

KHẢO SÁT ĐỘC TÍNH CỦA DỊCH NUÔI NẤM (*Sclerotium rolfsii*) TRÊN MÔ SẸO CÀ CHUA (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *IN VITRO*

Nguyễn Thanh Hải

Khoa Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Email: nthaicnsh@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 03.12.2012

Ngày chấp nhận: 25.02.2013

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm hoàn thiện quy trình nuôi và thu dịch nuôi nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*) và bước đầu khảo sát độc tính của dịch nuôi nấm trên mô sẹo cà chua *in vitro*. Kết quả đã xác định được môi trường nuôi cấy lắ lỏng và thời gian nuôi cấy tốt nhất để thu dịch nuôi nấm bệnh (*Sclerotium rolfsii*) là môi trường PDB và 07 ngày nuôi cấy. Trong dịch nuôi nấm bệnh bên cạnh sự có mặt của acid oxalic, còn có các enzyme cellulolytic, pectinolytic. Độc tính của dịch nuôi được kiểm chứng trong việc gây ức chế quá trình nảy mầm của hạt cà chua. Quá trình khảo sát các dòng mô sẹo cà chua trong môi trường có bổ sung dịch nuôi nấm ở các nồng độ khác nhau (từ 5% đến 30% theo thể tích môi trường) cho thấy tỷ lệ nồng độ dịch nuôi tỷ lệ thuận với tỷ lệ chết của callus và tỷ lệ nghịch với tỷ lệ cảm ứng tạo callus. Ở nồng độ dịch nuôi nấm là 30% tất cả các giống nghiên cứu không có khả năng cảm ứng tạo callus và gây chết mẫu. Hàm lượng phenol tổng số của callus tăng dần sau mỗi chu kỳ cấy chuyển. Hàm lượng phenol tổng số trong callus cà chua được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung dịch nuôi nấm 25% ổn định chứng tỏ callus đã bước đầu thích nghi với môi trường chọn lọc.

Từ khóa: Acid oxalic, callus, chọn dòng tế bào, dịch nuôi nấm, phenol, *Sclerotium rolfsii*.

Evaluating Toxicity of *Sclerotium rolfsii* Culture Filtrate to Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Callus *in vitro*

ABSTRACT

The study was carried out to improve *in vitro* culture of the fungus *Sclerotium rolfsii* and primary selection of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) resistant cell lines using culture filtrate (CF). Results have identified that culture of *Sclerotium rolfsii* on PDB liquid medium for seven days was optimum for culture filtrate harvest. The culture filtrate contains not only oxalic acid but also cellulolytic and pectinolytic enzymes. The toxicity of CF was tested on inhibition of germination of tomato seeds. The process selected tomato cell lines in medium supplemented CF at different concentrations (from 5% to 30% from final volume of media) showed that the concentration of CF ratio proportional share mortality of callus and inversely proportional to generate callus induction rate. Concentration CF is 30% of all the research just does not have the ability to generate callus induction and lethal form. The total phenol content of the callus increased in the selection process. In the second cycle selection with a 25% of CF the stability of the total phenol content of the preliminary conclusion that the callus adapt selective factor.

Keywords: Acid oxalic, callus, culture filtrate, phenol, *Sclerotium rolfsii*, selection cell lines.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở nước ta, trồng cà chua có ý nghĩa quan trọng về mặt luân canh, tăng vụ và tăng năng suất. Tuy nhiên, việc trồng cà chua chưa được phát triển mạnh theo mong muốn vì trong điều kiện nóng và ẩm ở nước ta, cà chua dễ mắc nhiều bệnh hại như nấm hại, héo tươi, virus,... và khó phòng trị. Hiện nay ở nước ta, để phòng chống sâu

bệnh hại cây trồng, người sản xuất đã phải sử dụng lượng lớn các loại thuốc hóa học. Điều này không chỉ làm tăng chi phí sản xuất, giảm lợi nhuận mà còn gây ô nhiễm nghiêm trọng môi trường sống và ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe người sản xuất và cộng đồng. Trong xu thế phát triển nền nông nghiệp sạch bền vững, để hòa nhập được với thế giới và bảo vệ lợi ích của người sản xuất thì hướng phòng chống bệnh hại cây

trồng tích cực nhất là tăng cường tính kháng của cây trồng với bệnh hại và tạo giống chống chịu bệnh (Ashwani và Shekhawat, 2009; Klasnikova và cộng sự, 2009).

Các hợp chất phenol đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật. Một trong những chức năng quan trọng của các hợp chất phenol chính là chức năng bảo vệ tế bào thực vật với những tác động của điều kiện sống. Khi tế bào bị tổn thương, trong tế bào sẽ sản sinh mạnh mẽ những hợp chất phenol mới kèm theo đó là quá trình oxy hoá ngưng kết các hợp chất này trên bề mặt tế bào để hình thành lớp bảo vệ. Bên cạnh đó, một vài hợp chất phenol có khả năng nâng cao sức chống chịu của thực vật với bệnh (Раскалиева, 2001; Олениченко và cộng sự, 2006; Гончарук và cộng sự, 2007). Do đó, một trong những vấn đề đáng được quan tâm trong quá trình chọn dòng tế bào *in vitro* với stress sinh học là nghiên cứu sự thay đổi của quá trình trao đổi chất phenol trong mô sẹo (callus), dưới tác động của stress (Гончарук và cộng sự, 2007; Шевелуха và cộng sự, 2008).

Nấm *Sclerotium rolfsii* gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng là một bệnh nguy hiểm và phổ biến trên đồng ruộng ở các vùng canh tác cà chua của nước ta. Khác với một số loại bệnh khác chỉ gây hại ở một thời kì nhất định nào đó trên cây cà chua, bệnh này lại có thể gây hại ở tất cả các thời kỳ sinh trưởng của cây từ khi cây mới mọc cho đến lúc cây thu hoạch cho trái ở mức độ khác nhau (Hà Việt Cường, 2008).

Mục đích của nghiên cứu này bên cạnh việc tìm ra phương pháp thu dịch nuôi có độc tính cao còn bước đầu làm rõ vai trò của quá trình trao đổi chất phenol trong sự thích nghi của tế bào với các stress sinh học, làm cơ sở cho việc chọn tạo các nguồn nguyên liệu phục vụ công tác chọn tạo giống cà chua chống chịu bệnh héo rũ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nuôi cấy và thu dịch nuôi nấm *Sclerotium rolfsii*

Hạch nấm bệnh *Sclerotium rolfsii* được cung cấp bởi bộ môn bệnh cây khoa Nông học

Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội và được giám định lại bởi Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới.

Nấm bệnh *Sclerotium rolfsii* sau khi phân lập chính xác được nuôi cấy lỏng lác trên các môi trường MS và PDB ở nhiệt độ 28-30°C với chu kỳ lắc 200 vòng/phút. Sau các khoảng thời gian nuôi cấy từ 1-10 ngày tiến hành thu dịch nuôi nấm theo phương pháp Калашникова và cộng sự (2006). Sử dụng giấy thấm để lọc sơ bộ dịch nuôi sau đó dịch nuôi được lọc vô trùng qua phễu lọc Minisart filters 0,2µm.

2.2. Xác định sự có mặt của acid oxalic và hoạt tính thủy phân tinh bột của các enzyme có trong dịch nuôi nấm

Tiến hành đo pH dịch nuôi nấm *Sclerotium rolfsii* theo thời gian nuôi cấy (từ ngày thứ nhất đến ngày thứ mười).

Hoạt tính sơ bộ của các loại enzyme chính được xác định bằng phương pháp thử hoạt tính trên môi trường thạch. Các nhóm enzyme được thử hoạt tính thủy phân tinh bột (thử trên môi trường thạch có pha tinh bột, sau đó nhuộm bằng lugol), cellulolytic (thử trên môi trường thạch có pha thêm cacboxyl methyl cellulose (CMC), sau đó nhuộm bằng dung dịch lugol).

2.3. Khảo sát độc tính của dịch nuôi nấm *Sclerotium rolfsii*

Độc tính của dịch nuôi nấm được đánh giá thông qua khả năng nảy mầm của hạt của 3 giống cà chua (HT 152, HT 144 và F1 Mongal) trong dung dịch có bổ sung dịch nuôi nấm ở các nồng độ 0%; 12,5%; 25%; 50%; 75% và 100%.

HT 152, HT 144 là các giống cà chua lai thế hệ mới của Trung tâm Nghiên cứu và phát triển giống rau chất lượng cao thuộc Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội và giống F1 Mongal là giống cà chua thương mại trên thị trường.

Sử dụng môi trường nuôi cấy MS+0,5mg/l αNAA+1mg/l BA làm môi trường nền cho việc tạo callus, tiến hành đánh giá khả năng tạo callus của trụ dưới lá mầm 03 giống cà chua trong môi trường nền có bổ sung dịch nuôi nấm ở các nồng độ khác nhau (5%, 10%, 20%, 25% và 30%).

2.4. Xác định hàm lượng phenol tổng số có trong mẫu cấy ban đầu và callus cà chua

Hàm lượng phenol tổng số trong các mẫu cấy ban đầu và callus nuôi cấy trong môi trường có bổ sung dịch nuôi nấm ở các nồng độ (0%, 5%, 10%, 20% và 25%) được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2007, phân tích phương sai một nhân tố với mức ý nghĩa $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu dịch nuôi nấm

Trong cơ chế xâm nhiễm của nấm bệnh *Sclerotium rolfsii* vào thực vật, ngoài sự tác động của các enzyme có tác dụng phân hủy thành tế bào còn có tác động của acid oxalic (Alghisi và Favaron, 1995). Khi xâm nhiễm vào tế bào, tại bề mặt nấm hình thành một nệm xâm nhiễm (gồm các sợi nấm tụ tập lại) và tiết acid oxalic và nhiều loại enzyme (E. Cellulolytic, E. Pectinolytic...) để phân hủy mô, làm mềm yếu và giết chết mô ký chủ. Để xác định được môi trường nuôi cấy lacc và thời gian nuôi cấy thích hợp chúng tôi tiến hành thí nghiệm về sự biến đổi pH của môi trường nuôi cấy cũng như hoạt tính của enzyme thủy phân tinh bột.

3.1.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến pH của dịch nuôi nấm

Nguyên nhân chính dẫn tới sự thay đổi pH của dịch nuôi khi nuôi cấy lacc nấm bệnh *Sclerotium rolfsii* là do trong quá trình sinh trưởng và phát triển nấm tiết ra ngoài một lượng acid oxalic. Có nhiều giả thuyết khác

nhau về vai trò của acid oxalic trong gây bệnh, có thể do sự cạnh tranh và kiểm soát các chất dinh dưỡng và độc tố môi trường làm tổn thương mô ký chủ (Ashwani và Shekhawat, 2009). Một số cơ chế được đưa ra là acid oxalic sản sinh ra làm tăng tính acid trong môi trường, độ pH ngoại bào giảm xuống còn 4-5, trong khi đó các enzyme ngoại bào có khả năng hoạt động tối ưu ở pH bằng 5, dẫn đến ức chế cơ chế phòng thủ của enzyme thực vật (Bateman và Beer, 1965; Guimaraes và Stotz, 2004). Mặt khác, acid oxalic có thể ức chế hoạt động của khí khổng làm cho cây bị héo và nhiễm trùng, acid oxalic còn có khả năng ức chế một phần khả năng sản sinh hợp chất chống oxy hóa polyphenol của mô cây ký chủ (Guimaraes và Stotz, 2004).

Theo dõi thí nghiệm nhận thấy nấm *Sclerotium rolfsii* sinh trưởng mạnh trong môi trường PDB, các sợi nấm phát triển kết tụ thành một cụm lớn đan xen với nhau. Trong khi đó ở môi trường 1/2 MS, ở những ngày nuôi cấy đầu tiên sau khi nuôi lacc, các sợi nấm liên kết rời rạc và liên kết thành các cụm nhỏ phân tán.

Tương đồng với khả năng sinh trưởng của nấm, pH của môi trường dịch nuôi nấm *Sclerotium rolfsii* nuôi lacc trong môi trường PDB sau thời gian nuôi lacc 10 ngày giảm mạnh hơn so với khi nấm được nuôi lacc trong môi trường 1/2 MS, và trên cả hai môi trường nuôi cấy đều cho kết quả pH nhỏ nhất (nồng độ acid oxalic cao nhất) tại ngày nuôi cấy thứ 07, sau đó có xu thế ổn định (Bảng 1). Kết quả của nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt trong môi trường tối ưu cho sinh trưởng và phát triển giữa hai loại nấm *Sclerotium rolfsii* và nấm *Sclerotinia Sclerotiorum*. Theo tác giả Klasnikova và cộng sự (2009), nấm *Sclerotinia Sclerotiorum* sinh trưởng tốt nhất trong môi trường 1/2 MS.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và môi trường nuôi cấy lacc đến pH của dịch nuôi nấm

Môi trường nuôi cấy	Thời gian nuôi cấy, ngày									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	pH của dịch nuôi									
PDB	3,90	3,70	3,45	3,32	3,25	3,23	3,01	3,01	3,02	3,01
½ MS	4,80	4,20	3,80	3,60	3,50	3,50	3,30	3,31	3,29	3,30

Qua đó có thể đưa ra nhận xét, trong môi trường PDB, nấm *Sclerotium rolfsii* phát triển tốt hơn so với môi trường 1/2 MS và có thể sử dụng PDB để làm môi trường nuôi cấy lỏng lác nấm *Sclerotium rolfsii* để thu dịch nuôi phục vụ các thí nghiệm tiếp theo.

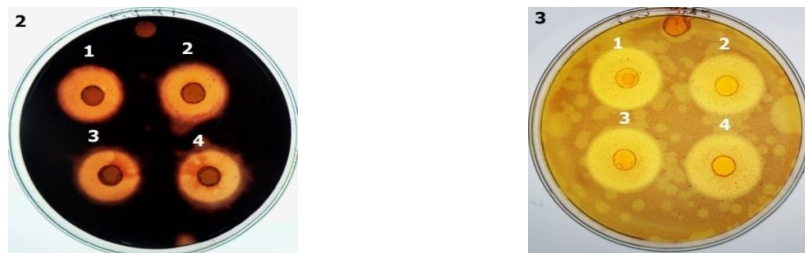
3.1.2. Khảo sát hoạt tính sơ bộ của các enzyme có tác dụng thủy phân tinh bột sản sinh trong quá trình nuôi cấy nấm bệnh

Cellulo, pectin là những thành phần chủ yếu của thành tế bào thực vật. Quá trình sản sinh ra enzyme pectinolytic, cellulolytic bởi *Sclerotium rolfsii* đóng một vai trò quan trọng trong việc phân giải pectin, cellulo làm suy yếu các tế bào để tạo điều kiện thâm nhập vào mô kí chủ (Hà Viết Cường, 2008).

Kết quả sau nhuộm cho thấy trong dịch nuôi của nấm bệnh có chứa các enzyme có khả năng thủy phân tinh bột và có enzyme cellulolytic (Hình 1).

Đường kính vòng phân giải của các enzyme tăng dần theo thời gian nuôi cấy, chứng tỏ rằng các enzyme này được nấm tiết ra trong quá trình nuôi cấy. Bắt đầu từ ngày thứ 3 nuôi cấy lỏng lác hoạt tính của các enzyme tăng dần cho đến ngày nuôi cấy thứ 7 và 8, sau đó ổn định (Bảng 2, 3).

Thông qua các thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lỏng lác cũng như hoạt tính của các enzyme chỉ ra được môi trường nuôi cấy là PDB và thời gian nuôi cấy tối ưu là 7 ngày.



Hình 1. Hoạt tính enzyme ngoại bào của nấm dùng chất chỉ thị lugol

2: Vòng phân giải enzyme có khả năng thủy phân tinh bột

3: Vòng phân giải của enzyme cellulolytic có khả năng cảm ứng cơ chất CMC

Lỗ 1: Dịch nuôi nấm ngày thứ 6

Lỗ 3: Dịch nuôi nấm ngày thứ 8

Lỗ 2: Dịch nuôi nấm ngày thứ 7

Lỗ 4: Dịch nuôi nấm ngày thứ 9

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến đường kính vòng phân giải của enzyme cellulolytic

D-d, cm	Thời gian nuôi cấy, ngày									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0	0	0,90	1,16	1,60	1,88	1,90	2,00	1,96	1,92

* Cơ chất 2% Agar + 1% CMC

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng thủy phân tinh bột của enzyme cellulolytic và pectinolytic

D-d, cm	Thời gian nuôi cấy, ngày									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0	0	0,74	0,90	1,30	1,52	1,64	1,68	1,65	1,64

* Cơ chất 2% Agar+ 1% tinh bột

3.2. Kiểm tra độc tính của dịch nuôi nấm

Bước đầu tiên trước khi chọn lọc dòng tế bào với các yếu tố stress sinh học hay phi sinh học cần phải kiểm tra xem các yếu tố này có gây ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng, thông thường vật liệu thường được sử dụng đó là hạt. Hạt cà chua được cho nảy mầm trong môi trường có bổ sung các nồng độ dịch nuôi nấm khác nhau và đánh giá khả năng nảy mầm của chúng.

Kết quả cho thấy nồng độ dịch nuôi khác nhau có tác động khác nhau lên sự nảy mầm của các giống cà chua. Tỷ lệ nảy mầm của cà chua trên cả 03 giống nghiên cứu đều tỉ lệ nghịch với nồng độ dịch nuôi nấm *Sclerotium rolfsii* bổ sung vào môi trường. Khi bổ sung 100% dịch nuôi nấm, quan sát trên cả 03 giống nghiên cứu đều không nhận thấy sự nảy mầm của hạt cà chua. Thí nghiệm này có kết quả tương đồng với tác giả Abdel và cộng sự (2007) khi nghiên chọn dòng cà chua chịu hạn thông qua tác nhân gây stress là polyethylene glycol. Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy, ở những nồng độ dịch nuôi nấm được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thấp gây hiện tượng ức chế khả năng nảy mầm của hạt giống cà chua, trái với hiện tượng khi sử dụng dịch nuôi nấm *Sclerotinia sclerotiorum* kiểm tra độ nảy mầm của hạt cây hướng dương ở nồng độ thấp dịch nuôi lại có tác động kích thích sự nảy mầm của hạt (Klasnhikova và cộng sự, 2009).

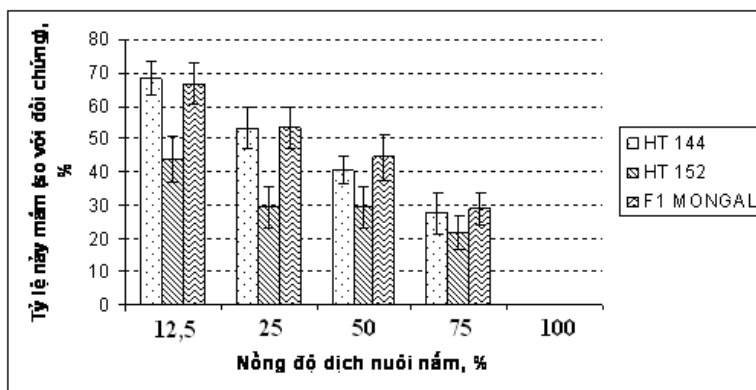
Qua đó chứng tỏ dịch nuôi nấm *Sclerotium rolfsii* đã có tác dụng gây ức chế sự nảy mầm

của hạt hay nói cách khác là dịch nuôi nấm có độc tính (Hình 2).

3.3. Khảo sát khả năng cảm ứng callus trên các môi trường có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng của đoạn thân trụ dưới lá mầm cà chua

Một trong những hệ thống tế bào được sử dụng phổ biến trong chọn dòng tế bào thực vật là mô sẹo (callus). Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát khả năng cảm ứng tạo mô sẹo của trụ dưới lá mầm cà chua trên các môi trường khác nhau, nhằm tìm ra môi trường tốt nhất để có thể tạo ra số lượng lớn callus phục vụ cho việc chọn dòng tế bào (Шевелуха và cộng sự, 2008; Ashwani và Shekhawat, 2009). Callus có thể được cảm ứng bởi sự thay đổi các thành phần môi trường và nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng, cũng như phụ thuộc vào đối tượng nghiên cứu, do 04 loại môi trường được cho rằng có khả năng tạo callus tốt nhất (Chen và cộng sự, 1999; Chaudhary và cộng sự, 2001, 2007; Zubeda và cộng sự, 2010) được chọn để khảo sát.

Kết quả thí nghiệm cho thấy trong cả 04 công thức khảo sát đều có tỷ lệ hình thành callus là tương đối cao từ 81% cho đến 92% (Bảng 4). Trong 04 môi trường khảo sát nêu trên, công thức CT3 với thành phần MS+0,5mg/l α NAA+1mg/l BA có tỷ lệ tạo callus cao nhất cũng như đặc điểm của callus là xanh xốp chiếm 80% là phù hợp nhất trong chọn lọc dòng tế bào



Hình 2. Ảnh hưởng của dịch nuôi nấm đến khả năng nảy mầm của hạt cà chua

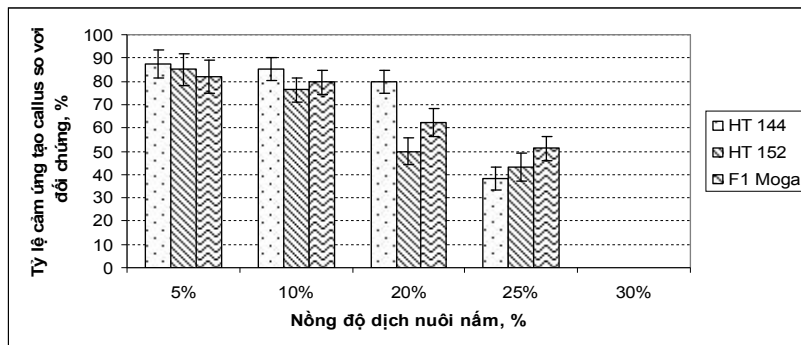
Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng cảm ứng tạo callus của đoạn thân trụ dưới lá mầm của cà chua

Kí hiệu công thức	Thành phần môi trường	Tỷ lệ cảm ứng (%)	Đặc điểm callus	
			Xanh, xốp (%)	Trắng, xốp (%)
ĐC	MS	0	0	0
CT1	MS+0,5mg/l 2,4D + 1mg/l BA	86	40	60
CT2	MS+0,1mg/l αNAA+1mg/l BA	83	50	50
CT3	MS+0,5mg/l αNAA+1mg/l BA	92	80	20
CT4	MS + 1 mg/l αNAA + 5mg/l BA	81	46,7	53,3

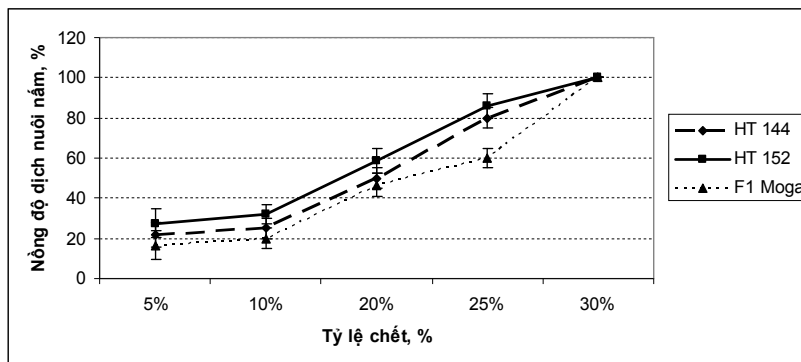
3.4. Ảnh hưởng của dịch nuôi đến khả năng cảm ứng tạo callus của mẫu cấy *in vitro* trên môi trường có bổ sung dịch nuôi nấm *Sclerotium rolfsii*

Sử dụng môi trường nuôi cấy cảm ứng tạo callus tối ưu MS+0,5mg/l αNAA+1mg/l BA làm môi trường nền cho việc tạo callus, các thí nghiệm đã đánh giá khả năng tạo callus của trụ dưới lá mầm cà chua trong môi trường có bổ sung dịch nuôi nấm. Sau 6 tuần nuôi cấy, tỷ lệ cảm ứng tạo callus tỷ lệ nghịch với nồng độ dịch

nuôi bổ sung vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ mẫu cấy chết tỷ lệ thuận với nồng độ dịch nuôi đối với cả 03 giống nghiên cứu. Khi bổ sung dịch nuôi với nồng độ 30% theo thể tích vào môi trường chọn lọc trên cả 03 giống đều không có callus tạo ra, các mẫu cấy ban đầu thâm đen và chết. Trong đó khi bổ sung dịch nuôi với nồng độ 25% giống F1 Mongal có khả năng cảm ứng tạo callus cao nhất (51,1%) và tỷ lệ mẫu chết thấp nhất (60%) so với 02 giống HT 144 và HT 152 (Hình 3, 4).



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch nuôi nấm đến khả năng tạo callus của mẫu cấy



Hình 4. Ảnh hưởng của dịch nuôi nấm đến tỷ lệ chết của mẫu cấy

Bên cạnh các callus có khả năng tiếp tục phát triển trong môi trường chọn lọc thì các callus trước khi ngừng phát triển thường có hiện tượng già hóa, biến màu vàng và thâm đen theo thời gian, các callus này bị dịch nuôi nấm gây ức chế sinh trưởng giảm sức sống không sinh trưởng và chết.

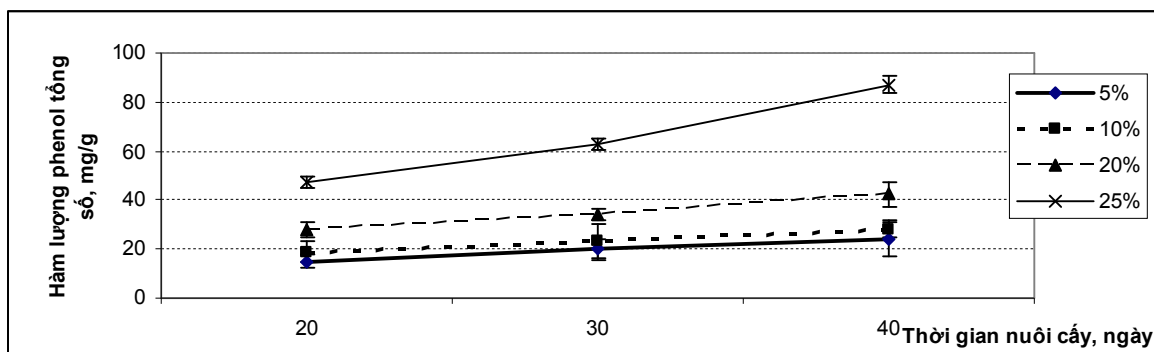
3.5. Ảnh hưởng của dịch nuôi nấm bệnh đến quá trình trao đổi chất phenol

Những nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng sự sinh tổng hợp các hợp chất phenol thay đổi dưới tác động của stress (Олениченко và cộng sự, 2006; Гончарук và cộng sự, 2007; Kalashikova và cộng sự, 2009). Chúng tôi cũng nhận thấy, khi nuôi cấy callus ở điều kiện stress (có bổ sung dịch nuôi nấm) có sự thay đổi trong quá trình sinh tổng hợp phenol, thể hiện ở chỗ nồng độ các hợp chất phenol tăng lên rõ rệt cho tất cả các giống nghiên cứu. Rất có thể, khi nuôi cấy dài ngày callus trong môi trường stress đã hoạt hoá, kích thích hệ thống bảo vệ của thực vật, dẫn đến việc tăng cường sinh tổng hợp các hợp chất phenol tự nhiên.

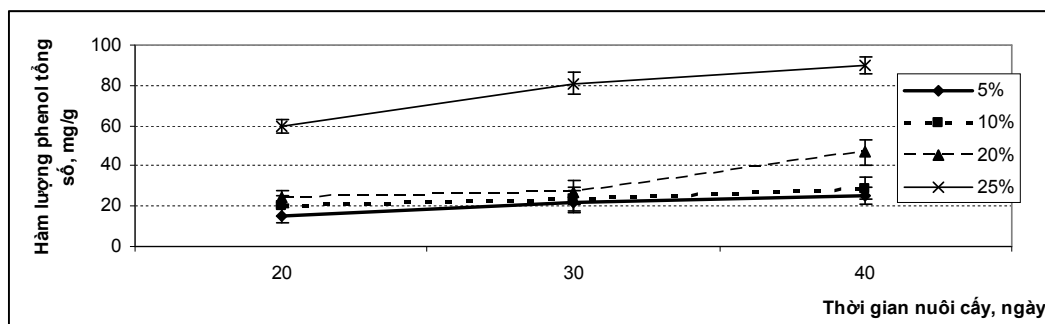
Kết quả thí nghiệm cho thấy nuôi cấy trên môi trường bổ sung 5%, 10% v/v dịch nuôi nấm hàm lượng phenol tổng số ít có sự biến đổi mạnh trong thời gian nuôi cấy 20-40 ngày, điều này có thể do khả năng ức chế của dịch nuôi nấm chưa

đủ mạnh để kích hoạt khả năng phòng thủ ở mô tế bào thực vật thông qua việc tăng hàm lượng phenol tổng số. Trong khi đó chọn lọc trên môi trường bổ sung 20%, 25% v/v dịch nuôi nấm, hàm lượng phenol tổng số biến đổi mạnh ở giai đoạn nuôi cấy sau 30-40 ngày, điều này có thể do các hợp chất hóa sinh học phản ứng chống lại stress sinh học diễn ra trong quá trình chọn lọc, ví dụ như hình thành hợp chất tích lũy do trao đổi chất, sản xuất chất chống oxy hóa (Kalashikova và cộng sự, 2009) làm tăng hàm lượng phenol tổng số trong callus cà chua (Hình 5, 6, 7).

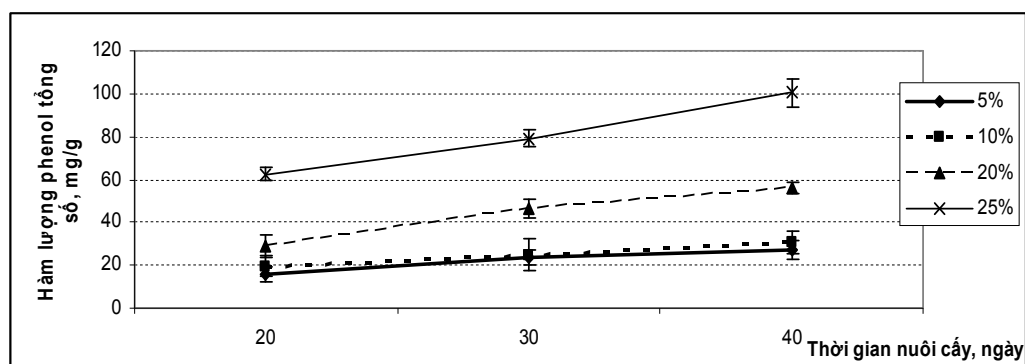
Chu kì II của quá trình chọn lọc nhận thấy rõ sự thích nghi của tế bào cà chua với môi trường có bổ sung dịch nuôi nấm với nồng độ cao hơn. Khi tăng nồng độ dịch nuôi bổ sung vào môi trường nuôi cấy từ 5 lên 10%; từ 10 lên 15% và từ 20 lên 25% hàm lượng phenol tổng số trong callus cà chua tiếp tục tăng lên. Trong khi đó khi giữ nguyên nồng độ dịch nuôi 25%, hàm lượng phenol tổng số không thay đổi nhiều so với kết thúc chu kì I. Đặc biệt, hàm lượng phenol tổng số trong callus cà chua sau chu kỳ II không thay đổi khi tăng nồng độ dịch nuôi nấm từ 20% ở chu kỳ I lên 25% ở chu kỳ II so với nồng độ dịch nuôi nấm ở cả hai chu kỳ là 25%. Điều này, bước đầu chứng tỏ sự thích nghi của tế bào callus cà chua với môi trường có chứa dịch nuôi nấm gây bệnh trong quá trình chọn lọc (Bảng 5).



Hình 5. Ảnh hưởng của dịch nuôi nấm bệnh đến sự biến đổi nồng độ tổng các hợp chất phenol trong mô callus (HT 144)



Hình 6. Ảnh hưởng của dịch nuôi nấm bệnh đến sự biến đổi nồng độ tổng các hợp chất phenol trong mô callus (HT 152)



Hình 7. Ảnh hưởng của dịch nuôi nấm bệnh đến sự biến đổi nồng độ tổng các hợp chất phenol trong mô callus (F1 Mongal)

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ dịch nuôi và chu kỳ chọn lọc đến hàm lượng phenol tổng số trong callus của tế bào cà chua

Tên giống	Nồng độ dịch nuôi			
	5 %(I)-10% (II)	10 %(I)-20% (II)	20 %(I)-25% (II)	25 %(I)-25% (II)
Hàm lượng phenol tổng số, mg/g				
HT 144	23,91-32,17	28,04-43,96	42,39-88,91	87,17-90,00
HT 152	25,22-30,43	28,91-54,13	46,73-92,83	90,22-90,10
F1 Mongal	27,17-36,73	30,65-60,86	56,09-102,17	100,43-104,34

Ghi chú: I : chu kỳ I; II: chu kỳ II

4. KẾT LUẬN

Nuôi cấy laccase nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng ở cà chua (*Sclerotium rolfsii*) trên môi trường PBD trong 07 ngày là tối ưu trong việc thu dịch nuôi nấm có độc tính cao. Độc tính của dịch nuôi nấm không chỉ được tạo nên bởi của acid oxalic mà còn có mặt của các enzyme

pectinolytic, cellulolytic có khả năng thủy phân tinh bột.

Tỷ lệ nảy mầm của hạt cà chua tỷ lệ nghịch với nồng độ dịch nuôi nấm được bổ sung vào môi trường, ở nồng độ 100% dịch nuôi nấm hạt cà chua của 3 giống nghiên cứu đều không có khả năng nảy mầm. Tỷ lệ hình thành callus tỷ lệ nghịch với nồng độ dịch nuôi nấm bổ sung vào

môi trường nuôi cấy, ở nồng độ 30% dịch nuôi nấm gây ức chế hoàn toàn khả năng tạo callus và gây chết mẫu cấy.

Hàm lượng phenol tổng số của callus tăng dần trong quá trình chọn lọc và tỷ lệ thuận với nồng độ dịch nuôi bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Tế bào callus cà chua đã có biểu hiện thích nghi với môi trường chọn lọc, ở nồng độ dịch nuôi 25% trong chu kỳ chọn lọc II đã thấy sự ổn định của hàm lượng phenol tổng số.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin gửi lời cảm ơn đến dự án Việt Bỉ trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội đã hỗ trợ một phần kinh phí cho nhóm sinh viên NCKH thực hiện đề tài

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdel, A.T., A.R. Ragab, Z.A. Kasem, F.D. Omar and A.M. Samera (2007). In vitro selection for tomato plants for drought tolerance via callus culture under polyethylene glycol (PEG) and mannitol treatments. African Crop Science Conference Proceedings. 8:2027-2032.
- Alghisi, P., F. Favaron (1995). Pectin-degrading enzymes and plant parasite interactions. Eur.J.Plant Pathol. 101: 365-375.
- Annis, S.L., P.H. Goodwin (1997). Recent advances in molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes in plant pathogenic fungi. Eur.J.Plant Pathol. 103: 1-14.
- Ashwani Kumar, N.S. Shekhawat (2009). Plant tissue culture and molecular markers and their role in improving crop productivity. IK International New Delhi, ISBN: ISBN: 81898661050. Edition: 1st.
- Bateman D.F., S.V. Beer (1965). Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology. 55, 204-211.
- Chaudhary, Z., A. Afroz and H. Rashid (2007). Effect of variety and plant growth regulators on callus proliferation and regeneration response of three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*). Pak. J. Bot. 39(3): 857-869.
- Chaudhry, Z., I. Feroz, W. Ahmed, H. Rashid, B. Mizra and A. Qureshi (2001). Varietal response of *Lycopersicon esculentum* to callogenesis and regeneration. J. Boil. Sci., 1: 1138-1140.
- Chen, H.Y., J.H. Zhang, T.M. Zhuang and G.H. Zhou (1999). Studies of optimum hormone levels for tomato plant regeneration from hypocotyl explants cultured in vitro. Acta Agriculture Shanghai. 18: 26-29.
- Dutton, M.V., Evan. (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in soil environment. Can.J.Microbiol. 42: 881-895.
- Гончарук Е.А., М.В. Молунова, Е.А. Калашникова (2007). Сравнение действия биотического и абиологического стресса на каллусные культуры, инициированные из контрастных по устойчивости сортов льна-долгунца. Материалы докладов, ч.3. VI съезд общества физиологов растений России «Международная конференция Современная физиология растений от молекул до экосистем». - Сыктывкар: 157-159.
- Guimaraes R.L., H.U. Stotz (2004). Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. Plant Physiol. 136: 3703-3711.
- Hà, Viết Cường (2008). Giáo trình bệnh cây. Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
- Kalashikova E.A., Nguyen Thanh Hai, N.B. Pronina (2009). In vitro resistance cells tissues of sunflower to whiterot (*Sclerotinia sclerotiorum*) and study the role of phenolic metabolites in the adaptation mechanisms of cell culture to selective factor. Scientific magazine "Известия ТСХА" Moscow; Special №. 76-83.
- Калашникова Е.А., Е.З. Кочиева, О.Ю. Миронова (2006). Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Колос С.
- Олениченко Н.А., В.И. Осипов, Н.В. Загоскина (2006). Фенольный комплекс листьев озимой пшеницы и его изменение в процессе низкотемпературной адаптации растений. Физиология растений. 53(4): 554-559.
- Шевелуха В.С., Е.А. Калашникова, Е.З. Кочнева и др. (2008). Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высшая школа. 710 с.
- Раскальева В.А. (2001). Использование методов биотехнологии в получении исходных форм моркови, устойчивых к патогенному грибу *Alternaria radicina*. Дис... канд биол. наук: 03.00.23.
- Zubeda Chaudhry., Sidra Abba., Azra Ysamin., Hamid Rashid (2010). Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Pak. J. Bot. 42(1): 155-163.

