Tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng cho phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Thuật ngữ, định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ, định nghĩa sau.

3.1

Nấm rễ nội cộng sinh (Endomycorrhiza hoặc Arbuscular Mycorrhiza Fungi)

Là nhóm nấm thuộc họ *Glomereace*, cộng sinh với rễ thực vật mà không làm biến đổi màu sắc và hình thái của rễ, có lông hút, không có thể sợi nấm và không có mạng lưới Hartig (nhiều sợi nấm xuyên qua biểu bì vào các gian bào của mô biểu bì, từ mặt cắt ngang của túi nấm rễ có thể thấy dạng lưới được gọi là mạng lưới Hartig), khi giải phẫu cho thấy bên trong tế bào biểu bì rễ có các chùy (Arbuscular).

3.2

Bào tử nấm rễ nội cộng sinh (Endomycorrhiza spores)

Là bào tử sinh sản vô tính, hầu hết có hình cầu, một số loài có hình thoi hoặc dạng khác, kính thước khoảng 50 – 500 μm , được tạo thành từ sợi nấm trong đất hoặc rễ. Bào tử mọc đơn lẻ, thành chùm hoặc có dạng thể quả. Thành bào tử chứa một hoặc nhiều lớp có độ dày khác nhau. Màu sắc bào tử rất đa dạng, cấu tạo với nhiều lớp thành, vách chứa vài trăm đến vài ngàn nhân. Bên trong bào tử chứa lipit và những chất khác có dạng giống như những giọt nước có kích thước khác nhau.

3.3.

Tiềm năng xâm nhiễm (Infectivity potential)

Khả năng của các mầm/chồi nấm cộng sinh Mycorrhiza trong đất (mycorrhizal propagules) lây nhiễm vào hệ thống rễ của cây trồng.

3.4.

Phân bón vi sinh vật chứa nấm rễ nội cộng sinh (Mycorrhizal Biofertilizer)

Là phân bón vi sinh vật có chứa một lượng lớn mầm/chồi lây nhiễm, bao gồm: Bào tử, sợi nấm và các túi bọt (thể V – vesicles) trong những mảnh rễ... của một hoặc một tổ hợp vài chủng nấm rễ nội cộng sinh, cộng sinh với rễ thực vật, giúp cây tăng cường hấp thu các chất dinh dưỡng, nước, qua đó tăng sinh trưởng và năng suất cho cây trồng. Phân bón chứa nấm rễ nội cộng sinh phải có mật độ nấm rễ cộng sinh $\geq 10^2$ IP/g mẫu.

3.5.

Cây ký chủ (Host crop)

Là cây mà nấm rễ nội cộng sinh Mycorrhiza sống cộng sinh và tạo sự xâm nhiễm vào hệ thống rễ.

4 Nguyên tắc

Sử dụng phương pháp sinh học để xác định số lượng của các mầm/chồi lây nhiễm (infective propagules) nấm rễ nội cộng sinh trong mẫu phân bón vi sinh vật. Khi các mầm/chồi lây nhiễm tiếp xúc với rễ cây ký chủ, làm cho sợi nấm phồng lên, tạo điều kiện cho nấm Mycorrhiza xâm nhập vào rễ thông qua “điểm xâm nhiễm”. Khả năng cộng sinh (xâm nhiễm) của nấm rễ cộng sinh Mycorrhiza trong phân bón được đánh giá thông qua số lượng điểm xâm nhiễm bắt màu xanh với thuốc nhuộm Trypan blue.

5 Nước cất, dung dịch và thuốc nhuộm

5.1 Nước cất, đáp ứng các yêu cầu nước loại 3 trong TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987).

5.2 Dung dịch KOH nồng độ 10 %

Cân một lượng chính xác 100 g KOH bằng cân phân tích (6.1.1), cho vào bình định mức 1 000 ml (6.2.9), sau đó bổ sung thêm nước cất (5.1) đến vạch định mức để tạo dung dịch KOH nồng độ 10 %.

5.3 Dung dịch Lactoglycerol nồng độ 0,03 %

Lấy chính xác 867 ml axit lactic bằng pipet (6.2.12), cho vào cốc thủy tinh dung tích 1 000 ml (6.2.8), sau đó bổ sung 64 ml glycerin và 60 ml nước cất (5.1).

5.4 Thuốc nhuộm Trypan blue nồng độ 0,05 %

Cân một lượng chính xác 0,05 g trypan blue bằng cân phân tích (6.1.1), cho vào cốc thủy tinh (6.2.8) có chứa 100 ml dung dịch lactoglycerol nồng độ 0,03 % (5.3).

5.5 Dung dịch H₂O₂ kiểm

Lấy chính xác 3 ml dung dịch amoniac nồng độ 25 % bằng pipet (6.2.12), cho vào cốc thủy tinh (6.2.8), thêm tiếp tiếp 30 ml dung dịch H₂O₂ nồng độ 10 % và cuối cùng thêm 67 ml nước cất (5.1) để tạo ra dung dịch H₂O₂ kiểm.

5.6 Dung dịch H₂O₂ nồng độ 10 %

Lấy chính xác 10 ml dung dịch H₂O₂ nồng độ 30 % bằng pipet (6.2.12), cho vào cốc thủy tinh (6.2.8), thêm tiếp tiếp 20 ml nước cất (5.1) để tạo ra dung dịch H₂O₂ nồng độ 10 %.

5.7 Dung dịch ammoniac nồng độ 25 %

Cân chính xác 25 g NH₄OH bằng cân phân tích (6.1.1), cho vào bình định mức 1 00 ml (6.2.9), sau đó bổ sung thêm nước cất (5.1) đến vạch định mức để tạo dung dịch NH₄OH 25 %.

6 Thiết bị, dụng cụ, vật tư

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm và cụ thể như sau:

6.1 Thiết bị

6.1.1 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,001 mg.

6.1.2 Kính hiển vi soi nổi hoặc kính hiển vi thường, độ phóng đại tối thiểu 70 lần

6.1.3 Nồi hấp áp lực, áp suất tối thiểu 101,3 kPa, nhiệt độ 121 °C.

6.1.4 Tủ sấy, nhiệt độ từ 40 °C đến 260 °C

6.2 Dụng cụ

6.2.1 Chậu trồng cây, nhựa trung tính hoặc gốm, kích thước 5 cm x 7 cm

6.2.2 Kéo cắt, bằng thép không gỉ

6.2.3 Panh, bằng thép không gỉ

6.2.4 Đĩa petri hoặc khay, nhựa hoặc thủy tinh trung tính, có lưới chia ô

- 6.2.5 Lam kính**, thủy tinh trung tính
- 6.2.6 Lamén**, thủy tinh trung tính
- 6.2.7 Bình thủy tinh**, dung tích 500 ml
- 6.2.8 Cốc đong thủy tinh**, dung tích 500 ml, 1000 ml.
- 6.2.9 Bình định mức**, dung tích 100 ml, 1000 ml.
- 6.2.10 Ống eppendorf**, dung tích 2 ml, 5 ml, và 10 ml.
- 6.2.11 Ống nghiệm**, kích thước 13 mm x 100 mm.
- 6.2.12 Pipet (Micropipet)**, 1000 μ l đến 10000 μ l.

6.3 Vật tư

- 6.3.1 Cát sạch**, trung tính, được rửa sạch nhiều lần bằng nước sạch
- 6.3.2 Hạt giống**, hạt ngô, giống đã được xác nhận

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị

7.1.1 Dụng cụ, nguyên liệu

Các dụng cụ, cát sạch sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật và nuôi cây ký chủ phải được khử trùng bằng 1 trong 2 cách sau:

- Giữ ở nhiệt độ 121 °C không ít hơn 30 min trong nồi hấp áp lực (6.1.3) hoặc;
- Giữ ở nhiệt độ 180 °C không ít hơn 2 h trong tủ sấy (6.1.4)

7.1.2 Chuẩn bị mẫu

Trộn đều 100 gram mẫu phân bón vi sinh vật với 1 kg cát sạch đã chuẩn bị (7.1.1), sau đó cho vào chậu đã chuẩn bị sẵn (7.1.1);

Mỗi chậu trồng 10 – 12 hạt cây ký chủ (cây ngô);

Nuôi giữ cây trong 30 ngày khi nhiệt độ môi trường lớn hơn 25 °C hoặc 45 ngày khi nhiệt độ môi trường nhỏ hơn 25 °C;

Thu hoạch toàn bộ rễ cây trong chậu, dùng nước sạch dội nhẹ để rửa sạch cát bám trên toàn bộ vùng rễ.

Mỗi mẫu lặp lại ba lần.

7.2 Thực hiện

Cắt rễ thành các đoạn có chiều dài khoảng 1 cm bằng kéo cắt (6.2.2) và panh (6.2.3);

Đo tổng chiều dài rễ của mỗi mẫu bằng cách sử dụng phương pháp đường giao nhau (xem A1 trong phụ lục A);

Làm sạch rễ bằng cách nhúng rễ trong dung dịch KOH nồng độ 10 % (5.2);

Chọn ngẫu nhiên 100 đoạn rễ đã được làm sạch bằng dung dịch KOH nồng độ 10 % (5.2) và nhuộm bằng Trypan blue (5.4);

Nhuộm rễ bằng thuốc nhuộm Trypan blue (5.4) (xem A2 trong phụ lục A);

Làm tiêu bản, quan sát dưới kính hiển vi (6.1.2) ghi nhận đoạn rễ có quan sát thấy nấm.

7.3 Tính kết quả

Đếm tổng số điểm xâm nhiễm có trong 100 đoạn rễ.

Tiềm năng xâm nhiễm (Infectivity potential, viết tắt là IP) là số điểm xâm nhiễm vào rễ trên 1 g phân bón vi sinh vật thử nghiệm, được tính theo công thức:

$$m = \frac{Axd}{10000}$$

Trong đó: m là tiềm năng xâm nhiễm, tính bằng điểm xâm nhiễm (IP)

A là số điểm xâm nhiễm có trong 100 đoạn rễ, tính bằng điểm xâm nhiễm (IP)

d là tổng chiều dài rễ, tính bằng xentimet (cm)

10 000 hệ số (bằng 100 đoạn rễ x 1 cm/đoạn rễ x 100 g mẫu)

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

- Mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- Tất cả các thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- Các kết quả thử nghiệm thu được;
- Nếu độ lặp lại được kiểm tra, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

PHỤ LỤC A
QUY ĐỊNH VỀ PHƯƠNG PHÁP ĐO TỔNG CHIỀU DÀI RỄ CỦA THEO ĐƯỜNG
GIAO NHAU VÀ NHUỘM RỄ BẰNG THUỐC NHUỘM TRYPAN BLUE

A1. Phương pháp đo tổng chiều dài rễ của theo đường giao nhau

Trái đều rễ vào lưới ô vuông trên đáy của một khay.

Các rễ được trải dài ra qua nhau qua cách vạch từ 2 đến 10 mm độ sâu của nước.

Mắt của người quan sát lướt dọc theo tất cả các đường ngang và dọc của các đường vạch

Giao cắt trên các rễ trên các đường ngang và dọc được tính bằng cách sử dụng đồng hồ bấm bằng tay.

Cách tính:

Chiều dài rễ = số lượng đường giao nhau x (11/14) x kích cỡ ô (kích cỡ đường vạch)

- Trong đó, 11/14 là hằng số,
- Kích cỡ ô của đường vạch là chiều dài từ cạnh này đến cạnh kia của hình vuông của đường vạch.

A2. Nhuộm rễ bằng thuốc nhuộm Trypan blue

Rửa rễ dưới vòi nước máy nhiều lần;

Đặt rễ vào cốc thủy tinh (6.2.8) có chứa dung dịch KOH nồng độ 10 % (5.2) trong 15 min đến 30 min. Thời gian ủ mẫu phụ thuộc vào độ tuổi và độ cứng của rễ;

Loại bỏ dung dịch KOH nồng độ 10 %;

Rửa sạch rễ bằng nước máy không ít hơn 3 lần sao cho nước rửa trong cốc không còn màu nâu;

Nhúng ngập rễ trong dung dịch H₂O₂ kiềm ở nhiệt độ phòng trong 10 min hoặc cho đến khi rễ có màu trắng;

Rửa sạch rễ không ít hơn 3 lần bằng nước máy để loại bỏ hết H₂O₂ kiềm.

Ngâm rễ trong dung dịch HCl nồng độ 1 % từ 3 min đến 4 min.

Loại bỏ dung dịch HCl nồng độ 1 %.

Nhuộm rễ bằng dung dịch nhuộm trypan blue nồng độ 0,05% (5.4) trong 12 h.

Đặt rễ vào trong các đĩa petri chứa dung dịch giải trừ thuốc nhuộm (hỗn hợp glycerol và lactophenol tỷ lệ 1:1) trong 12 h; Các điểm xâm nhiễm được bắt màu xanh.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] National Centre of Organic Farming Department of Agriculture and Cooperation, Ministry of Agriculture, Govt of India, CGO-II, Kamla Nehru Nagar Ghaziabad, 201 001, Uttar Pradesh. Biofertilizers and Organic Fertilizers in Fertilizer (Control) Order, 1985. pp. 34 – 38.
 - [2] Draft Indian Standard. BIOFERTILIZER – MYCORRHIZAL INOCULUM – SPECIFICATION ICS No. 65.080. Doc No.: FAD 7(2421)C.
 - 3] Brundrett. Mark et. al - Working with Mycorrhiza in Forestry and Agriculture. Canberra, Australia 1996, pp 141-252.
-