BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM *GLOMUS* sp. VÀ BỐN MỨC PHÂN LÂN ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN BẮP C919 VÀ XÁC ĐỊNH NẤM CỘNG SINH MYCORRHIZA BẰNG KỸ THUẬT PCR

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2003 – 2007

Sinh viên thực hiện: HOÀNG TUẤN DŨNG

Thành Phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2007

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM *GLOMUS* sp. VÀ BỐN MỨC PHÂN LÂN ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN BẮP C919 VÀ XÁC ĐỊNH NẤM CỘNG SINH MYCORRHIZA BẰNG KỸ THUẬT PCR

Giáo viên hướng dẫn
ThS. TRẦN THỊ DẠ THẢO
TS. LÊ ĐÌNH ĐÔN

Sinh viên thực hiện
HOÀNG TUẤN DŨNG

Thành Phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2007

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn:

- Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập tại trường.
- Các thầy cô trong Bộ môn Công nghệ sinh học cùng các thầy cô trực tiếp giảng dạy luôn tận tình hướng dẫn, giảng dạy, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt bốn năm qua.
- ThS. Trần Thị Dạ Thảo và TS Lê Đình Đôn đã tận tình hướng dẫn và động viên tôi trong thời gian thực hiện đề tài tốt nghiệp.
- TS. Bùi Minh Trí và các anh chị phụ trách phòng CNSH thuộc Trung tâm Phân Tích Thí Nghiệm Đại học Nông Lâm Tp. HCM đã tận tình giúp đỡ tôi trong thời gian làm đề tài.
- Thầy Lưu Phúc Lợi, anh Nguyễn Văn Lẫm, chị Hương, các bạn sinh viên khoa nông học cùng làm đề tài trong phòng thực tập của bộ môn cây lương thực, rau quả và cùng toàn thể lớp CNSH 29 đã hỗ trợ, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian làm đề tài và 4 năm qua.

Thành kính ghi ơn bà, cha mẹ đã nuôi nấng, dạy bảo con được như ngày hôm nay, cùng những người thân trong gia đình luôn tạo mọi điều kiện và động viên con trong suốt quảng đường từ tuổi ấu thơ cho đến ngày hôm nay.

Tp. HCM, tháng 09 năm 2007

Sinh viên thực hiện

Hoàng Tuấn Dũng

TÓM TẮT

HOÀNG TUẤN DŨNG, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Tháng 9/2005. "ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM *GLOMUS* sp. VÀ BỐN MỨC PHÂN LÂN LÊN SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN BẮP C919 VÀ XÁC ĐỊNH NẤM CỘNG SINH *MYCORRHIZA* BẰNG KỸ THUẬT PCR ".

Giáo viên hướng dẫn:

ThS. TRẦN THỊ DẠ THẢO

TS. LÊ ĐÌNH ĐÔN

Đề tài được thực hiện để nghiên cứu tác động của nấm cộng sinh Mycorrhiza cụ thể là nấm *Glomus* sp. và phân lân đến sự sinh trưởng và năng suất của bắp C919. Đồng thời xác định các chủng nấm cộng sinh mycorrhiza: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp. bằng kỹ thuật PCR.

Đề tài được thực hiện tại nhà lưới của trại thí nghiệm khoa nông học, phòng thực tập thuộc bộ môn cây lương thực-rau quả và Trung tâm Phân Tích Thí Nghiệm trường Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, từ 01/03/07 đến 5/09/07.

Nội dung nghiên cứu:

1. Thí nghiệm Ảnh hưởng của nấm Glomus sp. và phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 trong nhà lưới. Là thí nghiệm hai yếu tố: Mức lân (bốn mức lân: 0, 100, 200, 400 mg P_2O_5/kg đất), và nấm *Glomus* sp. (hai mức nấm: không chủng nấm và có chủng nấm) tạo thành 8 nghiệm thức, được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên trong nhà lưới, bắp dinh được trồng trong chậu chứa 5 kg đất . Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi được thực hiện qui trình của Viện nghiên cứu ngô quốc gia.
2. Khuyếch đại vùng rDNA-LSU của các chủng nấm cộng sinh mycorrhiza: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp. bằng kỹ thuật PCR

Kết quả đạt được:

1. Nấm có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng của bắp, nhưng không ảnh hưởng đến năng suất của bắp.
2. Lân có tác động đến sự sinh trưởng của bắp và năng suất của bắp. Khi bón lân từ 100 đến 400 mg P_2O_5/kg đất sự sinh trưởng , phát triển của bắp không có sự khác biệt.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN ii
TÓM TẮT iii
MỤC LỤC v
DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT ix
DANH SÁCH CÁC HÌNH x
DANH SÁCH CÁC BẢNG xi
Chương 1: GIỚI THIỆU 1
1.1.Đặt vấn đề: 1
1.2. Mục đích yêu cầu và giới hạn đề tài 1
1.2.1. Mục đích yêu cầu 1
1.2.2. Giới hạn đề tài 2
Chương 2: TỔNG QUAN 4
2.1. Sơ lược về cây bắp 4
2.1.1. Tình hình sản xuất bắp trên thế giới và trong nước 4
2.1.1.1. Tình hình sản xuất bắp trên thế giới 4
2.1.1.2. Tình hình sản xuất bắp trong nước 5
2.1.2. Nhu cầu dinh dưỡng của cây bắp 6
2.1.3. Vai trò của lân 7
2.2. Giới thiệu nấm cộng sinh Mycorrhiza 7
2.2.1. Nấm VAM cộng sinh trong rễ cây trồng 9
2.2.1.1. Thành phần cấu trúc nấm VAM 9
2.2.1.2. Cơ chế cộng sinh và mối liên hệ giữa nấm với cây chủ 11
2.2.2. Lợi ích của nấm cộng sinh 12
2.3. Sơ lược về kỹ thuật PCR 13
2.3.1. Nguyên tắc của kỹ thuật PCR 13
2.3.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR 16
2.3.2.1. DNA mẫu 16
2.3.2.2. Taq polmerase 16
2.3.2.3. Primer 16

2.3.2.4. Nhiệt độ bắt cặp 18
2.3.2.5. Tỉ lệ primer/DNA khuôn mẫu 19
2.3.2.6. Các thành phần khác 19
2.3.3. Các vấn đề thường gặp trong phản ứng PCR và hướng giải quyết 21
2.3.3.1. Có nhiều sản phẩm không chuyên biệt có kích thước dài hơn 21
2.3.3.2. Có nhiều sản phẩm không đặt hiệu với kích thước ngắn hơn 21
2.3.3.3. Không thu được bất kỳ sản phẩm nào 22
2.3.3.4. Sản phẩm quá yếu 22
2.4. Những nghiên cứu trên thế giới và trong nước 23
2.4.1. Tình hình nghiên cứu trong nước 23
2.4.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới 23
Chương 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM 25
3.1. Nội dung nghiên cứu 25
3.2. Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài 25
3.2.1. Thời gian 25
3.2.2. Địa điểm 25
3.3. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nấm *Glomus* sp. và bốn mức phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 trong nhà lưới 25
3.3.1. Vật liệu và phương pháp 25
3.3.1.1. Vật liệu nghiên cứu 25
3.3.3.2. Phương pháp thí nghiệm 26
3.3.3.4. Quy trình kĩ thuật 27
3.3.3.4. Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi 28
3.3.3.4. Phương pháp xử lí số liệu 29
3.4. Thí nghiệm PCR phát hiện trên ba giống: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp 30
3.4.1. Vật liệu nghiên cứu trong phản ứng PCR 30
3.4.1.1. Các hóa chất dùng trong PCR 30
3.4.1.2. Hóa chất dùng trong diện di 30
3.4.1.3. Primer sử dụng 30
3.4.2. Phương pháp thí nghiệm 31
3.4.2.1. Phương pháp ly trích bào tử 31

3.4.2.2. Phương pháp ly trích DNA từ bào tử 31
3.4.2.3. Tiến hành phản ứng PCR 32
3.4.2.4. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 32
Chương 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 33
4.1. Thí nghiệm ảnh hưởng của nấm *Glomus* sp. và bốn mức phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 trong nhà lưới 33
4.1.1. Thời gian sinh trưởng 33
4.1.2. Đặc điểm thân cây 34
4.1.2.1. Chiều cao cây 34
4.1.2.2. Chiều cao đóng trái 35
4.1.2.3. Đường kính thân 36
4.1.3. Đặc điểm lá 37
4.1.3.1. Số lá 37
4.1.3.2. Diện tích lá 38
4.1.4. Trọng lượng chất khô 39
4.1.4.1. Trọng lượng thân lá 39
4.1.4.2. Trọng lượng rễ 40
4.1.5. Đặc điểm trái 41
4.1.5.1. Chiều dài kết hạt 41
4.1.5.2. Số hàng và số hạt 42
4.1.6. Các yếu tố cầu thành năng suất 42
4.1.7. Khả năng cộng sinh 44
4.2. Thí nghiệm PCR phát hiện trên ba giống: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp. 44
4.2.1. Ly trích DNA từ bào tử. 44
4.2.2. Phản ứng PCR 45
4.2.2.1. Khảo sát chu trình nhiệt 45
4.2.2.2. Khảo sát nồng độ $MgCl_2$ 46
4.2.2.3. Khảo sát nồng độ primer 46
4.2.2.4. Khảo sát nồng độ lượng dịch ly trích 47
Chương 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 49

5.1. Thí nghiệm ảnh hưởng của nấm *Glomus* sp. và bốn mức phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 trong nhà lưới 49
5.1.1. Kết luận 49
5.1.1.1. Hiệu quả của phân lân 49
5.1.1.2. Hiệu quả của nấm 49
5.1.1.3. Sự tương tác của nấm *Glomus* sp. và lân 49
5.1.2. Kiến nghị: 49
5.2. Thí nghiệm PCR chỉ phát hiện trên ba giống: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp. 50
5.2.1. Kết luận 50
5.2.2. Kiến nghị: 50
Chương 6: TÀI KIỆU THAM KHẢO 51
Chương 7: PHỤ LỤC 54

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

- ATP : Adenine triphosphate
- bp : Base pair
- CTP : Cytosine triphosphate
- ctv. : Cộng tác viên
- ddNTP : Dideoxyribonucleotide – 5-triphosphate
- DNA : Deoxyribonucleotide Acid
- dNTP : Deoxyribonucleotide triphosphate
- EDTA : Ethylenediamine – tetraacetic acid
- GTP : Guanine triphosphate
- kb : Kilo base
- LSU : Large subunit
- ng : Nano gram
- NSG : Ngày sau gieo
- PCR : Polymerase chain reaction – phản ứng chuỗi Polymerase
- rDNA : Ribosome DNA
- TAE : Tris Acetic EDTA
- TE : Tris EDTA
- TTP : Thymine triphosphate
- µM : Micro mol
- µg : Micro gram
- µl : Micro lit

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình	Trang
Hình 2.1: Nguyên tắc phản ứng PCR	14
Hình 4.1 Sản phẩm PCR lần hai	46
Hình 7.1 Các nghiệm thức 10 NSG	55
Hình 7.2 Bộ rễ của các nghiệm thức	56
Hình 7.3 Trái của các nghiệm thức	57
Hình 7.4 Hình cộng sinh nấm *Glomus* sp. (túi)	58

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Tên bảng	Trang
Bảng 2.1 Tình hình sản xuất bắp ở một số nước sản xuất lớn và thế giới năm 2005.	3
Bảng 2.2 Diện tích, năng suất và sản lượng bắp Việt Nam giai đoạn 1990 – 2006.	5
Bảng 2.3 Hàm lượng các chất dinh dưỡng cây bắp lấy từ đất (kg/ha)	5
Bảng 2.4 Tình hình nghiên cứu trên thế giới.	23
Bảng 3.1 Trình tự nucleotide các cặp primer sử dụng.	28
Bảng 3.2 Thành phần hóa chất PCR.	30
Bảng 4.1 Thời gian sinh trưởng, phát dục của bắp C919 có chủng và không chủng nấm *Glomus* sp. ở bốn mức phân lân.	32
Bảng 4.2 Đặc điểm thân cây của bắp C919 có chủng và không chủng nấm *Glomus* sp. ở bốn mức phân lân.	33
Bảng 4.3 Đặc điểm lá của bắp C919 có chủng và không chủng nấm *Glomus* sp. ở bốn mức phân lân.	36
Bảng 4.4 Trọng lượng chất khô của bắp C919 có chủng và không chủng nấm *Glomus* sp. ở bốn mức phân lân.	38
Bảng 4.5: Đặc điểm trái của bắp C919 có chủng và không chủng nấm *Glomus* sp. ở bốn mức phân lân.	40
Bảng 4.6 Các yếu tố cấu thành năng suất của bắp C919 có chủng và không	4

chủng nấm *Glomus* sp. ở bốn mức phân lân. 1

Bảng 4.7 Khả năng cộng sinh của nấm *Glomus* sp. Trên bắp C919 ở bốn mức phân lân. 4 3

Bảng 4.8 Các chu trình nhiệt được khảo sát. 5 4

Chương 1

GIỚI THIỆU

1.1.Đặt vấn đề:

Bắp là cây lương thực rất quan trọng với hàm lượng dinh dưỡng cao, cung cấp nhiều năng lượng, nên bắp được làm thức ăn cho gia súc, làm thực phẩm, nguồn cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp và là nguồn hàng hóa xuất nhập khẩu đem lại lợi nhuận cao ở nhiều quốc gia trên thế giới.

Trong nền nông nghiệp Việt Nam, bắp là cây lương thực xếp hàng thứ hai sau cây lúa, cũng là một cây trong có ý nghĩa cho sự phát triển chăn nuôi. Ở nước ta bắp được trồng gần như khắp cả nước.

Hiện nay nhu cầu sử dụng bắp ngày càng tăng cao và giá bắp có xu hướng ngày càng tăng do nhu cầu sử dụng tăng mạnh.

Tại Việt Nam, mặc dù điều kiện sinh thái nước ta có tiềm năng rất lớn để sản xuất bắp nhưng sản lượng bắp vẫn không đáp ứng được nhu cầu sử dụng trong nước. Hàng năm, để đáp ứng nhu cầu ngành sản xuất thức ăn gia súc phải nhập khoảng nửa triệu tấn bắp.

Để đáp ứng nhu cầu sử dụng ngày càng cao cần áp dụng các biện pháp khoa học kĩ thuật (thâm canh, giống tốt, phân bón) và các công nghệ kĩ thuật hiện đại (công nghệ gene) để tăng năng suất và sản lượng bắp. Phân bón trong đó phân lân có vai trò rất quan trọng đối với cây bắp. Trong các chất dinh dưỡng cần cho sinh trưởng và phát triển của cây bắp thì lân là chất không thể thay thế trong tất cả các quá trình sống quan trọng xảy ra trong cây bắp. Cũng như đạm, lân tham gia vào việc xây dựng cấu trúc tế bào, là một trong những nguyên tố xây dựng nên cấu trúc di truyền. Lân tập trung một lượng rất lớn ở những nơi có quá trình trao đổi chất và chuyển hoá năng lượng mạnh như: Những mô đang lớn, ngọn chồi đầu rễ... Ngoài ra lân có tác dụng trong tất cả các quá trình sinh sản. Bởi vì lân là thành phần cấu trúc nên vật chất di truyền (acid nucleic) và là thành phần của chất vận chuyển điện

tử trong các phản ứng sinh hóa (ATP). Tuy vậy trong đất, hầu hết lân dễ tiêu thường nghèo đến trung bình mặc dầu lân tổng số khá cao.

Bên cạnh đó ở trong đất sự hiện diện của nấm cộng sinh (*Mycorrhiza*) cũng có vai trò quan trọng, nó ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của cây trồng và góp một phần không nhỏ trong việc tăng năng suất và sản lượng. Chủng nấm cộng sinh có khả năng giúp cây tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng, gia tăng dinh dưỡng hữu dụng trong đất: P, Ca, S, NH_4, Zn; tăng khả năng chống chịu hạn hán và sâu bệnh, tăng khả năng kháng lại độc chất kim loại nặng, cải thiện cấu trúc sợi đất, gia tăng sự đa dạng sinh học của vi sinh vật đất. Ngoài ra nấm cộng sinh còn làm tăng khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi, chống chịu sâu bệnh, làm tăng khả năng chống chịu hạn của cây bắp. Hiện nay, nấm cộng sinh ở vùng rễ *Mycorrhiza* ở nước ta chưa được quan tâm nhiều.

Để cây sinh trưởng, phát triển tốt phát huy hết tiềm năng năng suất, liều lượng phân lân cung cấp cho cây, việc chủng nấm cho cây cũng như việc phát hiện đúng loại nấm cộng sinh trên cây trồng là rất quan trọng và cần thiết. Để từ đó có những nghiên cứu, ứng dụng tốt hơn và thích hợp hơn trên từng loài nấm khác nhau. Vì vậy, đề tài " Ảnh hưởng của nấm Glomus sp. và bốn mức phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 và xác định nấm cộng sinh bằng kỹ thuật PCR" được tiến hành.

1.2. Mục đích yêu cầu và giới hạn đề tài

1.2.1. Mục đích yêu cầu

– Xác định mức phân lân và nấm cộng sinh thích hợp để bắp sinh trưởng, phát triển tốt nhất trên nền đất nghèo dinh dưỡng.

– Xác định nấm cộng sinh *Mycorrhiza* bằng kỹ thuật PCR.

1.2.2. Giới hạn đề tài

Do đề tài quá mới mẽ, lĩnh vực nghiên cứu rộng mà thời gian thực hiện đề tài có hạn nên thí nghiệm chỉ nghiên cứu trên bốn mức phân lân và sử dụng nấm cộng sinh *Glomus* sp.. Thí nghiệm PCR chỉ phát hiện trên ba giống: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp..

Chương 2

TỔNG QUAN

2.1. Sơ lược về cây bắp

Bắp là cây lương thực quan trọng, đứng thứ hai sau cây lúa. Ngoài giá trị làm lương thực, bắp còn là một cây trồng rất có ý nghĩa cho sự phát triển chăn nuôi. Ngày nay, bắp còn được dùng để sản xuất bắp rau, một loại sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao.

Bắp thích nghi với khoảng khí hậu rộng từ vùng vĩ độ 55^0 Nam đến 30^0 Bắc. Bắp thích nghi với nhiều điều kiện đất đai. Bắp có thể trồng được trên nhiều loại đất nhưng tốt nhất là trên đất cát pha hay phù sa ẩm, mực nước ngầm sâu, thoáng khí và thoát nước tốt, có tầng canh tác sâu, chứa nhiều chất hữu cơ và nhiều chất dinh dưỡng.

2.1.1. Tình hình sản xuất bắp trên thế giới và trong nước

2.1.1.1. Tình hình sản xuất bắp trên thế giới

Bắp là một cây trồng quan trọng trong nền kinh tế toàn cầu, hàng năm trên toàn thế giới sản xuất vào khoảng 696,2 – 723,3 triệu tấn (năm 2005 – 2007). Trong đó nước Mỹ sản xuất được 40,62% tổng sản lượng bắp. Sản lượng hạt bắp xuất khẩu trên thế giới trung bình hằng năm 82,6 – 86,7 triệu tấn. Trong đó nước Mỹ xuất khẩu 64,41 % tổng sản lượng bắp xuất khẩu. (Nguồn sở khoa học và công nghệ tỉnh An Giang, 2007).

Bảng 2.1 Tình hình sản xuất bắp ở một số nước sản xuất lớn và thế giới năm 2005

Quốc gia	*Diện tích (triệu ha)*	*Năng suất (tấn/ha)*	*Sản lượng (triệu tấn)*
Thế giới	148,0	4,70	695,5
Hoa kỳ	30,1	9,31	280,2
Trung Quốc	26,2	5,00	131,1
Braxin	11,5	3,03	39,8
Mêhico	8,0	2,56	20,5

(Trích dẫn bởi Trần Thị Dạ Thảo, 2006)

Hiện nay xu hướng phát triển cây bắp trên thế giới có nhiều thay đổi đáng chú ý. Nếu như trước kia sản lượng bắp của thế giới chủ yếu tập trung ở các nước châu Mỹ mà đặc biệt ở Hoa Kỳ thì hiện nay xu hướng này chuyển sang các nước châu Á mà đặc biệt là Trung Quốc .

2.1.1.2. Tình hình sản xuất bắp trong nước

Bắp đã được đưa vào Việt Nam khoảng 300 năm trước (Bắp Hữu Tình, 1997). Bắp là cây lương thực quan trọng được xếp thứ 2 sau lúa. Nó cũng là một loại cây trồng có ý nghĩa trong chăn nuôi. Ở nước ta bắp đã được trồng gần như khắp cả nước.

Trước đây bắp do chưa được chú trọng đúng mức nên chưa phát huy hết tiềm năng của nó, nhưng trong những năm gần đây nhờ có chính sách khuyến khích và áp dụng các tiến bộ khoa học kỹ thuật vào trong sản xuất bắp, đã có những bước tiến về năng suất, sản lượng đặc biệt là diện tích bắp lai ngày càng gia tăng chiếm khoảng 80% tổng diện tích trông bắp trong cả nước. Phương thức trồng bắp thâm canh đã tay thế dần phương trồng bắp quản canh, chính yếu tố này đã tạo ra sự tăng trưởng có tính đột biến về sản lượng ở các vùng trọng điểm.

Nếu giai đoạn năm 1980 – 1990 sản lượng bắp của Việt Nam chỉ mới đạt xấp xỉ 0,5 triệu tấn, thì sau khi cuộc cách mạng về bắp lai từ năm 1990 đã mở rộng việc sản xuất bắp lai nhanh chóng không chỉ về diện tích mà cả về năng suất và sản lượng, đưa Việt Nam vào hàng ngũ của những nước sản xuất bắp lai của Châu Á (FAO, 2004).

Hiện nay, nếu nói về giống và năng suất cây bắp, thì so với các nước ở châu Á như: Thái Lan, Indonesia, Malaysia ... Việt Nam đã ngang ngửa. Tuy nhiên, năng suất bắp bình quân ở nước ta còn thấp so với Trung Quốc (Trung Quốc đạt 5,1 tấn/hécta). (Nguồn website tỉnh Đồng Nai).

Bảng 2.2 Diện tích, năng suất và sản lượng bắp Việt Nam giai đoạn 1990 – 2006

Năm	*Diện tích (ngàn ha)*	*Năng suất (tấn/ha)*	*Sản lượng (ngàn tấn)*
1990	432,00	1,55	671,00
1995	556,80	2,11	1177,20
2000	730,20	2,75	2005,90
2001	729,50	2,67	2161,70
2002	816,00	2,81	2511,20
2003	912,70	2,97	3136,30
2004	991,10	3,23	3430,90
2005	1043,30	3,14	3756,30
2006	1031,80	3,17	3819,20

(Nguồn website cục thống kê bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2006)

2.1.2. Nhu cầu dinh dưỡng của cây bắp

Để tạo thành chất hữu cơ, ngoài nhiệt, ánh sáng, nước, khí CO_2 cây còn cần nhiều chất khoáng. Các chất dinh dưỡng như N, P, K, Ca, Mg, S cũng như các nguyên tố đa lượng như: Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Cl; và các nguyên tố vi lượng như: Si, Na, Al, Ti, Co, Ag, Bo; chúng đều có những vai trò quan trọng khác nhau trong cây bắp. Kết quả nghiên cứu của Viện lân – kali Atlanta (Mỹ) về sự hấp thu các chất dinh dưỡng của cây bắp (bảng 2.3).

Bảng 2.3 Hàm lượng các chất dinh dưỡng cây bắp lấy từ đất (kg/ha)

Cơ quan	**N**	**P_2O_5**	**K_2O**	**Mg**	**S**	**Chất khô**	**Tỉ lệ (%)**
Hạt (10 tấn)	190	78	54	18	16	9770	52
Thân, lá, cùi	79	33	215	38	18	8960	48
Tổng số	269	111	269	56	34	18730	100

(trích dẫn bởi Trần Thị Dạ Thảo, 2006)

Để tạo ra 5 – 6 tấn hạt hoặc 50 – 60 tấn chất xanh, cây lấy từ đất 150 – 180 kg N, 60 – 70 kg P_2O_5, và 160 – 190 kg K_2O. Vì vậy để đạt năng suất mong muốn thì phải cung cấp tương ứng cho cây đủ lượng dinh dưỡng nói trên.

2.1.3. Vai trò của lân

Trong các chất dinh dưỡng kể trên thì lân là chất không thể thay thế trong tất cả các quá trình sống quan trọng xảy ra trong cây bắp. Cũng như đạm, lân tham gia vào thành phần của các hợp chất protid quan trọng. Hợp chất lân có trong tất cả các

tế bào. Có thể thấy số lượng lân rất lớn ở những nơi có quá trình trao đổi chất và chuyển hoá năng lượng mạnh như: những mô đang lớn, ngọn chồi đầu rễ. Hơn nữa lân có tác dụng trong tất cả các quá trình sinh sản, vì vậy có rất nhiều trong hạt. Bắp chứa khoảng 75% lân đã đồng hoá ở trong hạt. Giá trị thức ăn gia súc và phẩm chất hạt giống phụ thuộc nhiều vào việc cung cấp và lượng lân chứa trong đất. Trong mô lượng lân chiếm khoảng 0,3 – 0,35 % trọng lượng chất khô. Nếu lượng này giảm xuống còn 0,2% thì sẽ gây ảnh hưởng không tốt đến sinh trưởng, và phát dục của cây bắp. Lân có tác dụng rất lớn trong việc tạo ra các tế bào sinh sản, giúp cho sự phát triển hạt đầy đủ, ra rễ, nẩy mầm, ra hoa nhanh và chín sớm.

Cây bắp có bộ rễ cứng, ăn sâu, phân hóa nhánh nhiều và phân bố rộng.Tuy nhiên, cây bắp non khó hút lân khó tan trong đất. Trong thời kỳ cây con, bón thúc lân hòa tan có thể thúc đẩy rễ non phát triển, tăng tỷ lệ hạt chắc và trọng lượng hạt trong thời kỳ sau.

Theo FAO (1984), khi bón phân lân trong khoảng 30 – 100kg P_2O_5 có liên quan đến tiềm năng năng suất bắp. Nếu cây hút khoảng 8kg P_2O_5/ha sẽ sản xuất ra 1 tấn hạt (trích dẫn bởi Trần Thị Dạ Thảo, 2006)

Cây bắp cần lân trong khoảng thời gian 50 ngày đầu là 30 %. Giai đoạn tạo hạt bắp cần khoảng 65% và vào giai đoạn chín bắp chỉ cần 5% so với tổng nhu cầu lân của cả thời kỳ sinh trưởng. Nhưng bắp cần lân nhiều nhất ở thời kỳ 6 – 12 lá và trước trổ cờ đến phun râu thụ tinh.

2.2. Giới thiệu nấm cộng sinh Mycorrhiza

Hầu hết các loài thực vật khai thác tiềm năng đất trống nhờ sự giúp ích của các vi sinh vật có lợi trong đất trong đó có một số loài nấm được gọi là *Mycorrhiza* (nấm vùng rễ). Các nhánh sợi nấm như những sợi mảnh len lỏi giữa các hạt đất, phát triển bên trong phân huỷ các chất hữu cơ, thậm chí chúng còn xâm nhập vào vỏ của các côn trùng chết ở đó chúng tìm thấy photpho và các dưỡng chất quan trọng khác. Những dưỡng chất này sau đó được cung cấp cho rễ cây trồng.

Từ Mycorrhiza là một thuật ngữ được Frank sử dụng lần đầu tiên vào năm 1885 khi phát hiện mối liên hệ giữa sợi nấm và rễ cây trên cây thông và một số cây

lá rộng(nguồn website Marcel Bucher's Lab). Xuất phát từ tên gọi rễ cây ở Hy Lạp. Đó là sự kết hợp giữa nấm (*myco*) và rễ (*rhiza*). Dựa vào một vài kiểu kết hợp khác nhau giữa nấm và cây chủ mà chúng được chia làm một số nhóm.

Ectomycorrhiza

Ectomycorrhiza là loại *Mycorrhiza* ngoại cộng sinh, cộng sinh với rễ cây theo kiểu: Nấm bao quanh rễ dinh dưỡng chưa hoá gỗ, không xuyên qua mô tế bào mà chỉ kéo dài giữa các vách tế bào. Đặc trưng cơ bản của chúng là:

- Sợi nấm phát triển trên bề mặt rễ dinh dưỡng hình thành một màng nấm (Mantle) do các sợi đan chéo nhau.
- Giữa các tế bào tầng vỏ rễ hình thành một mạng lưới do thể sợi nấm sinh trưởng mà thành và được gọi là lưới Hartig.
- Do tác dụng của *Mycorrhiza*, bộ rễ ngắn, to, giòn và có màu sắc khác nhau, tán rễ và biểu bì không có lông hút, bề mặt màng có nhiều sợi nấm kéo dài ra.

Ectomycorrhiza nói chung không có hình dạng và màu sắc nhất định rất dễ nhận biết bằng mắt thường. Tính đa dạng thể hiện trên loài cây chủ và *Mycorrhiza* khác nhau. Hầu hết sự kết hợp *Ectomycorrhiza* được hình thành giữa nấm cộng sinh với cây nấm (mushroom) và giữa nấm cộng sinh với các cây gỗ lớn ở trong rừng.

Endomycorrhiza

Endomycorrhiza là loại nấm *Mycorrhiza* nội cộng sinh kết hợp với rễ cây theo kiểu: sợi nấm xuyên qua tế bào và rễ cây chủ, hình thành nên các cấu trúc đặc trưng là versicles và arbuscules nên có thể gọi là VAM (Versicular Arbuscular *Mycorrhiza*), bề mặt rễ không hình thành màng nấm mà chỉ có các sợi lưa thưa, lông hút vẫn giữ nguyên, tuy nhiên sợi nấm vẫn kéo dài giữa gian bào, nhưng không hình thành mạng lưới Hartig. Sợi nấm xuyên qua vách tế bào vào trong hình thành vòi hút. Những loại này rất khó phân biệt bằng mắt thường.

Căn cứ vào kết cấu sợi nấm có vách ngăn và vòi hút, người ta chia ra 2 loại: Không có vách ngăn (Aseptate–endotrophic *Mycorrhiza*) và có vách ngăn (Septate–endotrophic *Mycorrhiza*). Loại không có vách ngăn thường có túi bóng (Vesicular)

và dạng bụi (Arbuscular) và gọi tắt là VA. Loại có vách ngăn lại căn cứ vào cây chủ và hình dạng sợi nấm trong tế bào mà chia ra: Nấm *Mycorrhiza* loại đỗ quyên (Ericaceous *Mycorrhiza*) sợi nấm trong tế bào xoắn vòng (Coil), nấm *Mycorrhiza* loại họ Lan (Orchidaceous *Mycorrhiza*), sợi nấm trong tế bào dạng kết thắt nút (Knot) hoặc cục (Pleton).

Ectoendo mycorrhiza

Ectoendo mycorrhiza là loại nấm *Mycorrhiza* nội ngoại cộng sinh có đặc trưng của cả hai loại trên.

2.2.1. Nấm VAM cộng sinh trong rễ cây trồng

2.2.1.1. Thành phần cấu trúc nấm VAM

a. Cấu trúc trong rễ: Sợi nấm (hypha), bụi (arbuscules), túi (vesicles)

- Sợi nấm (hypha): Không có vách ngăn khi còn non và đâm nhánh bên trong lớp vỏ rễ hình thành nên cấu trúc bụi và túi.
- Bụi (arbuscule): Phân nhánh ngoằn ngèo trong tế bào vỏ.
- Túi (vesicle): Là cấu trúc dự trữ dinh dưỡng cho nấm.

b. Cấu trúc trong đất: Bào tử và sợi nấm.

- Bào tử: Vô tính hình hình cầu lớn (ϕ 20 – 1000 μm) nó được tạo thành từ sợi nấm trong đất hoăc rễ.
- Sợi nấm: Mạng lưới sợi nấm trong đất có hình dạng sợi mỏng, chức năng của nó là ống dẫn để hấp thu chất dinh dưỡng.

*** Sợi nấm (hypha)**

Sự kết hợp *Mycorrhiza* bắt đầu bằng sự nảy mầm của bào tử khi có sự hiện diện của rễ. Nhiều trường hợp đã có sự tồn tại của mạng lưới sợi nấm trước khi rễ hoạt động. Sợi nấm có khả năng phát triển giới hạn, chúng sẽ chết sau vài tuần sau khi nảy mầm mà không gặp rễ kí chủ.

Sợi nấm trong đất là những cấu trúc sợi mỏng phân nhánh xuyên trong đất. Chúng có nhiệm vụ hấp thu chất dinh dưỡng và làm gia tăng sự kết hợp với rễ và hình thành bào tử nấm. Nấm VAM sản xuất ra nhiều loại sợi nấm trong đất bao gồm: Sợi nấm lan truyền hay phân tán và sợi nấm hấp thu.

Từ điểm xâm nhập đi vào sợi nấm phát triển theo hai hướng. Sợi nấm phát triển dọc dài và len lõi giữa rãnh khống khí giữa thành tế bào với tốc độ tương đối nhanh hình thành nên dải sợi nấm dọc theo tế bào gọi là dạng Arum. Một hướng khác là sợi nấm bao phủ trong nội bào phát triển từ cuống xuyên qua vách tế bào hình thành nên những sợi xoắn gọi là Paris.

*** Bụi (arbuscule)**

Bụi phân nhánh rất phức tạp và được hình thành bên trong tế bào vỏ rễ, được đặt tên bởi Gallaud (1905) vì chúng trong giống những cái bụi nhỏ. Bụi được hình thành bằng sự chia đôi của nhánh và sự nén bề rộng sợi nấm, bắt đầu từ thân sợi nấm (ϕ 5 – 10 μm) và kết thúc bằng sự phát triển mạnh của cành nhánh sợi nấm (ϕ 1 μm).

Bụi phát triển bên trong tế bào vỏ rễ, nó được xem là vị trí chủ yếu để trao đổi dinh dưỡng giữa nấm và cây chủ. Giả thuyết này dựa trên bề mặt tiếp xúc rộng lớn của bụi nhưng nó chưa được xác nhận (Smith, 1995). Sự hình thành bụi theo sau sự phát triển của sợi nấm. Bụi chỉ sống được vài ngày và bắt đầu phân hủy, nhưng sợi nấm và túi có thể tồn tại trong rễ suốt vài tháng hoặc vài năm.

*** Túi (vesicle)**

Túi phát triển để tích lũy sản phẩm dự trữ ở nhiều loại VAM. Túi là chỗ phình to lên của sợi nấm trong tế bào vỏ rễ, nó chứa lipid và tế bào chất. Túi có thể nằm trong hoặc bên ngoài gian bào. Túi có thể phát triển dày đặc bên trong rễ già và có chức năng như yếu tố lan truyền giống. Một vài loại nấm sản sinh túi có cấu trúc giống như bào tử trong đất.

*** Bào tử (spore)**

Bào tử cũng chính là chỗ phình to lên của sợi nấm, bào tử được hình thành khi dinh dưỡng đã cạn và sự kết hợp nấm và cây chủ bị già yếu. Bào tử chứa đựng lipid, tế bào chất và nhiều chất nucleid. Bào tử thường có thành tế bào phát triển dày và có chức năng dự trữ, là giai đoạn tiềm sinh cũng là yếu tố lan truyền giống. Bào tử có thể tấp hợp lại thành một nhóm gọi là quả tử (sporocrarp).

2.2.1.2. Cơ chế cộng sinh và mối liên hệ giữa nấm với cây chủ

Sự cộng sinh *Mycorrhiza* bất đầu bằng sự nảy mầm từ một yếu tố lan truyền giống được lưu trữ trong đất, yếu tố đó là bào tử của VAM hoặc là những mảnh rễ có Mycorrhiza cộng sinh. Sợi nấm cảm ứng được sự hiện diện của rễ bằng sự phát triển hướng vào rễ, thiết lập sự tiếp xúc và phát triển dọc theo bề mặt rễ. Tiếp đến, một hoặc nhiều sợi nấm sinh ra khối u gọi là giác bám, bám giữa 2 tế bào biểu bì. Quá trình xâm nhập xảy ra khi sợi nấm từ giác bám đâm thủng biểu bì hoặc vỏ tế bào rễ để xâm nhập vào rễ. Giai đoạn này đánh dấu quá trình sinh trưởng tự dưỡng của nấm. Sợi nấm xâm nhập xuyên vào bên trong khoảng không gian bào và sau đó xâm nhập vào mô rễ và bao phủ ở giữa và xuyên qua các tế bào lớp vỏ rễ. Đầu tiên sợi nấm vươn tới bên trong lớp vỏ, chúng phát triển bên trong tế bào và hình thành các cấu trúc như cây bụi nó được gọi là “Arbuscule". Cấu trúc này là do các cành nhánh của sợi nấm được bao gọn bên trong huyết tương của tế bào nguyên vẹn của cây chủ và là đại diện cho bề mặt tiếp xúc rộng lớn với tế bào giữa hai yếu tố cộng sinh. Cấu trúc bụi này làm dễ dàng trao đổi sản phẩm giữa cây chủ và nấm. Bụi có thể di chuyển vị trí của các chất dinh dưỡng, chủ yếu là P từ sợi nấm đến cây trồng và carbon từ cây trồng đến nấm (Smith và Gianinazzi – Pearson, 1990) cũng như sự xâm nhập bên trong sợi nấm đâm nhánh ra ngoài và phát triển dài dọc theo bề mặt rễ và hình thành nên nhiều điểm xâm nhập vào rễ hơn. Chúng cũng phát triển đi vào đất, sợi nấm kết các hạt đất lại. Smith và Gianinazzi – Pearson, (1990) đã chỉ ra rằng chiều dài sợi nấm phát triển trong đất ước lượng trung bình là khoảng 1m sợi nấm trên 1cm rễ. Mạng lưới sợi nấm này có thể mở rộng hàng centimet bên ngoài từ bề mặt rễ cây, đi qua khu vực cạn kiệt dinh dưỡng cho rễ hấp thu những khoáng kém linh động từ trong đất cung cấp cho cây trồng. Ngược lại, cây trồng cung cấp cho nấm đường, acid amin và vitamin cần thiết cho sự sống của chúng (Harley và Smith, 1983).

2.2.2. Lợi ích của nấm cộng sinh

Cây trồng có có cộng sinh thì được nuôi dưỡng tốt hơn và dễ thích nghi hơn với môi trường. Nó gia tăng sự bảo vệ chống lại những thay đổi của môi trường,

lạnh giá và tính mặn (Sylvia và William, 1992). Hơn nữa, sự cộng sinh làm giảm hậu quả của các tác nhân bệnh hại ở rễ và giảm tối thiểu ảnh hưởng bất lợi của các tác nhân gây hại chính. Trong nông nghiệp, cây trồng cộng sinh với Mycorrhiza thì sử dụng tốt hơn các khoáng chất trong đất, điều này có thể xem xét để giảm sự gia tăng phân bón và thuốc bảo vệ thực vật trên cây trồng. Và trong cùng một thời gian có thể đạt được sản lượng cây trồng tương đương hay thậm chí cao hơn (Jakobsen, Abbott và Robson, 1992). Theo Shannon Peters (2001) nấm cộng sinh *Mycorrhiza* còn có những lợi ích sau:

Sợi nấm gia tăng số lượng trong đất làm rễ cây có thể hấp thu dinh dưỡng tốt hơn, vì vậy mà làm gia tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng bị cố định. Đặc biệt phospho là một nguyên tố nó là một nguyên tố rất quan trọng đối với cây trồng có nhiều trong đất nhưng ở dạng khó hấp thu.

Cùng với sự gia tăng hấp thu dinh dưỡng, sợi nấm cũng cho phép gia tăng hấp thu nước. Hơn nữa, mạng lưới sợi nấm rộng rãi cũng ngăn chặn sự tấn công của bệnh hại đến rễ. Gia tăng sự chống chịu hạn và dịch hại là liên hệ trực tiếp đến sự gia tăng dinh dưỡng của những cây có cộng sinh với *Mycorrhiza* .

Mycorrhiza làm giảm bớt tác hại do kim loại nặng gây ra. Nấm VAM tập hợp kim loại trong vùng rễ lại và làm thay đổi khả năng hấp thụ kim loại của cây trồng.

Sợi nấm VAM được chứng minh rằng nó thải ra chất một chất đường dính như keo, gọi là “Glomaline”, nó giúp các hạt đất lại với nhau giúp cấu trúc đất được cải thiện.

Sự hiện diện của Mycorrhiza cũng làm gia tăng tính đa dạng và mật số vi sinh vật đất, nó tạo nên một hệ sinh thái đất khoẻ mạnh. Hệ sinh thái đất khoẻ mạnh là tất cả những điều kiện để cây trồng được gia tăng chu trình dưỡng chất, gia tăng mối liên hệ giữa không khí và nước, và quan trọng là kháng lại sự xâm nhập và sự thành lập của các vi sinh vật gây hại.

Nâng cao hệ miễn dịch của cây trồng: Tất cả những lợi ích này có mối quan hệ hổ tương và điều kiện giúp cho cây trồng khoẻ mạnh.

2.3. Sơ lược về kỹ thuật PCR

Kỹ thuật PCR do Karl Mullis và cộng sự phát minh năm 1990 được sử dụng rộng rãi nhất trong số các ứng dụng của sinh học phân tử. Về thực chất đây là phương pháp tạo dòng *in vitro* không cần sự hiện diện của các tế bào (Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, 2003)

2.3.1. Nguyên tắc của kỹ thuật PCR

Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) là một phương pháp tổng hợp DNA dựa trên mạch khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và một cặp enzyme đặc hiệu cho đoạn DNA này. Hiện nay, kỹ thuật này được sử dụng rộng rãi để phát hiện các đột biến gen, chẩn đoán phát hiện mầm bệnh trên người, động vật, thực vật, thực phẩm (trích dẫn bởi Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, 2003)

Tất cả các DNA polymerase đều cần những primer để tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn. Mạch khuôn thường là một trình tự DNA của gen (gọi là trình tự DNA mục tiêu) đặc trưng cho loài sinh vật mục tiêu hoặc là gen quy định việc tổng hợp một loại độc tố chuyên biệt của vi sinh vật (trích dẫn bởi Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, 2003)

Primer là những đoạn DNA ngắn, có khả năng bắt cặp bổ sung với một mạch của đoạn DNA khuôn và nhờ hoạt động của DNA polymerase đoạn primer này được kéo dài để hình thành mạch mới. Kỹ thuật PCR được hình thành dựa trên đặc tính này của DNA polymerase, đoạn DNA nằm giữa hai primer sẽ được khuếch đại thành số lượng lớn bản sao đến mức có thể thấy được sau khi nhuộm bằng ethidium bromide và có thể thu nhận đoạn DNA này cho các mục đích khác nhau bằng các thao tác trên gel. Như vậy, để khuếch đại một trình tự DNA xác định, cần phải có những thông tin tối thiểu về trình tự của DNA, đặc biệt là trình tự base ở hai đầu đoạn DNA đủ để tạo các primer bổ sung chuyên biệt (trích dẫn bởi Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, 2003).

Phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước như sau :

Bước 1: (Biến tính **tách đôi sợi DNA, denaturation)**

Giai đoạn này được thực hiện ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ nóng chảy của phân tử (94 – 95 ^{0}C) trong vòng 30 giây đến 1 phút, làm cho phân tử DNA mạch kép tách thành 2 mạch đơn. Chính 2 mạch đơn này đóng vai trò là mạch khuôn cho sự tổng hợp 2 mạch bổ sung mới.

Bước 2: (bắt cặp, annealing)

Trong bước này ở nhiệt độ được hạ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy (Tm) của các primer, cho phép các primer bắt cặp với mạch khuôn. Trong thực nghiệm nhiệt độ này dao động trong khoảng 30 – 70 ^{0}C. Tùy thuộc vào Tm của các primer mà thời gian bắt cặp kéo dài từ 30 – 60 giây.

Bước 3: (kéo dài, elongation – extension)

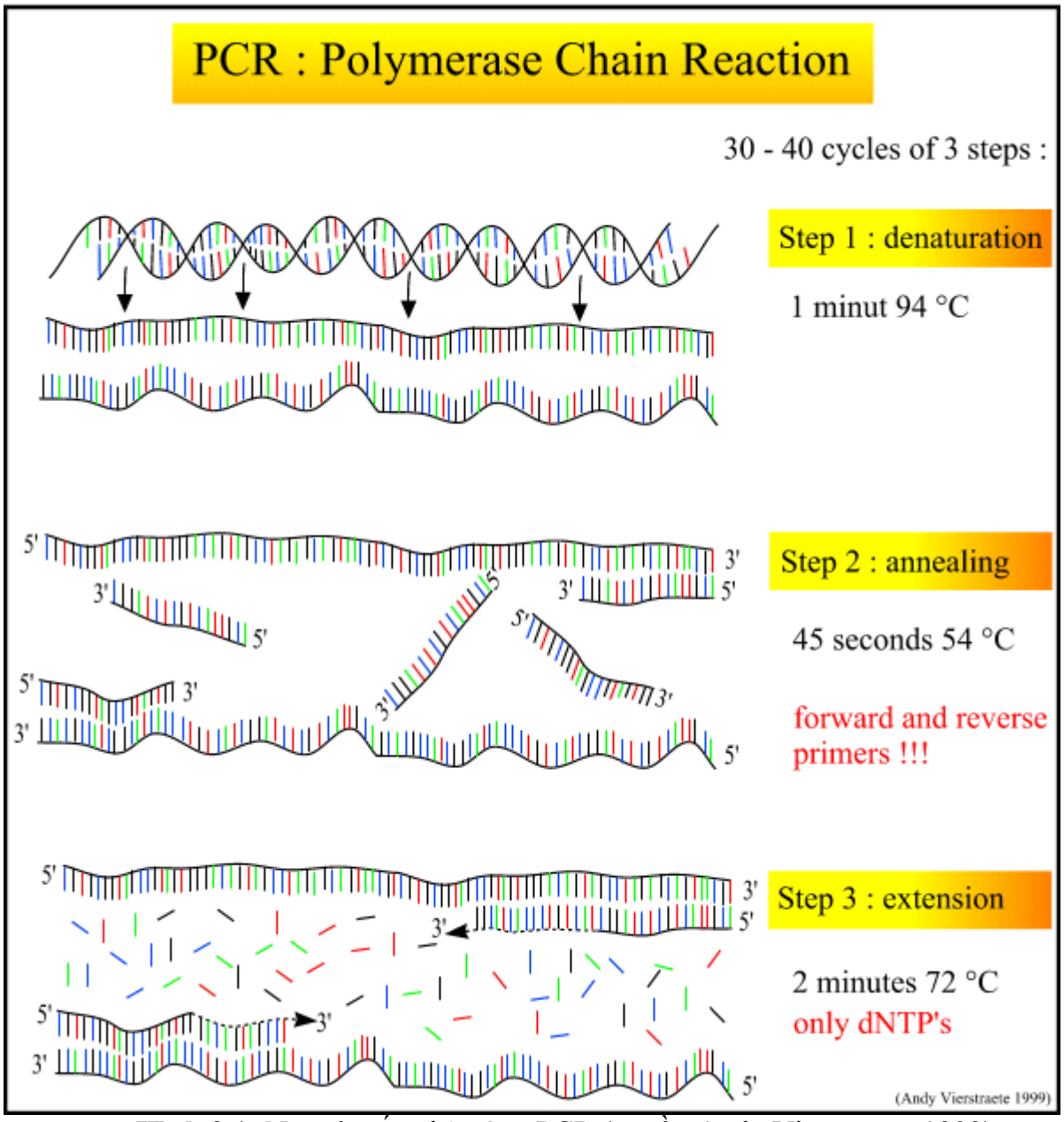
Nhiệt độ được tăng lên 72 ^{0}C giúp cho DNA polymerase hoạt động tốt nhất. Dưới tác động của DNA polymerase, các nucleotide lần lượt gắn vào primer theo nguyên tắc bổ sung với mạch khuôn. Thời gian của giai đoạn này tùy thuộc vào độ dài của trình tự DNA khuếch đại, thường kéo dài từ 30 giây đến vài phút.

Trong phản ứng PCR một chu kỳ gồm 3 bước như trên được lặp đi lặp lại nhiều lần, làm số lượng DNA được gia tăng theo cấp số nhân. Kết quả cuối cùng là một đoạn mã hóa di truyền đặc biệt nào đó được khuếch đại lên rất nhiều lần. Sự khuếch đại này có thể được tính như sau:

Tổng lượng DNA khuếch đại = m x 2n

m: Là số bản sao của chuỗi mã hóa.

n: Là số chu kỳ.



Hình 2.1: Nguyên tắc phản ứng PCR (nguồn Andy Vierstraete, 1999)

Ba trình tự này xảy ra theo chu kỳ rất nhanh để khuếch đại DNA. Trong chu kỳ thứ nhất và thứ hai của phản ứng khuếch đại, chỉ có sản phẩm chuỗi dài được hình thành, còn trong những chu kỳ tiếp theo khuếch đại cả những sản phẩm chuỗi dài và chuỗi ngắn. Sản phẩm chuỗi dài được tích tụ theo hướng tuyến tính, còn sản phẩm chuỗi ngắn tích tụ theo logarit. Do đó, người ta hy vọng có khoảng 10^5 lượng sản phẩm chuỗi ngắn sau khoảng 25 – 30 chu kỳ. Theo nguyên tắc PCR được áp dụng để khuếch đại các đoạn DNA có chiều dài 200 – 2000 bp.

2.3.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR

2.3.2.1. DNA mẫu

Phản ứng khuếch đại tối ưu xảy ra trên DNA thật tinh sạch. Tuy nhiên, những kỹ thuật chẩn đoán bằng PCR vẫn cho kết quả tốt với DNA thu nhận trực tiếp từ dịch chiết tế bào (trích dẫn bởi bởi Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2003)

Lượng DNA mẫu sử dụng cũng có khuynh hướng giảm (1µg xuống còn 100ng) với việc sử dụng các polymerase cho hiệu quả cao. Hơn nữa việc giảm lượng mẫu ban đầu còn hạn chế các khuếch đại "kí sinh", tạo những sản phẩm phụ không mong muốn (trích dẫn bởi Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2003).

Thông thường, nhiễm protein trong mẫu DNA trong quá trình ly trích DNA sẽ không ảnh hưởng xấu đến sự nhân DNA. Tuy nhiên nhiễm DNA lạ sẽ dẫn đến kết quả PCR bị sai lệch.

Đối với những DNA có kích thước quá lớn (>50 kb), sự biến tính có thể không hữu hiệu và năng suất PCR thấp. Trong trường hợp này, cần phải cắt DNA trước bằng enzyme cắt hạn chế mà enzyme đó không cắt trong chuỗi đích; Hoặc có thể tách DNA bằng cách dùng nhiệt độ tới 100 ^{0}C trong 2 – 5 phút.

2.3.2.2. Taq polmerase

Taq polymerase là enzyme chịu nhiệt ly trích từ vi khuẩn suối nước nóng *Thermus aquaticus*. Với enzyme này, PCR cho hiệu quả cao nhất, Taq có thể xúc tác kéo dài khoảng 35 – 100 nucleotide trong 4 giây ở nhiệt độ 70 – 80 ^{0}C, đây là giới hạn nhiệt độ thích hợp nhất cho enzyme này hoạt động .

Nồng độ Taq polymerase được sử dụng thông thường là 0,5 – 5 đơn vị/100µl dung dịch phản ứng. Nếu nồng độ Taq quá cao, những sản phẩm không chuyên tính có thể nhảy vào làm sai lệch kết quả. Nếu nồng độ Taq quá thấp, chúng ta sẽ không có đủ số lượng enzyme để xúc tác tạo ra sản phẩm PCR theo ý muốn.

2.3.2.3. Primer

Primer là chỉ tiêu quan trọng nhất để đạt được sự khuếch đại đặc trưng và có hiệu quả cao. Việc chọn primer là giai đoạn quyết định của kỹ thuật PCR, việc thiết kế primer phải tuân thủ một số chỉ tiêu cơ bản sau :

a. Chiều dài primer

Đây là một chỉ tiêu quan trọng cho sự thành công của PCR, vì tính đặc hiệu và nhiệt độ bắt cặp của primer phụ thuộc một phần vào chiều dài primer. Thông thường primer có chiều dài từ 18 – 24 base (theo nguyên tắc của Wallace) có tính đặc hiệu cao, và cho nhiệt độ bắt cặp tối ưu. Kích thước primer không nên quá ngắn, trừ trường hợp phục vụ cho mục đích đặc biệt, và cũng không nên quá dài vì sẽ làm giảm khả năng bắt cặp.

b. Nhiệt độ nóng chảy Tm

Hai primer xuôi và ngược trong phản ứng PCR phải có nhiệt độ nóng chảy không cách biệt nhau quá xa, vì nếu sự chênh lệch nhiệt độ lớn thì primer có Tm cao hơn sẽ bắt cặp không đặc hiệu, còn primer có Tm thấp hơn sẽ không thể lai được với DNA.

c. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của primer phụ thuộc một phần vào chiều dài primer như đã nói ở trên. Để có độ đặc hiệu cao, primer phải được thiết kế sao cho chỉ khuếch đại một trình tự đặc trưng duy nhất trên DNA hay chỉ cho một sản phẩm chính, và không nên có nhiều trình tự lặp lại trên primer, vì điều này sẽ dẫn đến sự xuất hiện các sản phẩm phụ.

d. Trình tự bổ sung trên primer

Trình tự primer phải được thiết kế sao cho có không quá 3 cặp base có trình tự bổ sung với nhau, vì điều này sẽ dẫn đến hiện tượng "kẹp tóc" do sự bắt cặp bổ sung giữa các phần khác nhau của một primer, làm ngăn cản sự bắt cặp của primer với DNA.

Hai primer xuôi và ngược phải không có trình tự bắt cặp bổ sung với nhau để tránh hiện tượng "dimer primer", vì điều này sẽ dẫn đến sự cạnh tranh bắt cặp với DNA và cản trở sự hình thành sản phẩm mong muốn. Ngoài ra, nồng độ quá thừa của primer cũng dẫn đến sự hình thành "dimer primer" (trích dẫn bởi Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999). Thông thường, primer xuôi và primer ngược thường có nồng độ bằng nhau, khoảng 0,1 µM tương đương với 2,5 pmol trong 25 µl dung

dịch phản ứng. Trình tự DNA nằm giữa hai mồi "xuôi" và "ngược" không được quá lớn. Phản ứng sẽ tối ưu trên những trình tự DNA nhỏ hơn 1 kb (trích dẫn bởi Hoàng Thị Liễu, 2004).

e. Hàm lượng GC và AG

Thành phần nucleotide của các primer nên cân bằng, tránh cặp GC lặp lại nhiều lần. Hàm lượng GC của primer nên nằm trong khoảng 45% đến 50% (Kwork và ctv., 1989), trình tự primer lý tưởng nhất là có 50% GC (theo nguyên tắc của Wallace). Trình tự primer phải không có poly G hay poly C, poly A hay poly T, vì điều này sẽ làm cho sự bắt cặp không đặc hiệu. Trình tự polypyrimidine T,C hay polypurine A, G cũng cần phải tránh vì nó làm giảm hiệu quả khuếch đại.

f. Trình tự đầu 3'

Vị trí đầu 3' của primer rất quan trọng trong việc kiểm soát hiện tượng "mismatch" – bắt cặp không đặc hiệu. Cần tránh trình tự A hay T ở đầu 3', mà thay vào đó là G hoặc C vì mối liên kết hydro giữa G – C mạnh hơn A – T sẽ bảo đảm cho sự bắt cặp đặc hiệu.

2.3.2.4. Nhiệt độ bắt cặp

Kỹ thuật PCR rất mẫn cảm với nhiệt độ. Vì thế bất cứ sự thay đổi nhiệt độ nào của phản ứng cũng có thể ảnh hướng mạnh đến năng suất và độ chuyên biệt.

Mối quan hệ giữa nhiệt độ bắt cặp Ta và đoán nhiệt độ nóng chảy Tm của primer là một trong những vấn đề vẫn đang được tìm hiểu. Thông thường, nhiệt độ bắt cặp thường thấp hơn nhiệt độ nóng chảy từ 2 – 5 ^{0}C. Nếu nhiệt độ bắt cặp quá thấp dẫn đến sản phẩm được nhân lên quá mức do sự bắt cặp các primer không chuyên biệt có thể xảy ra. Nếu nhiệt độ bắt cặp quá cao, năng suất của sản phẩm mong muốn sẽ giảm.

Thông thường, với một oligonucleotide có 20 nucleotide có thể dùng nhiệt độ bắt cặp 50 – 55 ^{0}C. Nếu chuỗi dài hơn (25 nucleotide hay nhiều hơn) hoặc có thể nhiều base G, C, nhiệt độ bắt cặp có thể đến 55 – 65 ^{0}C. Trong vài phản ứng, oligonucleotide lớn (từ 30 bp trở lên), giai đoạn bắt cặp và kéo dài có thể được kết hợp và thực hiện ở 68 – 72 ^{0}C (trích dẫn bởi Hoàng Thị Liễu, 2004).

2.3.2.5. Tỉ lệ primer/DNA khuôn mẫu

Một trong những yếu tố quan trọng nhất của PCR là tỉ lệ tối ưu giữa primer DNA mẫu. Nếu tỉ lệ này quá cao, hiện tượng primer – dimer sẽ xuất hiện, giống như trường hợp DNA mẫu quá loãng. Nếu tỉ lệ này quá nhỏ, kết quả sản phẩm PCR sẽ không nhiều.

Hầu hết các trường hợp áp dụng PCR, đều dùng một nồng độ primer không quá 0,5μM (12,5 pmol/25 μL phản ứng), không tính đến nồng độ DNA mẫu, để tránh hiện tượng primer – dimer.

2.3.2.6. Các thành phần khác

a. Nồng độ dNTP (các deoxynucleotide triphotphat)

Nồng độ dNTP thường được sử dụng là 20 – 200 μM. Nồng độ cao hơn dễ dẫn đến sự khuếch đại "ký sinh". Bên cạnh đó, sự cân bằng trong thành phần các dNTP cũng ảnh hưởng đến phản ứng PCR. Sự mất cân bằng trong thành phần các dNTP sẽ làm tăng các lỗi sao chép của DNA polymerase.

Nồng độ dNTP thích hợp nhất cho một phản ứng PCR còn phụ thuộc vào nồng độ Mg^{2+}, nồng độ primer, số lượng chu kỳ của phản ứng và chiều dài của sản phẩm được khuếch đại. Vì thế, nồng độ dNTP tối ưu cho từng phản ứng phải được xác định qua thực nghiệm.

b. Nồng độ $MgCl_2$

Nồng độ $MgCl_2$ cũng là một nhân tố ảnh hưởng mạnh đến phản ứng PCR. Mg^{2+} rất cần cho quá trình liên kết các dNTP, xúc tác cho enzyme Taq polymerase, làm tăng Tm của DNA mạch kép. Mg^{2+} là Co – factor của Taq polymerase nên nếu lượng Mg^{2+} quá thấp thì Taq polymerase sẽ không thể hoạt động bình thường trong giai đoạn kéo dài (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999), hạn chế quá trình kéo dài. Ngược lại nồng độ Mg^{2+} cao sẽ giúp ổn định dây đôi DNA và ngăn ngừa sự biến tính hoàn toàn (do sự mở dây đôi DNA) của sản phẩm trong mỗi chu kỳ, làm cho sản phẩm PCR ít đi; đồng thời, có thể làm cho hiện tượng bắt cặp giả xảy ra ổn định hơn và cho ra những sản phẩm mong muốn với số lượng quá lớn nhưng mức độ chuyên biệt thấp.

c. Chất ổn định hoạt động enzyme

Những hoạt chất ổn định hoạt động enzyme cũng được chú ý. Nhiều nhà sản xuất hoá chất đã xem xét gelatin hoặc Triston X – 100 trong những buffer để tồn trữ enzyme. Có trường hợp người ta sử dụng cả hai làm dung dịch đệm. Nhằm bảo quản và ổn định enzyme trong quá trình xử lý nhiệt của PCR, mỗi dung dịch đệm trong phản ứng đều có chứa gelatin ở nồng độ 0,01% và Triston X – 100 ở nồng độ 0,1%.

d. Dung dịch đệm

Một nồng độ cao của dung dịch đệm PCR được sử dụng để tăng cường hiệu quả cho phản ứng PCR. Sau đây là dung dịch đệm PCR được xem là tốt hơn đối với các đệm đang có mặt trên thị trường

- 16,6 mM ammoniumsulfate
- 67,7 mM TRIS – HCl, pH 8,89
- 10 mM beta – mercaptoethanol
- 170 microgams/ml BSA
- 1,5 – 3 mM $MgCl_2$

e. Số lượng chu kỳ của phản ứng PCR

Trong thực tế số chu kỳ cho một phản ứng PCR không nên vượt quá 40. Sở dĩ như vậy vì phản ứng PCR diễn tiến qua hai giai đoạn :

Giai đoạn đầu: Số lượng bản sao tăng lên theo cấp số nhân, tỉ lệ với lượng mẫu ban đầu.

Giai đoạn sau: Hiệu quả khuếch đại giảm hẳn do sự phân hủy và cạn kiệt các thành phần của phản ứng, sự xuất hiện các sản phẩm phụ ức chế phản ứng, hoặc các bản sao vừa được tổng hợp không kết hợp với mồi mà bắt cặp với nhau.

Số chu kỳ cho một phản ứng PCR tùy thuộc số lượng mẫu DNA ban đầu. Nếu số lượng mẫu ban đầu là 10^5 thì cần 25 – 30 chu kỳ. Nếu số lượng mẫu ban đầu là $10^2 – 10^3$ thì số chu kỳ phải là 35 – 40 chu kỳ.

f. Thiết bị và dụng cụ trong phản ứng PCR

Thực chất, một thiết bị dùng để tiến hành phản ứng PCR chỉ cần đáp ứng yêu cầu thay đổi nhiệt độ thật nhanh và chính xác. Các thiết bị hiện nay đã được cải tiến để tránh tối đa sự bốc hơi nước trong trong quá trình phản ứng, hay cho phép tiến hành PCR ngay trên mô và tế bào. Tuy nhiên, mỗi thiết bị đều có đặc điểm khuếch đại riêng nên mọi thí nghiệm của một nghiên cứu cần được tiến hành trên cùng một loại thiết bị. Hơn nữa, ống nghiệm (eppendorf) dùng cho các phản ứng của cùng một nghiên cứu phải cùng kiểu vì tính đặc tính truyền nhiệt của các ống này cũng như nhiệt độ tiếp xúc giữa các ống và bộ phận tạo nhiệt của thiết bị khuếch đại có ảnh hướng lớn đến kết quả PCR.

2.3.3. Các vấn đề thường gặp trong phản ứng PCR và hướng giải quyết

2.3.3.1. Có nhiều sản phẩm không chuyên biệt có kích thước dài hơn

- Giảm thời gian bắt cặp.
- Tăng nhiệt độ bắt cặp.
- Giảm thời gian kéo dài.
- Giảm nhiệt độ kéo dài đến: 62 – 68 ^{0}C.
- Tăng nồng độ KCl trong dung dịch đệm đến 1,2 X – 2 X nhưng vẫn giữ nồng độ $MgCl_2$ ở 1,5 – 2 mM.
- Tăng nồng độ $MgCl_2$ lên 3 – 4,5 mM nhưng vẫn giữ nồng độ dNTP không đổi.
- Giảm nồng độ primer.
- Giảm nồng độ DNA khuôn mẫu.
- Giảm nồng độ Taq polymerase xuống.
- Nếu không phải từng lý do trên thì phải kiểm tra lại trình tự primer bằng cách Blast để đối chiếu với giữ liệu trên ngân hàng gene.
- Nếu không được thì có thể kết hợp tất cả hoặc một vài yếu tố trên.

2.3.3.2. Có nhiều sản phẩm không đặt hiệu với kích thước ngắn hơn

- Tăng nhiệt độ bắt cặp.
- Tăng thời gian bắt cặp.

- Tăng thời gian kéo dài.
- Tăng nhiệt độ kéo dài: 74 – 78 ^{0}C.
- Giảm nồng độ muối KCl xuống còn 0,7 – 0,8X nhưng vẫn giữ nồng độ $MgCl_2$ ở 1,5 – 2 mM.
- Tăng nồng độ $MgCl_2$ lên 3 – 4,5 mM nhưng vẫn giữ nồng độ dNTP không đổi.
- Giảm nồng độ DNA khuôn mẫu.
- Giảm nồng độ Taq polymerase xuống.
- Nếu không phải từng lý do trên thì phải kiểm tra lại trình tự primer bằng cách Blast để đối chiếu với giữ liệu trên ngân hàng gene.
- Nếu không được thì có thể kết hợp tất cả hoặc một vài yếu tố trên.

2.3.3.3. Không thu được bất kỳ sản phẩm nào

- Đảm bảo chắc chắn các thành phần PCR đã được cho vào.
- Thay đổi dung dịch dNTP.
- Nếu mới mua primer mới thì phải kiểm tra lại để đảm bảo độ tin cậy.
- Tăng nồng độ primer.
- Tăng lượng DNA khuôn mẫu.
- Giảm nhiệt độ bắt cặp xuống 6 – 10 ^{0}C.
- Nếu làm như vậy mà thu được sản phẩm (kể cả không đặc hiệu) thì thực hiện như đã trình bày ở trên.

2.3.3.4. Sản phẩm quá yếu

- Giảm dần dần nhiệt độ bắt cặp xuống thấp nhất đến có thể.
- Tăng nồng độ primer.
- Tăng lượng DNA khuôn mẫu.
- Tăng nồng độ Taq polymerase.
- Thay đổi nồng độ KCl (cao hơn nếu sản phẩm thấp hơn 1000bp và thấp hơn nếu sản phẩm lớn hơn 1000bp).

- Kiểm tra lại trình tự primer xem có lỗi không và/hoặc tăng chiều dài primer lên 5 nucleotide.
- Kết hợp tất cả hoặc một vài yếu tố trên.

2.4. Những nghiên cứu trên thế giới và trong nước

2.4.1. Tình hình nghiên cứu trong nước

Tuy có nhiều tài liệu đề cập đến vai trò của nấm cộng sinh *Mycorrhiza* nhưng chưa có nghiên cứu về vai trò của *Mycorrhiza* đối với cây bắp cũng như ảnh hưởng của các biện pháp kỹ thuật canh tác, dinh dưỡng đất đến nấm cộng sinh trên bắp.

Các nghiên cứu sâu rộng về nấm *Mycorrhiza* ở mức độ sinh học phân tử, bằng các phương pháp như PCR, RFLP, RAPDchưa được tiến hành hoặc chưa được công bố.

2.4.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới về ảnh hưởng của nấm *Mycorrhiza* đến khả năng hút dinh dưỡng của cây chủ.

Theo Trần Văn Mão (2004), trên thế giới đã nghiên cứu hiệu quả của nấm VA – Mycorrhiza chủ yếu là nấm Glomus sp. về khả năng hấp thu dinh dưỡng P. Hàm lượng P trong tế bào rễ cây bắp có sự cộng sinh của nấm VA – *Mycorrhiza* tăng 35% đối với các loài nấm *Glomus mosseae* và 98% đối với loài nấm *Glomus* fasciculatum. Hàm lượng P được tích luỹ trong rễ bắp ở dạng hỗn hợp phân tử P hữu cơ và acid hoà tan và phân tử cao phân tử của acid không hoà tan (RNAs). Hàng ngày P được di chuyển đến các bộ phận của cây bắp theo phương pháp động lực học, và phụ thuộc vào từng giai đoạn sinh trưởng của cây bắp. Ở giai đoạn 60 ngày P được mang đến mạnh nhất ở dạng orthophosphorus, từ 70 ngày đến khi cây bắt già dạng P chủ yếu orthophosphorus. Dinh dưỡng P đối với cây bắp được xem là nhân tố cần thiết của quá trình cộng sinh (Biosynthetic). Sự cộng sinh của nấm VAM cải thiện khả năng hấp thụ P ở cây trồng, sự vận chuyển và sự chuyển tiếp đến phần lớn các cây trồng (trích dẫn Trần Văn Mão, 2004).

Trên thế giới với tiến bộ đã có nhiều nghiên cứu về nấm mycohriza ở mức độ phân tử, bằng kỹ thuật PCR và nhiều kỹ thuật tương tự như RFLP,RAPD khuyếch

đại trên nhiều vùng khác nhau của nấm. Các vùng khuyếch đại, các phương pháp, các loài nấm được nghiên cứu được thống kê theo bảng sau:

Bảng 2.4 Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Amplification region	Molecular marker	Primer/s	Target organism
SSU rDNA	PCR	VANS1	Glomales
Genomic DNA	PCR–RADP	OPA-02 and OPA-04	*Glomus versiforme, Gl. mosseae*
		OPA-18 and P124	*Gl. caledonium*, *Acaulospora laevis*,
		OPA-18 and P124	*Gigaspora margarita, Scutellospora gregaria*
SSU rDNA	PCR	VANS1 and NS21	*G. intraradices*
Genomic DNA	Competitive PCR	PO and M3	*G. mosseae*
ITS	PCR–RFLP	ITS1 and ITS4	*Glomus* sp., *Scutellospora* sp., *Gigaspora* sp.
SSU 1492′	PCR	NS71 and SSU1492′	*Gigaspora* sp.
Partial rDNA	PCR-partial	SS38 and VANS1	Roots and spores of AM,
		VANS1	*Scutellospora* and *Glomus*
		VAGIGA	Gigasporaceae
ITS1 and ITS2	PCR	ITS1 and ITS2	*G. margarita*
ITS	PCR	ITS1 and ITS4	*G. mosseae* and *Gigaspora margarita*
SSU rDNA	PCR–RFLP	LR1 and FLR2	Subgroups of Glomales
	PCR-nested	FLR2-5.23 and FLR2-8.23	*G. mosseae*, *G. intraradices*
		LR1-23.46	*G. roseae*
28S rDNA	PCR–SSCPs	LSU-Primers	*Glomus* sp.
SSU rDNA	PCR	NS31 and AM1	*Glomus* sp.
SSU rDNA	PCR–SSCP	VANS1	Subgroups of Glomales
	Nested–PCR	ITS, AM1	
ITS	PCR–RFLP	ITS1 and ITS4	*G. mosseae*
ITS	Nested PCR–SSCP	Eukaryotic universal primer	*Glomus* sp.
		Glomus-specific ITS primer	
ITS	Nested-PCR	ITS 5 and ITS4	Glomeromycota (except Archaeosporaceae)
ITS	PCR	SSU-Glom/LSU-Glom1	Major groups within Glomeromycota
		ITS5 and ITS4	

(Nguồn S. Ram Reddy, 2005)

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

3.1. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu ảnh hưởng của nấm *Glomus* sp. và bốn mức phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 trong nhà lưới.
- Thí nghiệm PCR chỉ phát hiện trên ba giống: *Glomus* sp., G*igaspora* sp., *Scutellospora* sp.

3.2. Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài

3.2.1. Thời gian

Đề tài được tiến hành từ ngày 1/3/2007 đến 3/8/2007.

3.2.2. Địa điểm

- Phòng thí nghiệm Nông hóa Thổ nhưỡng khoa Nông học.
- Phòng thực tập của Bộ môn cây Lương thực, Rau quả.
- Nhà lưới của trại thí nghiệm khoa Nông học.
- Trung Tâm Phân Tích Thí Nghiệm trường Đại Học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh.

3.3. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nấm Glomus sp. và bốn mức phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 trong nhà lưới

3.3.1. Vật liệu và phương pháp

3.3.1.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống bắp C919. nguồn gốc công ty Monsanto việt nam. Chiều cao cây 191,7 cm, chiều cao đóng bắp 90 cm.chiều dài bắp 16 – 18 cm, có 14 – 16 hàng ạt, tỷ lệ hạt/bắp 76,8 % khối lượng 1000 hạt 290 – 300 g. năng xuất rug bình 60 – 70 tạ/ha. (nguồn Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2005)
- Đất cát đã được khử trùng 121 ^{0}C trong 30 phút
- Chậu nhựa không đục lổ có khả năng chứa 5kg cát được tiệt trùng.
- Rễ bắp chứa bào tử nấm *glomus* sp.
- Phân bón: Ure (46% N), Supper lân (13,5% P_20_5), Kali (60% K_20).

- Kính hiển vi độ phóng đại 40.
- Kính soi nổi độ phóng đại 30.

*** Thành phần hóa tính của đất trước thí nghiệm**

pH (H_2O) = 7,09 pH (KCl) = 6,62

Lân dễ tiêu = 0,98 mg P_2O_5/kg đất

Mùn = 0,192809

Chất tổng số: Đạm = 0,0238 % Lân = 0,0066 % Kali = 0,1 %

3.3.3.2. Phương pháp thí nghiệm

Đây là thí nghiệm 2 yếu tố.

- Mức lân (4 mức): 0 mg P_20_5/1kg đất (**0P**)
  100 mg P_20_5/1kg đất (**100P**)
  200 mg P_20_5/1kg đất (**200P**)
  400 mg P_20_5/1kg đất (**200P**)
- Nấm *glomus* sp.: Không chủng nấm (**0N**)
  Có chủng nấm (**1N**)

Kết hợp thành 8 nghiệm thức

- Nghiệm thức 1 (NT1): 0 mg P_20_5/1kg đất, Không chủng nấm (0N, 0P)
- Nghiệm thức 2 (NT2): 0 mg P_20_5/1kg đất, Có chủng nấm (1N,0P)
- Nghiệm thức 3 (NT3): 100 mg P_20_5/1kg đất, Không chủng nấm (0N,100P)
- Nghiệm thức 4 (NT4): 100 mg P_20_5/1kg đất, Có chủng nấm (1N,100P)
- Nghiệm thức 5 (NT5): 200 mg P_20_5/1kg đất,Không chủng nấm (0N, 200P)
- Nghiệm thức 6 (NT6): 200 mg P_20_5/1kg đất, Có chủng nấm (1N, 200P)
- Nghiệm thức 7 (NT7): 400 mg P_20_5/1kg đất, Không chủng nấm (0N, 200P)
- Nghiệm thức 8 (NT8): 400 mg P_20_5/1kg đất, Có chủng nấm (1N, 200P)

Thí nghiệm 8 nghiệm thức được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên trong nhà lưới. Thực hiện với ba lần lặp lại mỗi nghiệm thức trồng 3 chậu, mỗi chậu một cây.

Thí nnghiệm được bố trí theo hàng. Hàng cách hàng 70 cm. Trên hàng cây cách cây 35 cm.

Sơ đồ bố trí thí nghiệm:

NT1	NT6	NT3	NT8
NT5	NT2	NT7	NT4
NT2	NT7	NT4	NT1
NT6	NT3	NT8	NT5
NT7	NT4	NT5	NT6
NT3	NT8	NT1	NT2

3.3.3.4. Quy trình kĩ thuật

a. Chuẩn bị chậu đất trồng

Chậu nhựa có kích thước 20 x12 x 15 cm. Không có lỗ ở đáy, đã được khử trùng bằng cồn 90^0, có sức chứa 5 kg đất đã được tiệt trùng có ẩm độ 2 %.

Nấm được chủng 1 lần trước khi gieo hạt. Nấm được chủng bằng phương pháp chủng rễ bắp chứa nguồn nấm *glomus* sp.có sẵn với liều lượng 100 g/chậu.

b. Gieo hạt

Hạt đã được khử trùng bề mặt hạt.

Mỗi chậu gieo ba hạt.

c. Bón phân:

Bón lót: toàn bộ phân lân tương ứng với các nghiệm thức được trộn đều vào đất của mỗi chậu.

Bón thúc chia làm 5 lần, định kì 7 ngày/lần bắt đầu 10 NSG, bón phân cách gốc 10 cm, theo công thức phân bón thúc: 120 kg N + 80 kg K_2O/ha.

d. Chăm sóc:

Tỉa cây vào thời điểm 10 ngày sau gieo. Để lại mỗi chậu một cây sao cho các cây giữa các nghiệm thức có sự đồng nhất về độ lớn.

Tưới nước hằng ngày, lượng nước theo nhu cầu của cây.

3.3.3.4. Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

Qui trình theo dõi cây ở nhà lưới được thực hiện theo qui trình của Viện nghiên cứu ngô quốc gia, 2002. Tiến hành cho tất cả các nghiệm thức với ba lần lập lại.

a. Thời gian sinh trưởng

Theo dõi từng chậu với 3 lần lặp lại.

+ Ngày tung phấn: hoa đực (bông cờ) tung phấn.

+ Ngày phun râu: cây có râu nhú ra 1 – 2 cm.

+ Ngày chín: Trái có lá bi vàng.

b. Số lá

Lá trên cây được tính khi thấy rõ cổ lá, bắt đầu đếm 13 NSG, định kỳ 10 ngày 1 lần, trên 3 lần lặp lại, theo dõi bằng phương pháp dùng sơn đánh dấu.

c. Diện tích lá

Được tính theo công thức Ivanor: S = a x b x k.

S: diện tích lá (dm^2).

a: Chiều dài lá đo từ cổ lá đến chóp lá (dm).

b: Chiều rộng lá đo chỗ rộng nhất của lá (dm).

k: hệ số lá (k = 0.7).

Theo dõi vào giai đoạn tung phấn – phun râu.

d. Chiều cao cây

Đo từ gốc đến đỉnh phân nhánh cờ đầu tiên vào giai đoạn trổ cờ, phun râu.

e. Chiều cao đóng trái

Đo từ gốc đến chân trái hữu hiệu.

f. Đường kính thân

Đo cách gốc 10cm trước thu hoạch 10 ngày tiến hành 3 lần lặp lại.

g. Trọng lượng chất khô thân lá, rễ (g/cây)

Mỗi nghiệm thức nhổ 1 cây khi thu hoạch, cân trọng lượng tươi, băm nhỏ trộn đều, lấy 200 gam đem sấy 90 ^{0}C liên tục đến khi trọng lượng chất khô không đổi, cân và tính trọng lượng chất khô cho một cây.

h. Đặc điểm hình thái trái

- Chiều dài sinh học: đo từ gốc trái đến chóp trái.
- Chiều dài kết hạt: đo khoảng chiều dài có hạt.

i. Các yếu tố cấu thành năng suất

- Số hàng /trái: Đếm số hàng trên 3 trái mẫu lấy trung bình.
- Số hạt/hàng: Đếm mỗi trái ba hàng và lấy trung bình.
- Trọng lượng 100 hạt: Lấy 3 mẫu trái/ô, tách hạt, trộn đều, đếm đủ 100 hạt cân lần một, lần 2, rồi lấy giá trị trung bình và qui về ẩm độ 15%.
- Tỷ lệ hạt/trái (%) = Trọng lượng hạt/Trọng lượng trái x 100.
- Năng suất lý thuyết: NSLT = Trọng lượng hạt/cây x mật độ cây/ha

k. Khả năng cộng sinh

kiểm tra cộng sinh theo phương pháp của boberg và Dyberg, 2002

- Tỉ lệ cộng sinh:

  TLCS (%) = (∑giao điểm có cộng sinh/∑giao điểm quan sát)* 100

- Mật độ nấm cộng sinh (MDNCS)/dm rễ

  MDNCS /dm rễ = Tổng số ĐVNCS/dm

  ĐVNCSD: đơn vị nấm cộng sinh (túi ,bụi hoặc sợi)

3.3.3.4. Phương pháp xử lí số liệu

Các số liệu thí nghiệm được thu thập và xử lí thống kê bằng phần mềm STATGRAFIC 7.0

3.4. Thí nghiệm PCR phát hiện trên ba giống: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp

3.4.1. Vật liệu nghiên cứu trong phản ứng PCR

3.4.1.1. Các hóa chất dùng trong PCR

- 10X PCR buffer.

- 25mM $MgCl_2$.
- 10mM dNTP's.
- Taq DNA polymerase.
- Primer.
- DNA mẫu
- H_2O cất 2 lần, siêu lọc, hấp khử trùng.

3.4.1.2. Hóa chất dùng trong diện di

- Agarose.
- Loading dye.
- TAE 0.5X.
- Ethidium bromide.

3.4.1.3. Primer sử dụng

Dựa theo nghiên cứu của Kjoller và Rosendahl (2000) khi sử dụng thành công các cặp primer khuyếch đại trên vùng large ribosomal subunit (LSU) để nhận biết các loài nấm *Glomus* ssp. trên một số cây trồng nông nghiệp. Và theo nghiên cứu của Jansa và cộng sự (2003) về các chủng nấm cộng sinh trên cây bắp đã sử dụng các cặp primer khuyếch đại trên vùng LSU để xác định các giống *Gigaspora* sp. và *Scutellospora* sp. Vì vậy chúng tôi quyết định chọn các cặp primer LSURK4f/LSURK7r, GIG1/GIG2, VÀ SCUT1/SCUT2 để dùng trong thí nghiệm.

Bảng 3.1 Trình tự nucleotide các cặp primer sử dụng

Primer	Trình tự nucleotide	Nguồn
LSU4f	GGG AGG TAA ATT TCT CCT AAG GC	Kjoller và Rosendahl (2000)
LSU7r	ATC GAA GCT ACA TTC CTC C	
Gig1	GGT ATC ATA GAG GGT GAG AAT CCC	Jansa và cộng sự (2003)
Gig2	AAA TCG ACG CTA ACC TGC CAA ACG	
Scut1	AGG TAT CAT GGA GGG TGA GAA TCC C	
Scut2	CGT ATT AGA GAC CAG GCG GTT AAC C	

3.4.2. Phương pháp thí nghiệm

3.4.2.1. Phương pháp ly trích bào tử

Bào tử được ly trích theo phương pháp của Vielhauer 1992 và có chỉnh sửa.

Lấy 50g đất cho vào cốc có chứa 300 ml nước, khuấy đều, để lắng 30 giây. Dung dich bên trên được cho chảy qua rây có đường kính 40 µm để loại bỏ các hạt nhỏ hơn và giữ bào tử và các hạt lớn lại. Phần lắng trong cốc lại được tiến hành lập lại những thao tác trên vài lần đến khi dung dịch bên trên trong. Bào tử và các hạt lớn giữ lại bên trên rây được cho vào ống ly tâm 50 ml, ly tâm 3200 vòng/phút trong 1 phút. Sau đó bơm dung dịch nước đường xuống dấy ống (nước đường đẩy bào tử lên), ly tâm 3200 vòng/phút trong 30 giây.

Bào tử nấm nằm ở lớp phân cách giữa đường và nước. Dùng pipet rút bào tử cho qua rây dưới vòi nước chảy để rửa nước đường bám bên ngoài bào tử. Thu nhận bào tử dưới kính hiển vi soi nổi. Bào tử được bảo quản ở – 20 ^{0}C.

3.4.2.2. Phương pháp ly trích DNA từ bào tử

Qua tham khảo nhiều phương pháp ly trích DNA từ bào tử của nhiều tác giả khác nhau, và kế thừa kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Minh Kiều chúng tôi đã tiền hành phương pháp ly trích bào tử gồm các bước sau:

Bước 1: Bào tử được ly trích từ đất theo phương pháp của Vielhauer ở bên trên.

Bước 2: Bào tử được cho vào nước cất vô trùng và rửa lại nhiều lần để loại bỏ những chất bẩn bám bên ngoài bào tử.

Bước 3: Tiến hành sốc nhiệt 100 bào tử trong 20 µl nước cất hai lần khử ion. Ủ ở 95 ^{0}C trong 5 phút. Lấy ra ngâm trong nước đá 0 ^{0}C trong 10 phút.

Bước 4: Ly tâm 3000 vòng/phút trong 3 phút.

Bước 5: Hút 3 – 5 ml dịch bên trên để làm DNA mẫu.

Các bước tiến hành phản ứng và đọc kết quả

3.4.2.3. Tiến hành phản ứng PCR

Tiến hành PCR ba chủng nấm *Glomus* ssp., *Gigaspora* sp. và *Scutellospora* sp. với các cặp primer tương ứng với từng chủng nấm như sau: LSURK4f/LSURK7r, GIG1/GIG2, VÀ SCUT1/SCUT2.

Thành phần hóa chất PCR được tiến hành theo bảng sau:

Bảng 3.2 Thành phần hóa chất PCR

Hóa chất	**Nồng độ đầu**	**Thể tích**	**Nồng độ cuối**
PCR buffer	10X	2.5 µl	1X
$MgCl_2$	25µM	1.5 µl	1.5µM
dNTP	25µM	0.2 µl	0.2µM
Primer ngược	10 pmol	2.5 µl	1 µM
Primer xuôi	10 pmol	2.5 µl	1 µM
Taq DNA polymerase	5 U/µl	0.2 µl	0.4 U/µl
DNA mẫu		3 µl	
H_2O thêm vào để thể tích đạt 25 µl			

3.4.2.4. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose

Lấy 0,125 g cho vào bình chứa sẵn 12,5 ml TAE 0.5X (nồng độ gel 1%, thể tích tương ứng với gel 8 giếng (well) nhỏ hoặc 6 giếng lớn).

Cho hỗn hợp vào lò viba đun trong 2 phút.

Đổ gel vào bồn đổ gel đã đặt sẵn lược tạo giếng.

Để gel cứng hoàn toàn, rút lược khỏi gel.

Đặt gel vào bồn điện di.cho TAE 0.5X vào bồn điện di cho ngập gel.

Load hỗn hợp mẫu và loading dye vào giếng (tỉ lệ mẫu:loading dye = 2:1).

Điện di trong 20 phút ở 100 V.

Nhuộn gel trong dung dịch ethidium bromide trong 20 phút.

Rửa gel, chụp gel bằng máy chụp gel.

Đọc kết quả.

Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Thí nghiệm ảnh hưởng của nấm *Glomus* sp. và bốn mức phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 trong nhà lưới

4.1.1. Thời gian sinh trưởng

Thời gian sinh trưởng và phát dục có ý nghĩa trong sản xuất nông nghiệp. Chỉ tiêu này có ý nghĩa trong việc lai tạo, thụ phấn cũng như xác định thời điểm tác động các biện pháp kỹ thuật nhằm đạt năng suất và hiệu quả kinh tế cao.

Bảng 4.1 Thời gian sinh trưởng, phát dục của bắp C919 được chủng nấm và không chủng Glomus sp. ở bốn mức phân lân

Mức lân	Ngày tung phấn (NSG)			Ngày phun râu (NSG)			Ngày chín (NSG)		
	0N	**1N**	**TB**	**0N**	**1N**	**TB**	**0N**	**1N**	**TB**
0P	– – –	56,20	56,20	– – –	59,33	59,33	– – –	– – –	
100P	54,44	53,44	53,94	55,56	55,22	55,39	90,50	89,50	90,05
200P	55,00	54,00	54,50	56,44	54,44	55,44	91,00	89,00	90,21
400P	53,67	53,78	53,72	55,11	55,56	55,33	91,50	90,00	90,68
TB	54,37	53,74		55,70	55,07		91,03	89,48	

Chú thích: – – – : cây chết hoặc không tung phấn, phun râu hoặc không cho trái

TB : Trung bình

Ngày tung phấn: Kết quả ở bảng 4.1 cho thấy, ngoại trừ NT1 (nghiệm thức không bón lân) không tung phấn, thời gian tung phấn của các nghiệm thức biến thiên từ 53,44 – 56,2 NSG. Kết quả phân tích thống kê (phụ lục 7.3.1) cho thấy ngày tung phấn của các nghiệm thức không có sự khác biệt. Như vậy, liều lượng phân lân từ 100 – 400 mg P_2O_5/kg đất cũng như Nấm cộng sinh *Glomus* sp. không ảnh hưởng đến thời gian tung phấn. Có lẽ đây là đặc điểm của giống. Bắp trồng trên đất trên đất cát nghèo dinh dưỡng kèm theo không bón phân lân sẽ làm cây không phát triển đến giai đoạn sinh trưởng, sinh thực (NT1) Nấm cộng sinh *Glomus* sp. giúp cải thiện sự sinh trưởng, sinh thực của bắp (NT2 có tung phấn).

Ngày phun râu: Bảng 4.1 cho thấy ngọai trừ NT1 không phun râu và NT2 thời gian phun râu khà dài (59,33), các NT còn lại có ngày phun râu biến thiên từ

54,44 – 56,44 NSG. Kết quả phân tích thống kê (phụ lục 7.3.2) cho thấy không có sự khác biệt về ngày phun râu của các nghiệm thức. Như vậy, đối với bắp được trồng trên đất có thành phần cơ giới nhẹ và nghèo dinh dưỡng, nếu không bón phân lân, bắp sẽ không phun râu. Tuy nhiên ở các mức phân lân bón cho bắp từ 100 – 400 mg P_2O_5/kg đất cũng như Nấm cộng sinh *Glomus* sp. không ảnh hưởng đến thời gian phun râu của bắp.

Ngày chín biến thiên trong khoảng 89 – 91,5 ngày. các nghiệm thức có chủng nấm có chín sớm hơn một ngày so với các nghiệm thức không chủng nấm.

4.1.2. Đặc điểm thân cây

Đặc điểm thân cây bao gồm chiều cao cây, chiều cao đóng trái, đường kính thân ... thể hiện sự sinh trưởng và phát triển của cây. Thân cây cao, to giúp cây phát triển tốt. Thân to còn tăng khả năng chống đổ ngã cao.

Bảng 4.2 Đặc điểm thân cây của bắp C919 được chủng nấm và không chủng Glomus sp. ở bốn mức phân lân

Mức lân	**Chiều cao cây** (cm)			**Chiều cao đóng trái** (cm)			**Đường kính thân** (cm)		
	0	**1**	**T**	**0**	**1**	**T**	**0**	**1**	**T**
	N	**N**	**B**	**N**	**N**	**B**	**N**	**N**	**B**
0P	58,7	131,00	94,83	– –	– – –		0,26	1,12	0,69
100P	160,70	173,30	167,00	18,20	17,70	17,94	1,16	1,30	1,23
200P	165,70	167,10	166,38	13,30	16,00	14,66	1,24	1,37	1,30
400P	166,10	169,70	167,88	11,60	11,80	11,66	1,34	1,31	1,32
TB	137,78	160,23		12,03	15,14		1,00	1,27	

4.1.2.1. Chiều cao cây

Chiều cao cây phụ thuộc vào đặc tính giống, là một chỉ tiêu để phản ánh khả năng sinh trưởng của cây, cây càng cao thì sinh trưởng càng mạnh. Trong một chừng mực nào đó giống có chiều cao cây cao thì cho năng suất cao. Chiều cao cây còn phụ thuộc vào điều kiện ánh sáng và những yếu tố khác.

Bảng 4.2 và kết quả thống kê (phụ lục 7.3.3) cho thấy chiều cao cây biến động từ 58,70 cm đến 173,30 cm và giữa các nghiệm thức có sự khác biệt về mặt thống kê. Hai nghiệm thức có chiều cao thấp nhất là NT1 (không lân, không nấm) là 58,70 cm và NT2 (không lân, có nấm) là 131 cm. Các nghiệm thức còn lại có chiều cao cây biến thiên từ 160,7 cm đến 173,3 cm nhưng không có sự khác biệt về mặt thống kê.

Nhìn chung sự khác biệt về chiều cao có ý nghĩa về mặt thống kê chỉ thể hiện giữa các nghiệm thức không bón lân (NT1, NT2) và các nghiệm thức có bón lân (NT3, NT4, NT5, NT6, NT7, NT8). Còn giữa các mức độ bón lân hầu như không có sự khác biệt về chiều cao về mặt thống kê. Có lẽ dinh dưỡng lân ít ảnh hưởng đến chiều cao cây. Với một lượng phân bón thấp chiều cao cây đã thể hiện được.

Sự khác biệt về chiều cao có ý nghĩa về mặt thống kê còn biểu hiện giữa các nghiệm thức không chủng nấm (NT1, NT3, NT5, NT7) và các nghiệm thức có chủng nấm (NT2, NT4, NT6, NT8). Cụ thể chiều cao trung bình của các nghiệm thức không chủng nấm là: 137,8 cm còn chiều cao các nghiệm thức chủng nấm là 160,3 cm. Điều này cho thấy Nấm cộng sinh *Glomus* sp. ảnh hưởng đến chiều cao cây. Có lẽ nấm cộng sinh *Glomus* sp. đã kích thích việc hấp thu dinh dưỡng tốt hơn so với các nghiệm thức không chủng nấm.

4.1.2.2. Chiều cao đóng trái

Chiều cao đóng trái là một trong những yếu tố quan trọng của cây bắp bởi vì nó ảnh hưởng đến khả năng chống đổ ngã của cây. Cây có chiều cao đóng trái quá cao thì cây dễ bị đổ ngã. Tuy nhiên nếu chiều cao đóng trái quá thấp thì cũng không tốt vì dễ bị nhiễm sâu bệnh. Chiều cao đóng trái tối ưu khoảng 90 – 110 cm.

Bảng 4.2 cho thấy chiều cao đóng trái biến động trong khoảng 81,20 cm đến 97,70 cm. Không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức có bón phân. Nhưng lại có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các nghiệm thức có chủng nấm (NT2, NT4, NT6, NT8) và nghiệm thức không chủng nấm (NT1, NT3, NT5, NT7). Cụ thể là các nghiệm thức không chủng nấm (NT1, NT3, NT5, NT7) có chiều cao đóng trái 82,03 cm thấp hơn chiều cao đóng trái trung bình của các nghiệm thức có chủng nấm (NT2, NT4, NT6, NT8) 95,15 cm.

4.1.2.3. Đường kính thân

Đường kính thân phụ thuộc vào đặc tính giống, lá yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tỉ lệ đổ ngã và khả năng vận chuyển các chất dinh dưỡng. Đường kính thân càng lớn thì khả năng vận chuyển các chất dinh dưỡng càng tốt và đặc biệt đường kính càng lớn rễ chân kiềng, rễ đốt thân phát triển mạnh tăng khả năng chống đổ ngã.

Bảng 4.2 cho thấy đường kính thân biến động từ 0,27 cm đến 1,37 cm. Qua quá trình phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về đường kính thân giữa các mức phân. Cụ thể ở Các nghiệm thức không bón lân (NT1, NT2) đường kính có sự khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức có bón lân (NT3, NT4, NT5, NT6, NT7, NT8). Giữa các nghiệm thức có bón lân (NT3, NT4, NT5, NT6, NT7, NT8) thì nghiệm thức bón 100 mg P_2O_5/kg đất có sự khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức bón 400 mg P_2O_5/kg đất. Các nghiệm thức không bón lân (NT1, NT2) có đường kính trung bình nhỏ nhất (0,7 cm), nghiệm thức có đường kính trung bình lớn nhất 400 mg P_2O_5/kg đất (1,33 cm).

Đường kính giữa các nghiệm thức có chủng nấm (NT2, NT4, NT6, NT8) và nghiệm thức không chủng nấm (NT1, NT3, NT5, NT7) có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Đường kính trung bình của các nghiệm thức có chủng nấm lớn hơn so với các nghiệm thức không chủng nấm (1,28 so với 1,00).

Có sự tương tác giữa mức phân lân bón cho bắp và nấm cộng sinh *Glomus* sp. (phụ lục 7.3.5) về đường kính thân. Kết quả trắc nghiệm phân hạng cho thấy đường kính thân của các nghiệm thức khác biệt rất có ý nghĩa. Kết quả trắc nghiệm

phân hạng đường kính thân cho kết quả như sau: NT1< NT2 < NT3< NT5 <NT4, NT7, NT8, NT6. Điều đó có nghĩa là đường kính NT4 (100 mg P_2O_5/kg đất, có chủng nấm) tương đương với đường kính các NT bón lân ở các mức 200 mg P_2O_5/kg đất, 400 mg P_2O_5/kg đất có hoặc không có chủng nấm. Thậm chí đường kính của NT4 còn lớn hơn NT5 (200 mg P_2O_5/kg đất, không chủng nấm). Điều này có ý nghĩa trong việc tiết kiệm lượng phân bón trong sản xuất. Như vậy, ở mức phân 100 mg P_2O_5/kg đất kết hợp chủng Nấm cộng sinh *Glomus* sp. thì bắp sẽ đạt số đường kính thân trung bình tương đương với bắp được bón lượng phân lân nhiều gấp hai lần, gấp bốn lần. Điều này có ý nghĩa trong việc tiết kiệm lượng phân bón trong sản xuất.

4.1.3. Đặc điểm lá

Bảng 4.3 Đặc điểm lá của bắp C919 được chủng nấm và không chủng Glomus sp. ở bốn mức phân lân

Mức lân	**Số lá** (lá)			**Diện tích lá** (dm^2)		
	0 N	**1 N**	**TB**	**0 N**	**1 N**	**TB**
0P	15	18	16,53	2,04	21,84	11,94
100 P	18	19	18,55	30,63	35,09	32,85
200 P	19	19	19,22	34,28	36,54	35,40
400 P	18	19	18,55	35,44	36,06	35,74
TB	17,68	18,75		25,59	32,38	

4.1.3.1. Số lá

Lá là bộ phận quan trọng của cây trồng, giữ chức năng quang hợp, sử dụng năng lượng mặt trời tổng hợp các chất hữu cơ từ nguồn vô cơ: CO_2 và H_2O cung cấp cho cây. Đây là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến năng suất.

Kết quả thí nghiệm (bảng 4.3) cho thấy ngoại trừ NT1 (không chủng nấm và không bón phân lân) có số lá trung bình là 15 lá/cây, các NT khác có số lá biến động trong khoảng 18 – 19 lá. Theo Garaxencop, đối với bắp, số lá phụ thuộc vào đặc tính giống, nó hầu như không thay đổi theo điều kiện trồng trọt, thời tiết hàng năm. Giới hạn của sự thay đổi tên không quá 2 lá. Kết quả phân tích thống kê (phụ lục..) cho thấy số lá giữa các mức lân có sự khác biệt có ý nghĩa vế thống kê. Các nghiệm thức không bón lân (NT1, NT2) có sự khác biệt có ý nghĩa về số lá so với các nghiệm thức bón lân (NT3, NT4, NT5, NT6, NT7, NT8): 16,5 lá so với 18,5 lá (mức lân 100 mg P_2O_5/kg đất, và 400 mg P_2O_5/kg đất) và 19,2 lá (mức lân 200 mg P_2O_5/kg đất). Điều này cho thấy dinh dưỡng lân tác động đến sinh trưởng của cây.

Kết quả thống kê cho thấy số lá trung bình ở các nghiệm thức chủng nấm là 18,75 lá (NT2, NT4, NT6, NT8) có sự khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức không chủng nấm là 16,69 lá (NT1, NT3, NT5, NT7). Như vậy, cây được chủng Nấm cộng sinh *Glomus* sp. sẽ nhiều lá hơn cây không được chủng nấm cộng sinh.

Có sự tương tác giữa mức phân lân bón cho bắp và Nấm cộng sinh *Glomus* sp. (phụ lục 7.3.6) về số lá. Kết quả trắc nghiệm phân hạng cho thấy số lá của các nghiệm thức khác biệt rất có ý nghĩa. Có chủng nấm và ở mức phân lân cao (400 mg P_2O_5/kg đất) có số lá trung bình nhiều nhất khác biệt rất có ý nghĩa so với các NT khác. Ở mức bón 100 mg P_2O_5/kg đất và có chủng nấm, số lá không khác biệt so với mức bón 200 mg P_2O_5/kg đất. Như vậy, ở mức phân 100 mg P_2O_5/kg đất kết hợp chủng Nấm cộng sinh *Glomus* sp. thì bắp sẽ đạt số lá trung bình tương đương với bắp được bón lượng phân lân nhiều gấp hai lần. Điều này có ý nghĩa trong việc tiết kiệm lượng phân bón trong sản xuất.

4.1.3.2. Diện tích lá

Diện tích lá là một trong những yếu tố đóng vai trò quan trọng trong quá trình quang hợp, tổng hợp, tích lũy chất hữu cơ để nuôi cây trong suốt quá trình sinh trưởng. Do đó muốn cây bắp có năng suất cao thì phải đảm bảo có diện tích lá lớn và tồn tại trong một thời gian dài làm cơ sở cho quá trình quang hợp mạnh tổng hợp nên chất hữu cơ.

Bảng 4.3 và kết quả phân tích thống kê (phụ lục 7.3.7) cho thấy: Diện tích lá giữa các mức phân có sự khác biệt có ý nghĩa. Diện tích lá nhỏ nhất ở nghiệm thức không bón phân lân. Ngược lại, diện tích lá lớn nhất ở mức lân 400 mg P_2O_5/kg đất. Nghiệm thức có mức lân 200 mg P_2O_5/kg đất không khác biệt với mức lân 100 mg P_2O_5/kg đất và 400 mg P_2O_5/kg đất, nhưng mức lân 400 mg P_2O_5/kg đất và mức lân 100 mg P_2O_5/kg đất lại có sự khác biệt. Như vậy trên đất nghèo dinh dưỡng, phân lân ảnh hưởng rõ rệt đến diện tích lá. Bón phân lân nhiều cây có nhiều lá, kích thước lá lớn và lá chậm lão hóa.

Diện tích lá thể hiện rõ sự khác biệt giữa các nghiệm thức chủng nấm (NT2, NT4, NT6, NT8) và các nghiệm thức không chủng nấm (NT1, NT3, NT5, NT7). Các nghiệm thức không chủng nấm có diện tích lá trung bình là 25,596 dm^2 nhỏ hơn so với diện tích lá trung bình của các nghiệm thức chủng nấm (NT2, NT4, NT6, NT8) 32,38 dm^2. Điều đó thể hiện Nấm cộng sinh *Glomus* sp. tác động tích cực lên yếu tố diện tích lá của cây bắp.

Có sự tương tác có ý nghĩa giữa liều lượng phân lân và nấm cộng sinh. Kết quả trắc nghiệm phân hạng (phụ lục 7.3.7) cho thấy: NT4 (100 mg P_2O_5/kg đất và có chủng nấm) có diện tích lá trung bình không khác biệt về mặt thống kê so với các nghiệm thức 5,6 7 và 8 (các nghiệm thức có mức lân cao hơn). Như vậy, nếu bón 100 mg P_2O_5/kg đất và có chủng nấm sẽ giúp cây đạt diện tích lá tương đương với mức phân lân 200, 400 mg P_2O_5/kg đất có cũng như không chủng nấm. điều này cho thấy Nấm cộng sinh *Glomus* sp. có tác động đến khả năng hấp thu lân của cây bắp. Nó có ý nghĩa trong việc tiết kiệm lượng phân bón trong sản xuất.

4.1.4. Trọng lượng chất khô

Bảng 4.4 trọng lượng chất khô của bắp C919 được chủng nấm và không chủng Glomus sp. ở bốn mức phân lân

Mức lân	Trọng lượng chất khô thân lá (g)			Trọng lượng chất khô rễ (g)		
	0N	1N	TB	0N	1N	TB
0P	3,87	27,63	15,75	0,70	5,94	3,31
100P	31,20	33,37	32,28	9,75	6,60	8,15
200P	31,80	32,43	32,11	10,07	11,57	10,81
400P	32,63	34,87	33,75	8,50	9,70	9,10
TB	24,87	32,07		7,24	8,450	

4.1.4.1. Trọng lượng thân lá

Trọng lượng thân lá, là yếu tố quan trọng biểu hiện sự sinh trưởng của cây, và khả năng tích lũy chất hữu cơ. Trọng lượng thân lá chịu sự ảnh hưởng của các yếu tố chiều cao cây, số lá, diện tích lá.

Kết quả thí nghiệm (bảng 4.4) cho thấy ngoại trừ NT1 (không chủng nấm và không bón phân lân) và NT2 (có chủng nấm và không bón phân lân) có trọng lượng thân lá 3,87 g và 27,63 g trọng lượng thân lá biến động trong khoảng 31,20 – 34,87g. Kết quả thống kê (phụ lục 3.7.8) thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức không bón lân (NT1, NT2) và các các nghiệm thức bón lân (NT3, NT4, NT5, NT6, NT7, NT8). Nhưng lại không có sự khác biệt giữa các các nghiệm thức bón lân (NT3, NT4, NT5, NT6, NT7, NT8).

Trọng lượng thân lá thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các nghiệm thức chủng nấm *Glomus* sp. và không chủng nấm *Glomus* sp.. Các nghiệm thức không chủng nấm có trọng lượng trung bình 24,87 g so với 32,08 g của các nghiệm thức chủng nấm. Nấm cộng sinh *Glomus* sp. đã tác động đến sự sinh trưởng và khả năng tích lũy chất khô của cây.

Có sự tương tác giữa các nghiệm thức trong thí nghiệm chỉ có NT1 thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức khác. NT2 (không lân, chủng nấm) không có sự khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức 3,5,7,8 (nghiệm thức có mức lân cao hơn, không chủng nấm *glomus* sp.). NT4 không có sự khác biệt với các nghiệm thức 5,6,7,8 (nghiệm thức có mức lân cao hơn, có hoặc không chủng nấm

glomus sp.). Điều này cho thấy nấm *Glomus* đã tác động làm tăng khả năng hấp thu lân của bắp. Nó có ý nghĩa trọng việc tiết kiệm phân lân trong sản xuất.

4.1.4.2. Trọng lượng rễ

Trọng lượng rễ là yếu tố quyết định khả năng hút chất dinh dưỡng từ đất của cây, ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây, và nó còn lá yếu tố quyết khả năng chống đổ ngã của cây.

Bảng 4.4 cho thấy trọng lượng rễ biến động trong khoảng 0,7 – 11,57 g. Thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các mức lân. Cụ thể mức lân 0 mg P_2O_5/kg đất khác biệt có ý nghĩa với các mức lân khác. Mức lân 200 mg P_2O_5/kg đất đạt trọng lượng rễ cao nhất, nhưng không khác biệt về mặt thống kê so với mức lân 400 mg P_2O_5/kg đất. có lẽ mức lân 200 mg P_2O_5/kg đất là mức lân phù hợp nhất cho sự phát triển của bộ rễ.

Kết quả thống kê (phụ lục 7.3.9) cho thấy trọng lượng của các các nghiệm thức chủng nấm *Glomus* sp. là 8,45 g lớn hơn so với trọng lượng 7,24 g của các nghiệm thức không chủng nấm *Glomus* sp. nhưng không có sự khác biệt về mặt thống kê. NT2 có trọng lượng rễ là 5,94 g lớn hơn rất nhiều lần so với trọng lượng rễ của NT1 (0,7 g). Điều đó cho thấy nấm cộng sinh *Glomus* sp. đã tác động đến sự sinh trưởng và phát triển của bộ rễ làm cho chúng phát triển mạnh hơn nhưng có lẽ do sự biến động khá lớn của các nghiệm thức nên đã không có sự khác biệt về mặt thống kê.

Có sự tương tác giữa các nghiệm thức trong thí nghiệm chỉ có trọng lượng NT1 thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức khác. NT2 (không lân, chủng nấm) không có sự khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức 3,5,7 (nghiệm thức có mức lân cao hơn, không chủng nấm *glomus* sp.). NT4 không có sự khác biệt với các nghiệm thức 5,6,7,8 (nghiệm thức có mức lân cao hơn, có hoặc không chủng nấm *glomus* sp.). Điều này cho thấy nấm *Glomus* đã tác động đến khả năng hấp thu lân của bắp. Nó có ý nghĩa trọng việc tiết kiệm phân lân trong sản xuất.

4.1.5. Đặc điểm trái

Bảng 4.5: đặc điểm trái của bắp C919 được chủng nấm và không chủng Glomus sp. ở bốn mức phân lân

Mức lân	Chiều kết hạt (cm)			Số hàng/trái			Số hạt/hàng		
	0N	1N	TB	0N	1N	TB	0N	1N	TB
0P	– – –	– – –	– – –	– – –	– – –	– – –	– – –	– – –	– – –
100P	10,77	9,93	10,35	11,78	12,44	12,11	20,39	20,67	20,52
200P	13,72	9,84	11,78	11,89	12,22	12,05	20,33	20,78	20,55
400P	10,64	10,00	10,31	12,11	12,44	12,27	21,67	21,11	21,38
TB	11,71	9,92		11,92	12,37		20,79	20,85	

4.1.5.1. Chiều dài kết hạt

Chiều dài kết hạt quyết định năng suất bắp, chiều dài kết hạt thấp sẽ cho năng suất thấp.

Bảng 4.5 và kết quả thống kê (phụ lục 7.3.10) cho thấy chiều dài kết hạt biến động trong khoảng 9,84 – 13,72 cm. Nhưng không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức, giữa các mức lân, giữa các nghiệm thức chủng nấm *Glomus* sp. và các nghiệm thức không chủng nấm về cả hai yếu tố trên.

Trong điều kiện thí nghiệm có các mức phân lân 100 – 400 mg P_2O_5/kg đất cũng như nấm cộng sinh *Glomus* sp. không ảnh hưởng đến chiều dài kết hạt. Có lẽ bắp được trồng trên đất có thành phần cơ giới nhẹ và nghèo dinh dưỡng không có đủ dinh dưỡng nên khả năng kết hạt của bắp chỉ đạt ở mức thấp không đủ để tạo ra sự khác biệt.

4.1.5.2. Số hàng và số hạt

Số hàng và số hạt phụ thuộc vào đặc tính giống những, là những yếu tố quyết định năng suất bắp.

Bảng 4.5 và kết quả thống kê (phụ lục 7.3.10; 7.3.11) số hàng dao động trong khoảng 11,78 – 12,44 hàng và số hạt dao động trong khoảng 20,33 – 21,67 hầu như không có sự biến động, không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức, giữa các mức lân, giữa các nghiệm thức chủng nấm và các nghiệm thức không chủng nấm về cả hai yếu tố trên.

Có lẽ cây trồng trong nhà lưới điều kiện giúp cho sự thụ phấn khá đồng nhất, và cũng như yếu tố chiều dài kết hạt, bắp được trồng trên đất có thành phần cơ giới nhẹ và nghèo dinh dưỡng không có đủ dinh dưỡng nên khả năng kết hạt của bắp chỉ đạt ở mức thấp không đủ để tạo ra sự khác biệt. Và cũng có thể đây là những yếu tố do giống quyết định nên lân và nấm tác động không đáng kể.

4.1.6. Các yếu tố cầu thành năng suất

Bảng 4.6 các yếu tố cấu thành năng suất của bắp C919 được chủng nấm và không chủng Glomus sp. ở bốn mức phân lân

Mức lân	Tỉ lệ hạt/trái (%)			Trọng lượng hạt trên trái (g)			Trọng lượng 100 hạt (g)			năng suất lý thuyết (tấn/ha)		
	0N	1N	TB	0N	1N	TB	0N	1N	TB	0N	1N	TB
0P	– – –	– – –		– – –	– – –		– – –	– – –		– – –	– – –	
100P	65,20	65,69	65,47	49,16	51,17	50,16	25,54	23,42	24,48	2,80	2,92	2,87
200P	64,20	70,03	67,51	52,25	56,71	54,48	27,22	24,68	25,95	2,98	3,23	3,08
400P	72,48	63,46	67,89	56,69	55,01	55,84	26,09	25,47	25,77	3,23	3,14	3,17
TB	67,35	66,68		52,69	54,29		26,28	24,52		3,06	3,13	

Năng suất là yếu tố quan trọng nhất để đánh giá tác động của các mức độ phân bón, và các biện pháp kĩ thuật. Mục đích cuối cùng của các qui trình kỹ thuật là năng suất, vì năng suất là cơ sở để đánh giá sự tác động của các biện pháp kỹ thuật và sự thích nghi của cây trồng đối với điều kiện tự nhiên, đất đai của từng vùng. Năng suất được cấu thành bởi nhiều yếu tố như: số hàng trên trái, số hạt trên hàng, trọng lượng hạt, tỉ lệ hạt trên trái, trọng lượng 100 hạt ...

Bảng 4.6 cho thấy tỉ lệ hạt/trái biến động trong khoảng 65,2 % – 72,48%. Không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức, giữa các mức lân, giữa các nghiệm thức chủng nấm và các nghiệm thức không chủng nấm về cả hai yếu tố trên.

Bảng 4.6 và kết quả thống kê (phụ lục 7.3.14) cho thấy trọng lượng trung bình 100 hạt biến động trong khoảng 23,42 – 27,22 g. Cũng không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức, giữa các mức lân, giữa các nghiệm thức chủng nấm và các nghiệm thức không chủng nấm về cả hai yếu tố trên.

Bảng 4.6 và kết quả thống kê (phụ lục 7.3.13) cho thấy trọng lượng hạt trung bình của các nghiệm thức biến động trong khoảng 49,16 – 56,69 g. Cũng không có

sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức, giữa các mức lân, giữa các nghiệm thức chủng nấm và các nghiệm thức không chủng nấm về cả hai yếu tố trên.

Có lẽ cũng như các yếu tố số hàng trên trái, số hạt trên hàng, chiều dài sinh học và chiều dài kết hạt. Các yếu tố trọng lượng hạt trung bình, tỉ lệ hạt/trái, trọng lượng trung bình 100 hạt không có sự khác biệt Có lẽ cây trồng trong nhà lưới điều kiện giúp cho sự thụ phấn khá đồng nhất, và cũng như yếu tố chiều dài kết hạt, bắp được trồng trên đất có thành phần cơ giới nhẹ và nghèo dinh dưỡng không có đủ dinh dưỡng nên khả năng kết hạt của bắp chỉ đạt ở mức thấp không đủ để tạo ra sự khác biệt. Và cũng do hàm lượng các yếu tố vi lượng trong đất cát kém ảnh hưởng đến chất lượng hạt phấn, chất lượng noãn, số lượng hạt phấn nên dẫn đến các yếu tố năng suất bị tác động, không thể hiện rõ những tác động của lân và nấm.

Yếu tố trọng lượng hạt trên trái chịu tác động của các yếu tố số hàng , số hạt, chiều dài kết hạt, tỉ lệ hạt, trọng lượng 100 hạt. Nhưng các yếu tố này không có sự khác biệt nên trọng lượng hạt trên trái không có sự khác biệt.

NXLT biến động trong khoảng 2,80 – 3,23 tấn/ha năng suất lý thuyết cũng không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các yếu tố thí nghiệm. khá thấp so với năng suất của cả nước.

Như vậy, đối với bắp được trồng trên đất có thành phần cơ giới nhẹ và nghèo dinh dưỡng, nếu không bón phân lân, bắp sẽ không cho năng suất (NT1 và NT2).

4.1.7. Khả năng cộng sinh

Bảng 4.7 khả năng cộng sinh của nấm *Glomus* sp. Trên bắp C919 ở bốn mức phân lân.

Mức lân	**0P**	**100P**	**200P**	**400P**
Tỉ lệ cộng sinh (%)	26,25	39,72	37,72	37,47
Mật độ túi (túi/dm rễ)	25,29	22,67	17,24	9,93
Mật độ bụi (bụi/dm rễ)	0	0,17	0,58	2,22
Mật độ sợi (sợi/dm rễ)	1,38	1,53	3,91	3,10

Bảng 4.7 cho thấy tỉ lệ cộng sinh biến động trong khoảng 26,25 đến 39,72% ở những nghiệm thức chủng nấm, mật độ bụi biến động trong khoảng 0 – 22,2

bụi/dm, mật độ sợi biến động trong khoảng 1,38 – 3,91 sợi/dm, nhưng không có sự khác biệt về mặt thống kê (phụ lục 7.3.15). Mật độ túi biến động trong khoảng 9,93 – 25,29 túi/dm chỉ có sự khác biệt có ý nghĩa NT2 và NT8. Điều đó chứng tỏ mức lân không tác động đến khả năng cộng sinh của nấm *Glomus*

4.2. Thí nghiệm PCR phát hiện trên ba giống: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp.

4.2.1. Ly trích DNA từ bào tử.

Việc thu nhận bào tử từ môi trường gặp nhiều khó khăn như: nguồn bào tử phải được lấy từ nhiều nơi, lượng bào tử có trong mẫu đất rất ít (mật số bào tử < 10 bào tử/ 400g đất), thao tác tách từng bào tử đơn dưới kính hiển vi mất rất nhiều thời gian. Nên lượng bào tử thu được không nhiều.

Ly trích DNA theo quy trình trên mục 3.4.2.2. Vì ly trích DNA từ bào tử nên lượng DNA thu được rất ít nhỏ hơn 10 pg và lượng tạp lại rất lớn (dịch bào tử lớn hơn nhiều lần so với lượng DNA bào tử). Lượng mẫu bào tử rất ít nên không thể kiểm tra lượng DNA bằng các phương pháp thông thường như điện di, đo OD và nếu đủ lượng dịch ly trích cho việc đo OD hoặc điện di thì kết quả đo OD, điện bị sai lệch do lượng tạp rất lớn. Nên chúng tôi đã trực tiếp lấy dịch ly trích để tiến hành PCR.

4.2.2. Phản ứng PCR

4.2.2.1. Khảo sát chu trình nhiệt

Chúng tôi tiến hành khảo sát một số chu trình nhiệt để tìm ra chu trình nhiệt thích hợp cho phản ứng PCR của từng cặp primer. Chúng tôi đã tiến hành một số chu trình nhiệt sau.

Bảng 4.8 Các chu trình nhiệt được khảo sát

Gig1/Gig2	Scut1/Scut2	LSU4Ff/LSU7r
CK1:95 ^{0}C – 5 phút CK2:94 ^{0}C – 1 phút CK3:56 ^{0}C – 1 phút CK4:72 ^{0}C – 1 phút CK5:72 ^{0}C – 5 phút CK2 – CK4 lập lại 35CK	CK1:95 ^{0}C – 5 phút CK2:94 ^{0}C – 1 phút CK3:56 ^{0}C – 1 phút CK4:72 ^{0}C – 1 phút CK5:72 ^{0}C – 5 phút CK2 – CK4 lập lại 35CK	CK1:95 ^{0}C – 5 phút CK2:94 ^{0}C – 1 phút CK3:52 ^{0}C – 1 phút CK4:72 ^{0}C – 1 phút CK5:72 ^{0}C – 5 phút CK2 – CK4 lập lại 35CK
CK1:95 ^{0}C – 5 phút CK2:94 ^{0}C – 1 phút CK3:54 ^{0}C – 1 phút CK4:72 ^{0}C – 1 phút CK5:72 ^{0}C – 5 phút CK2 – CK4 lập lại 35CK	CK1:95 ^{0}C – 5 phút CK2:94 ^{0}C – 1 phút CK3:54 ^{0}C – 1 phút CK4:72 ^{0}C – 1 phút CK5:72 ^{0}C – 5 phút CK2 – CK4 lập lại 35CK	CK1:95 ^{0}C – 5 phút CK2:94 ^{0}C – 1 phút CK3:54 ^{0}C – 1 phút CK4:72 ^{0}C – 1 phút CK5:72 ^{0}C – 5 phút

	CK2 – CK4 lập lại 35CK
	CK1:95 ^{0}C – 5 phút CK2:94 ^{0}C – 1 phút CK3:56 ^{0}C – 1 phút CK4:72 ^{0}C – 1 phút CK5:72 ^{0}C – 5 phút CK2 – CK4 lập lại 35CK

Kết quả điện di trên agarose cho thấy, tất cả các qui trình chúng tôi đều không thu nhận được sản phẩm PCR. Có lẽ kết quả PCR không có sản phẩm vì nồng độ hóa chất PCR không thích hợp,lượng DNA có trong mẫu rất ít, hoặc không có (đối với DNA li trích từ rễ), các tạp chất có trong DNA mẫu đã ức chế phản ứng PCR. Do đó, chúng tôi tiến hành các thử nghiệm tiếp theo sử dụng chu trình nhiệt thứ 1 (chu trình nhiệt tốt nhất về mặt lý thuyết).

4.2.2.2. Khảo sát nồng độ $MgCl_2$

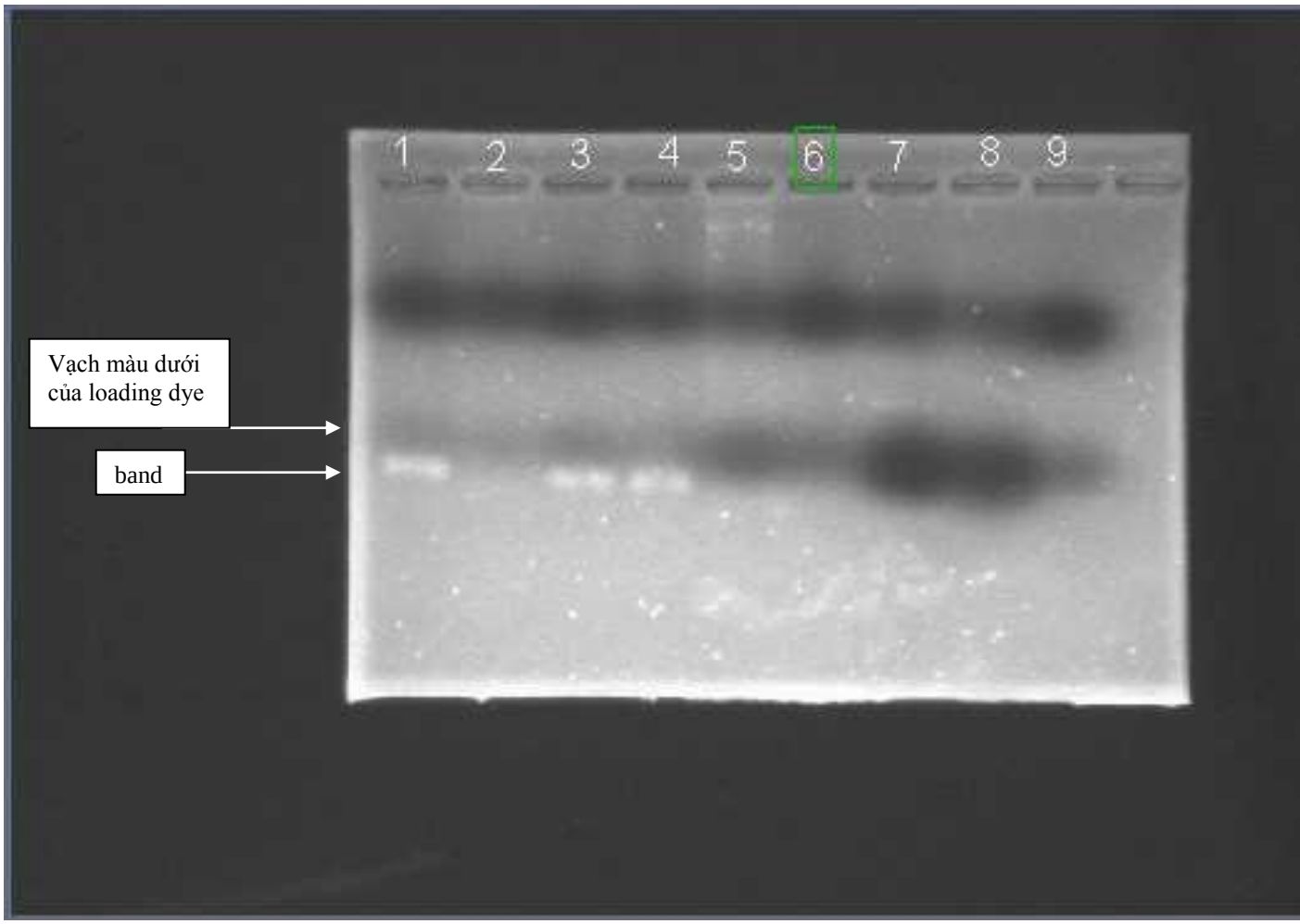
Nồng độ $MgCl_2$ cũng là một nhân tố ảnh hưởng mạnh đến phản ứng PCR. Nồng độ Mg^{2+} thấp sẽ làm hạn chế quá trình kéo dài. Ngược lại nồng độ Mg^{2+} cao sẽ giúp ổn định dây đôi DNA và ngăn ngừa sự biến tính hoàn toàn (do sự mở dây đôi DNA) của sản phẩm trong mỗi chu kỳ, làm cho sản phẩm PCR ít đi; đồng thời, có thể làm cho hiện tượng bắt cặp giả xảy ra ổn định hơn và cho ra những sản phẩm mong muốn với số lượng quá lớn nhưng mức độ chuyên biệt thấp. Nên chúng tôi quyết định tiến hành khảo sát tìm nồng độ Mg^{2+} thích hợp cho phản ứng. Chúng tôi khảo sát với ba nồng độ Mg^{2+} là 1,5µM, 2,5µM, 1µM.

Kết quả PCR vẫn không cho sản phẩm. Chúng tôi tiến hành khảo sát thành phần khác của phản ứng PCR là Primer với nồng độ Mg^{2+} là 1,5µM.

4.2.2.3. Khảo sát nồng độ primer

Nồng độ DNA ảnh hưởng đến tỉ lệ tối ưu giữa primer DNA mẫu. Nếu tỉ lệ này quá cao, hiện tượng primer – dimer sẽ xuất hiện, giống như trường hợp DNA mẫu quá loãng. Nếu tỉ lệ này quá nhỏ, kết quả sản phẩm PCR sẽ không nhiều.

Chúng tôi khảo sát 3 nồng độ primer là 10 pmol, 20 pmol, 5 pmol. Kết quả vẫn không có sản phẩm PCR. Chúng tôi cho rằng có lẽ sản phẩm PCR quá ít để đọc thấy trên gel nên chúng tôi tiến hành PCR lập một lần nữa các sản phẩm PCR với nồng độ và thành phần như lần trước. Và kết quả diện di cho thấy band nhưng kích thước band nhỏ hơn 100 bp. Có lẽ là do hiện tượng primer – dimer.



Hình 4.1 Sản phẩm PCR lần hai

4.2.2.4. Khảo sát nồng độ lượng dịch ly trích

Chúng tôi đã tiến hành PCR với lượng dịch DNA ly trích được với các thể tích 3, 5, 10 và 15 µl dịch ly trích. Kết quả PCR vẫn không cho sản phẩm. Có lẽ với thể tích nhỏ dịch ly trích không đủ lượng DNA mẫu cho phản ứng PCR, hoặc lượng tạp lớn đã ức chế phản ứng PCR

Vì lượng DNA mẫu, hóa chất (Taq polmerase), và thời gian có hạn nên chúng tôi đã không thể tiếp tục tiến hành thí nghiệm mà phải ngừng thí nghiệm tại đây. Việc tiến hành PCR không tạo ra kết quả là có thể do một số nguyên nhân như:

- DNA ly trích từ bào tử có rất ít trong dịch ly trích không đủ cho phản ứng.
- Lượng tạp chất chứa trong dịch ly trích quá nhiều nên ức chế phản ứng PCR.
- Nồng độ hóa chất không thích hợp.
- Chu trình nhiệt không tương thích.
- Taq polmerase không hiệu quả.
- Hoặc do sự tác động tổng hợp của các yếu tố trên.

Chương 5
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Thí nghiệm ảnh hưởng của nấm Glomus sp. và bốn mức phân lân đến sinh trưởng, phát triển của bắp C919 trong nhà lưới

5.1.1. Kết luận

5.1.1.1. Hiệu quả của phân lân

Lân có tác động đến sự sinh trưởng của bắp. Không có lân cây sinh trưởng kém: chiều cao cây thấp, chiều cao đóng trái thấp, diện tích lá nhỏ, cây không tung phấn, phun râu. Giữa các bón mức lân không có sự khác biệt.

Lân cũng tác động đến năng suất của bắp. Không lân cây không cho trái hoặc trái không hạt. Nhưng không có sự khác biệt về năng suất giữa các mức bón lân.

5.1.1.2. Hiệu quả của nấm

Nấm có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng của bắp. Không nấm trong môi trường đất cát, cây sinh trưởng rất yếu chiều cao cây thấp, diện tích lá nhỏ, lá chậm lão hóa. Có nấm cây sinh trưởng tốt hơn.

Nấm không ảnh hưởng đến năng xuất của bắp.

5.1.1.3. Sự tương tác của nấm Glmus sp. và lân

Giữa nấm cộng sinh Glomus sp. và phân lân có sự tương tác. Khi bón phân lân ở mức 100 mg P_2O_5/kg đất kết hợp với chủng nấm cộng sinh *Glomus* sp. thì cây sinh trưởng và phát triển tương đương với sự sinh trưởng và phát triển của cây được bón mức lân cao hơn có chủng hoặc không chủng nấm *Glomus* sp.. điều này có ý nghĩa trong việc giảm lượng phân lân bón cho cây trong sản xuất.

Khả năng cộng sinh của nấm không ảnh hưởng bởi mức lân.

5.1.2. Kiến nghị:

Phân tích hàm lượng lân, kali, đạm trông đất sau thí nghiệm. để đánh giá được lượng phân mà cây hấp thu.

Phân tích hàm lượng các khoáng chất và yếu tố vi lượng để đánh giá chính xác nguyên nhân tác động đến kết quả thí nghiệm.

5.2. Thí nghiệm PCR chỉ phát hiện trên ba giống: *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., *Scutellospora* sp.

5.2.1. Kết luận

Phản ứng PCR tiến hành không cho kết quả. Việc tiến hành PCR không tạo ra kết quả là có thể do một số nguyên nhân như:

- DNA nấm ly trích từ rễ không có hoặc rất ít, DNA lẫn nhiều DNA của thực vật.
- DNA ly trích từ bào tử có rất ít trong dịch ly trích không đủ cho phản ứng, lượng tạp chất chứa trong dịch ly trích quá nhiều nên ức chế phản ứng PCR.
- Nồng độ hóa chất không thích hợp.
- Chu trình nhiệt không tương thích.
- Taq polmerase không hiệu quả.
- Thao tác trong quá trình mix PCR không tốt, đặc biệt là thao tác hút DNA ly trích từ bào tử. Và một số yếu tố khác.

5.2.2. Kiến nghị:

Tiến hành tiếp tục các phản ứng PCR. Khảo sát lại nồng độ các hóa chất PCR, các chu trình nhiệt. Khảo sát lượng bào tử tối cho ly trích và lượng dịch tối cần cho phản ứng PCR.

Chương 6
TÀI KIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Nguyễn Thị Tú Anh, 2006. Ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật canh tác bắp mật độ nấm cộng sinh Mycorrhiza trên rễ bắp. Luận văn tốt nghiệp Kỹ sư Nông học, Trường Đại Học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh, Việt Nam.

2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2005. 575 giống cây trồng nông nghiệp mới. NXB Nông Nghiệp Hà Nội

3. Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999. *Di truyền phân tử: Những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng*. NXB Nông Nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.

4. Hồ Huỳnh Thùy Dương. 2000. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia

5. Phạm Thị Minh Kiều, 2004. *Phát hiện nấm cộng sinh glomus spp. Bằng kỹ thuật PCR và ảnh hưởng của nấm lên cây bắp (Zea may L.)*. Luận văn tốt nghiệp Kỹ sư Nông học, Trường Đại Học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh, Việt Nam.

6. Nguyễn Ngọc Kiểng, 2000. *Thực hành các kiểu mẫu thí nghiệm trên phần mềm Statgraphics*. Đại Học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

7. Nguyễn Ngọc Kiểng, 1996. *Thống kê học trong nghiên cứu khoa học*. Nhà xuất bản Giáo Dục

8. Hoàng Thị Liễu – 2004 – *Phân tích mức độ đa dạng di truyền và xây dựng phương pháp nhận diện một số giống cacao trên cơ sở kỹ thật PCR*. Luận văn tốt nghiệp Kỹ sư Nông học, Trường Đại Học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh, Việt Nam, 63 trang.

9. Nguyễn Đức Lượng, 2001, *Công nghệ sinh học*, NXB Đại học Quốc Gia, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.

10. Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2002. *Công nghệ gen.* NXB Đại học Quốc Gia, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.

11. Trần Văn Mão, 2004. sử dụng vi sinh vật có ích tập hai. NXB Nông nghiệp, Hà Nội, Việt Nam.

12. Lê Thị Hồng Phượng, 2005. *Nghiên cứu ảnh hưởng của các mức phân lân đến sinh trưởng, năng suất của giống bắp G49 và sợ tồn lưu dinh dưỡng trên vùng đất xám bạc màu TP.HCM và tỉnh tây ninh vụ thu đông năm 2004.* Luận văn tốt nghiệp Kỹ sư Nông học, Trường Đại Học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh, Việt Nam.

13. Khuất Hữu Thanh, 2003. *Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen*. NXB Khoa Học và Kỹ Thuật, Hà Nội, Việt Nam.

14. Lê Duy Thành, 2000. *Cơ sở di truyền chọn giống thực vật*. NXB Khoa Học và Kỹ Thuật, Hà Nội, Việt Nam.

15. Trần Thị Dạ Thảo, 2006. *Bài giảng cây màu.* Đại Học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

16. Tiêu chuẩn ngành, 10 TCN, 1998. *Quy phạm khảo nghiệm giống bắp.* Hà Nội

TIẾNG NƯỚC NGOÀI

17. Boberg J và Dyberg A, 2002. *The efect fertilister gerimeson mycorrhizal colonisation of mangosteen growing on an acid sulphate soil in southern Vietnam.* Minor field studies no194 for MSc thesis, Swedish uniersity of agricultural Science.

18. Harley J.L. và Smith S.E., 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, U.K.

19. Jansa J., Mozafar A., G. Kuhn, T. Anken, R. Ruh,I. R. Sanders, and E. Frossard, 2003. *Soil tillage affects the community structure ofmycorrhizal fungi in maize roots*. University of Lausanne, Switzerland

20. Jakobsen I., Abbott L.K. và Robson A.D., 1992 External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with Trifolium subterraneum L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist*, Vol. 120, p. 509-516

21. Kwork S., Higuchi R., 1989. Avoiding false positive with PCR. *Nature* vol. 339, p. 237 – 238.

22. R.Kjoller and S.Rosendahl, 2000. *Detection of arbuscular mycorhyzal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (single stranded conformation Polymorphism).* university of california, USA.

23. S. Ram Reddy, Pavan K.Pindi and S. M. Reddy, 2005. *Molecular methods for research on Arbuscular Mycorrhizal fungi in India: problems and prospects.* Kakatiya University, India.

24. Smith S.E. và Gianinazzi – Pearson V., 1990. *Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal Allium cepa L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition.*The Centre for Plant Root Symbioses, U.S.A

25. Smith S.E., 1985. Discoveries, discussions and directions in research on mycorrhizae. In *Mycorrhiza: Function, Molecular Biology and Biotechnology.*The Centre for Plant Root Symbioses, U.S.A

26. Sylvia D.M., Williams S.E., 1992. Vesicualr arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: *Mycorrhiza in Sustainable Agriculture.* (eds. G. T. Bethlenfalvay and R. D. Linderman), USA.

27. Shannon Peters, Julie Etra và Karen Wright, 2003.Tall Whitetop Eradication and Native Plant Community Restoration. *Proceedings California Invasive Plant Council Symposium* Vol.7: p.33-39

Web:

28. http://sokhoahoccn.angiang.gov.vn/xemnoidung.asp?maidtt = 3391
29. http://www.bucherlab.ethz.ch/research/mycorrhiza/mycorrhiza.html
30. http://www.dongnai.gov.vn/thong_tin_KTXH/nong_nghiep/mlnews.2006 – 08 – 24.1003713196
31. http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

Chương 7

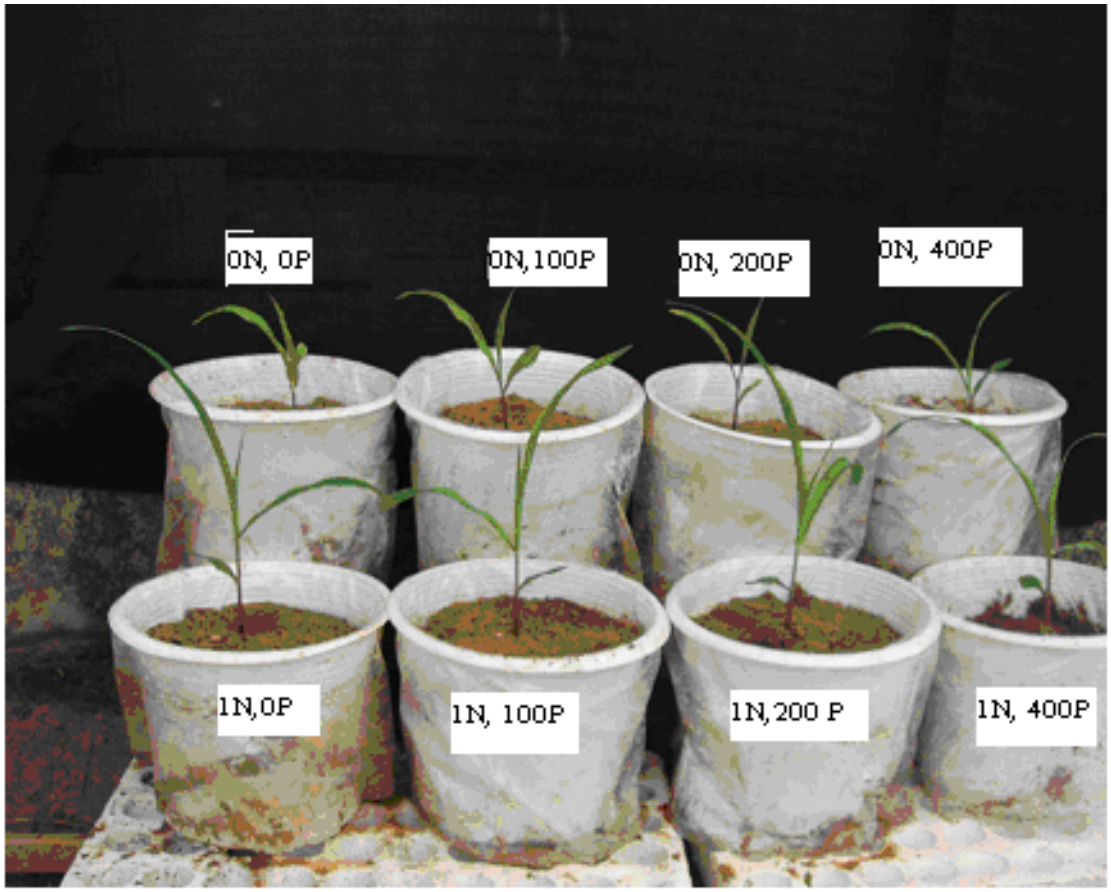
PHỤ LỤC

Phụ lục 1

Trang thiết bị thí nghiệm PCR

- Chén sứ và chày giã
- Eppendorf 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml
- Đầu típ các loại
- Pipet các loại
- Cân phân tích 4 số
- Máy hút và tủ cấy vô trùng
- Máy ly tâm lạnh
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy chụp ảnh DNA
- Lò Viba.
- Máy định ôn.
- Tủ lạnh các loại.

Phụ lục 2



Hình 7.1 các nghiệm thức ở 10 NSG

Hình 7.2 Bộ rễ của các nghiệm thức

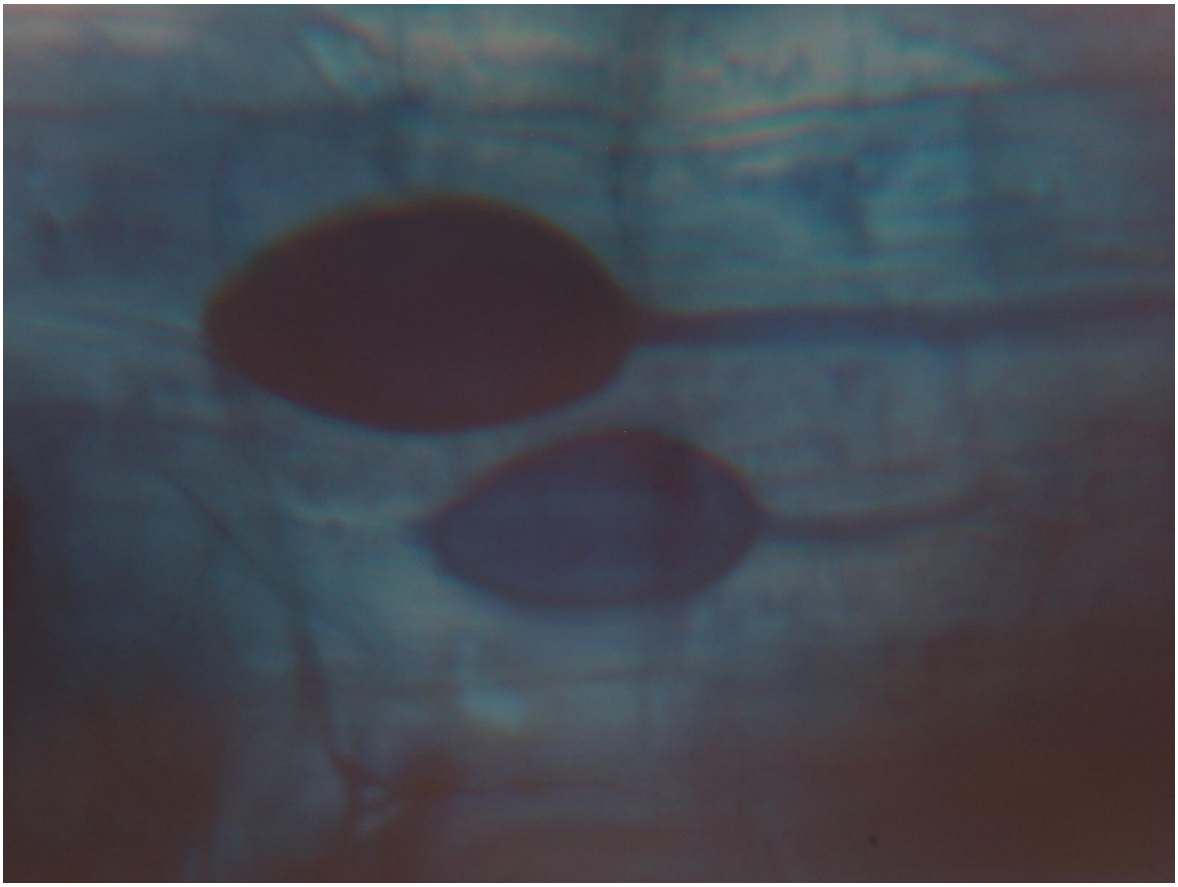
Hàng trên từ trái qua : NT7, NT5, NT3, NT1.

Hàng dưới từ trái qua: NT8, NT6, NT4, NT2

Hình 7.3 Trái của các nghiệm thức

Hàng trên từ trái qua : NT7, NT5, NT3.

Hàng dưới từ trái qua: NT8, NT6, NT4.



Hình 7.4 Hình cộng sinh nấm *Glomus* sp. (túi)

Phụ lục 3

7.3.1. Thời gian tung phấn

Analysis of Variance for TB18.tungphan - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB18.lanlaplai	4.7777778	2	2.3888889	1.693	.2327
B:TB18.mp	1.9259259	2	.9629630	.682	.5275
C:TB18.nam	1.7839506	1	1.7839506	1.264	.2871
INTERACTIONS					
BC	1.2345679	2	.6172840	.437	.6575
RESIDUAL	14.111111	10	1.4111111		
TOTAL (CORRECTED)	23.833333	17			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB18.tungphan

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	18	54.055556	.2799912	53.431530	54.679581
A:TB18.lanlaplai					
1	6	53.611111	.4849590	52.530267	54.691955
2	6	53.777778	.4849590	52.696934	54.858622
3	6	54.777778	.4849590	53.696934	55.858622
B:TB18.mp					
100	6	53.944444	.4849590	52.863600	55.025289
200	6	54.500000	.4849590	53.419156	55.580844
400	6	53.722222	.4849590	52.641378	54.803066
C:TB18.nam					
0	9	54.370370	.3959673	53.487865	55.252876
1	9	53.740741	.3959673	52.858235	54.623246
BC					
100 0	3	54.444444	.6858355	52.915900	55.972989
100 1	3	53.444444	.6858355	51.915900	54.972989
200 0	3	55.000000	.6858355	53.471456	56.528544
200 1	3	54.000000	.6858355	52.471456	55.528544
400 0	3	53.666667	.6858355	52.138122	55.195211
400 1	3	53.777778	.6858355	52.249233	55.306322

Multiple range analysis for TB18.tungphan by TB18.mp

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
400	6	53.722222	X
100	6	53.944444	X
200	6	54.500000	X

contrast	difference	limits
100 - 200	-0.55556	1.52854
100 - 400	0.22222	1.52854
200 - 400	0.77778	1.52854

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB18.tungphan by TB18.nam

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	9	53.740741	X

0	9	54.370370	X

contrast	difference	limits
0 - 1	0.62963	1.24805

* denotes a statistically significant difference.

7.3.2. thời gian phun râu

Analysis of Variance for TB18.phunrau - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB18.lanlaplai	3.8148148	2	1.9074074	1.036	.3900
B:TB18.mp	.0370370	2	.0185185	.010	.9900
C:TB18.nam	1.7839506	1	1.7839506	.969	.3584
INTERACTIONS					
BC	4.6790123	2	2.3395062	1.271	.3222
RESIDUAL	18.407407	10	1.8407407		
TOTAL (CORRECTED)	28.722222	17			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB18.phunrau

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	18	55.388889	.3197865	54.676170	56.101608
A:TB18.lanlaplai					
1	6	55.277778	.5538864	54.043313	56.512243
2	6	54.888889	.5538864	53.654424	56.123354
3	6	56.000000	.5538864	54.765535	57.234465
B:TB18.mp					
100	6	55.388889	.5538864	54.154424	56.623354
200	6	55.444444	.5538864	54.209980	56.678909
400	6	55.333333	.5538864	54.098868	56.567798
C:TB18.nam					
0	9	55.703704	.4522463	54.695767	56.711640
1	9	55.074074	.4522463	54.066138	56.082010
BC					
100 0	3	55.555556	.7833136	53.809759	57.301353
100 1	3	55.222222	.7833136	53.476425	56.968019
200 0	3	56.444444	.7833136	54.698647	58.190241
200 1	3	54.444444	.7833136	52.698647	56.190241
400 0	3	55.111111	.7833136	53.365314	56.856908
400 1	3	55.555556	.7833136	53.809759	57.301353

Multiple range analysis for TB18.phunrau by TB18.mp

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
400	6	55.333333	X
100	6	55.388889	X
200	6	55.444444	X

contrast	difference	limits
100 - 200	-0.05556	1.74580
100 - 400	0.05556	1.74580
200 - 400	0.11111	1.74580

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB18.phunrau by TB18.nam

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	9	55.074074	X
0	9	55.703704	X

contrast	difference	limits
0 - 1	0.62963	1.42544

* denotes a statistically significant difference.

7.3.3. Chiều cao cây

Analysis of Variance for TB24.hcay - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB24.lanlaplai	185.787	2	92.8937	1.401	.2812
B:TB24.mp	19354.598	3	6451.5327	97.300	.0000
C:TB24.nam	2834.500	1	2834.5000	42.749	.0000
INTERACTIONS					
BC	4195.9685	3	1398.6562	21.094	.0000
RESIDUAL	861.97189	13	66.305530		
TOTAL (CORRECTED)	24204.589	22			

1 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB24.hcay

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	23	149.02877	1.7204849	145.31094	152.74660
A:TB24.lanlaplai					
1	8	152.25000	2.8789219	146.02888	158.47112
2	7	149.37798	3.1724174	142.52264	156.23332
3	8	145.45833	2.8789219	139.23721	151.67945
B:TB24.mp					
0	5	94.83730	3.7693936	86.69194	102.98266
100	6	167.00000	3.3242927	159.81647	174.18353
200	6	166.38889	3.3242927	159.20536	173.57242
400	6	167.88889	3.3242927	160.70536	175.07242
C:TB24.nam					
0	11	137.77976	2.5129290	132.34952	143.21000
1	12	160.27778	2.3506299	155.19826	165.35730
BC					
0 0	2	58.67460	5.8933410	45.93957	71.40964
0 1	3	131.00000	4.7012598	120.84096	141.15904
100 0	3	160.66667	4.7012598	150.50762	170.82571
100 1	3	173.33333	4.7012598	163.17429	183.49238
200 0	3	165.66667	4.7012598	155.50762	175.82571
200 1	3	167.11111	4.7012598	156.95207	177.27016
400 0	3	166.11111	4.7012598	155.95207	176.27016
400 1	3	169.66667	4.7012598	159.50762	179.82571

Multiple range analysis for TB24.hcay by TB24.lanlaplai

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
3	8	145.45833	X
2	7	149.37798	X
1	8	152.25000	X

contrast	difference	limits
1 - 2	2.87202	9.25732
1 - 3	6.79167	8.79799
2 - 3	3.91964	9.25732

```
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB24.hcay by TB24.mp

```
-----------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-----------------------------------------------------------------
   0         5      94.83730   X
 200         6     166.38889    X
 100         6     167.00000    X
 400         6     167.88889    X
-----------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
0   - 100                             -72.1627       10.8605 *
0   - 200                             -71.5516       10.8605 *
0   - 400                             -73.0516       10.8605 *
100 - 200                              0.61111       10.1590
100 - 400                             -0.88889       10.1590
200 - 400                             -1.50000       10.1590
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB24.hcay by TB24.nam

```
-------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------------------------------
 0          11     137.77976   X
 1          12     160.27778    X
-------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
0 - 1                                 -22.4980       7.43566 *
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB24.hcay by TB24.nt

```
-------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------------------------------
 1           2      58.50000   X
 2           3     131.00000    X
 3           3     160.66667     X
 5           3     165.66667     X
 7           3     166.11111     X
 6           3     167.11111     X
 8           3     169.66667     X
 4           3     173.33333     X
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

7.3.4. Chiều cao đóng trái

Analysis of Variance for TB18.htrai - Type III Sums of Squares

```
-------------------------------------------------------------------------------
Source of variation   Sum of Squares   d.f.   Mean square    F-ratio  Sig. level
-------------------------------------------------------------------------------
MAIN EFFECTS
  A:TB18.lanlaplai          242.56790      2     121.28395      3.248     .0819
  B:TB18.mp                  33.53086      2      16.76543       .449     .6506
  C:TB18.nam                773.55556      1     773.55556     20.715     .0011
INTERACTIONS
  BC                       29.481481      2     14.740741       .395     .6839

RESIDUAL                   373.43210     10     37.343210
-------------------------------------------------------------------------------
TOTAL (CORRECTED)          1452.5679     17
-------------------------------------------------------------------------------
0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.
```

Multiple range analysis for TB18.htrai by TB18.mp

Method: 95 Percent LSD			
Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
400	6	86.666667	X
100	6	89.444444	X
200	6	89.666667	X

contrast	difference	limits
100 - 200	-0.22222	7.86327
100 - 400	2.77778	7.86327
200 - 400	3.00000	7.86327

Multiple range analysis for TB18.htrai by TB18.mp

Method: 95 Percent LSD			
Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
400	6	86.666667	X
100	6	89.444444	X
200	6	89.666667	X

contrast	difference	limits
100 - 200	-0.22222	7.86327
100 - 400	2.77778	7.86327
200 - 400	3.00000	7.86327

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB18.htrai by TB18.nam

Method: 95 Percent LSD			
Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	9	82.037037	X
1	9	95.148148	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-13.1111	6.42033 *

* denotes a statistically significant difference.

7.3.5. Đường kính thân

Analysis of Variance for TB24.dkinh - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB24.lanlaplai	.0384060	2	.0192030	4.139	.0407
B:TB24.mp	1.3278294	3	.4426098	95.390	.0000
C:TB24.nam	.4171458	1	.4171458	89.902	.0000
INTERACTIONS					
BC	.5926806	3	.1975602	42.578	.0000
RESIDUAL	.0603202	13	.0046400		
TOTAL (CORRECTED)	2.0006445	22			

1 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB24.dkinh

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	23	1.1391901	.0143925	1.1080891	1.1702911

```
A:TB24.lanlaplai
 1                        8     1.1199751     .0240832    1.0679332    1.1720170
 2                        7     1.1012768     .0265384    1.0439294    1.1586242
 3                        8     1.1963183     .0240832    1.1442764    1.2483602
B:TB24.mp
   0                      5      .6952953     .0315323     .6271564     .7634341
 100                      6     1.2314225     .0278089    1.1713297    1.2915153
 200                      6     1.3030786     .0278089    1.2429857    1.3631714
 400                      6     1.3269639     .0278089    1.2668711    1.3870567
C:TB24.nam
 0                       11     1.0027255     .0210216     .9572996    1.0481514
 1                       12     1.2756546     .0196639    1.2331626    1.3181467
BC
0    0                    2      .2653252     .0492999     .1587920     .3718584
0    1                    3     1.1252654     .0393277    1.0402813    1.2102495
100  0                    3     1.1641897     .0393277    1.0792056    1.2491738
100  1                    3     1.2986553     .0393277    1.2136713    1.3836394
200  0                    3     1.2402689     .0393277    1.1552848    1.3252530
200  1                    3     1.3658882     .0393277    1.2809041    1.4508723
400  0                    3     1.3411182     .0393277    1.2561341    1.4261023
400  1                    3     1.3128096     .0393277    1.2278255    1.3977937
-------------------------------------------------------
```

Multiple range analysis for TB24.dkinh by TB24.lanlaplai

```
-------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------
 2           7     1.1012768   X
 1           8     1.1199751   X
 3           8     1.1963183    X
-------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
1 - 2                                  0.01870      0.07744
1 - 3                                 -0.07634      0.07360 *
2 - 3                                 -0.09504      0.07744 *
-------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB24.dkinh by TB24.nam

```
-------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------
 0          11     1.0027255   X
 1          12     1.2756546    X
-------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
0 - 1                                 -0.27293      0.06220 *
-------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB24.dkinh by TB24.mp

```
-------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------
   0         5      .6952953   X
 100         6     1.2314225    X
 200         6     1.3030786    XX
 400         6     1.3269639     X
-------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
0   - 100                             -0.53613      0.09085 *
0   - 200                             -0.60778      0.09085 *
0   - 400                             -0.63167      0.09085 *
100 - 200                             -0.07166      0.08498
100 - 400                             -0.09554      0.08498 *
200 - 400                             -0.02389      0.08498
-------------------------------------------------------
* denotes a statistically significant difference.
```

7.3.6 số lá

Analysis of Variance for TB24.so_la - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB24.lanlaplai	.070106	2	.0350529	.510	.6118
B:TB24.mp	20.340803	3	6.7802677	98.721	.0000
C:TB24.nam	6.333686	1	6.3336861	92.218	.0000
INTERACTIONS					
BC	7.1708683	3	2.3902894	34.803	.0000
RESIDUAL	.8928571	13	.0686813		
TOTAL (CORRECTED)	29.314010	22			

1 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB24.so_la

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	23	18.218254	.0553726	18.098598	18.337910
A:TB24.lanlaplai					
1	8	18.208333	.0926562	18.008111	18.408556
2	7	18.154762	.1021021	17.934127	18.375396
3	8	18.291667	.0926562	18.091444	18.491889
B:TB24.mp					
0	5	16.539683	.1213154	16.277530	16.801835
100	6	18.555556	.1069901	18.324358	18.786753
200	6	19.222222	.1069901	18.991025	19.453419
400	6	18.555556	.1069901	18.324358	18.786753
C:TB24.nam					
0	11	17.686508	.0808769	17.511739	17.861276
1	12	18.750000	.0756534	18.586519	18.913481
BC					
0 0	2	14.968254	.1896732	14.558385	15.378123
0 1	3	18.111111	.1513069	17.784149	18.438073
100 0	3	18.444444	.1513069	18.117482	18.771406
100 1	3	18.666667	.1513069	18.339705	18.993629
200 0	3	19.000000	.1513069	18.673038	19.326962
200 1	3	19.444444	.1513069	19.117482	19.771406
400 0	3	18.333333	.1513069	18.006371	18.660295
400 1	3	18.777778	.1513069	18.450816	19.104740

Multiple range analysis for TB24.so_la by TB24.mp

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	5	16.539683	X
100	6	18.555556	X
400	6	18.555556	X
200	6	19.222222	X

contrast	difference	limits	
0 - 100	-2.01587	0.34954	*
0 - 200	-2.68254	0.34954	*
0 - 400	-2.01587	0.34954	*
100 - 200	-0.66667	0.32696	*
100 - 400	0.00000	0.32696	
200 - 400	0.66667	0.32696	*

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB24.so_la by TB24.lanlaplai

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
2	7	18.154762	X
1	8	18.208333	X
3	8	18.291667	X

contrast	difference	limits
1 - 2	0.05357	0.29794
1 - 3	-0.08333	0.28316
2 - 3	-0.13690	0.29794

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB24.so_la by TB24.nam

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	11	17.686508	X
1	12	18.750000	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-1.06349	0.23931 *

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB24.sola by TB24.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	2	15.000000	X
2	3	18.111111	X
7	3	18.333333	XX
3	3	18.444444	XXX
4	3	18.666667	XXX
8	3	18.777778	XX
5	3	19.000000	X
6	3	19.444444	X

* denotes a statistically significant difference.

7.3.7. Diện tích lá

Analysis of Variance for TB24.dtich - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB24.lanlaplai	15.2979	2	7.64897	1.519	.2553
B:TB24.mp	1944.8225	3	648.27415	128.761	.0000
C:TB24.nam	257.7711	1	257.77109	51.199	.0000
INTERACTIONS					
BC	289.81809	3	96.606031	19.188	.0000
RESIDUAL	65.451317	13	5.0347167		
TOTAL (CORRECTED)	2341.4180	22			

1 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB24.dtich

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	23	28.988678	.4740930	27.964202	30.013155
A:TB24.lanlaplai					
1	8	29.476125	.7933093	27.761847	31.190403
2	7	29.649890	.8741842	27.760848	31.538931
3	8	27.840021	.7933093	26.125743	29.554298

```
B:TB24.mp
   0                       5     11.940003    1.0386856     9.695487    14.184519
 100                       6     32.859400     .9160346    30.879923    34.838877
 200                       6     35.407400     .9160346    33.427923    37.386877
 400                       6     35.747911     .9160346    33.768434    37.727388
C:TB24.nam
 0                        11     25.596388     .6924571    24.100043    27.092732
 1                        12     32.380969     .6477343    30.981268    33.780671
BC
0    0                    2      2.043739    1.6239558    -1.465499     5.552977
0    1                    3     21.836267    1.2954686    19.036863    24.635670
100  0                    3     30.629356    1.2954686    27.829952    33.428759
100  1                    3     35.089444    1.2954686    32.290041    37.888848
200  0                    3     34.275578    1.2954686    31.476174    37.074981
200  1                    3     36.539222    1.2954686    33.739819    39.338626
400  0                    3     35.436878    1.2954686    32.637474    38.236281
400  1                    3     36.058944    1.2954686    33.259541    38.858348
--------------------------------------------------------------------------------
```

Multiple range analysis for TB24.dtich by TB24.nam

```
--------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
--------------------------------------------------------------------------------
 0          11     25.596388   X
 1          12     32.380969    X
--------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
0 - 1                                 -6.78458       2.04895 *
--------------------------------------------------------------------------------
             * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB24.dtich by TB24.mp

```
--------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
--------------------------------------------------------------------------------
   0         5     11.940003   X
 100         6     32.859400    X
 200         6     35.407400    XX
 400         6     35.747911     X
--------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
0   - 100                             -20.9194       2.99269 *
0   - 200                             -23.4674       2.99269 *
0   - 400                             -23.8079       2.99269 *
100 - 200                             -2.54800       2.79940
100 - 400                             -2.88851       2.79940 *
200 - 400                             -0.34051       2.79940
--------------------------------------------------------------------------------
             * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB24.dtich by TB24.lanlaplai

```
--------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
--------------------------------------------------------------------------------
 3           8     27.840021   X
 1           8     29.476125   X
 2           7     29.649890   X
--------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
1 - 2                                 -0.17376       2.55093
1 - 3                                  1.63610       2.42435
2 - 3                                  1.80987       2.55093
--------------------------------------------------------------------------------
             * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB24.dtich by TB24.nt

```
--------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
```

1	2	1.713133	X
2	3	21.836267	X
3	3	30.629356	X
5	3	34.275578	XX
4	3	35.089444	X
7	3	35.436878	X
8	3	36.058944	X
6	3	36.539222	X

* denotes a statistically significant difference.

7.3.8 trọng lượng thân

Analysis of Variance for TB24.m_than - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB24.lanlaplai	1.8525	2	.92625	.079	.9249
B:TB24.mp	1305.0983	3	435.03278	36.888	.0000
C:TB24.nam	311.0400	1	311.04000	26.374	.0002
INTERACTIONS					
BC	551.36667	3	183.78889	15.584	.0001
RESIDUAL	165.10750	14	11.793393		
TOTAL (CORRECTED)	2334.4650	23			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error

Table of Least Squares Means for TB24.m_than

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	24	28.475000	.7009931	26.971140	29.978860
A:TB24.lanlaplai					
1	8	28.837500	1.2141557	26.232738	31.442262
2	8	28.162500	1.2141557	25.557738	30.767262
3	8	28.425000	1.2141557	25.820238	31.029762
B:TB24.mp					
0	6	15.750000	1.4019863	12.742280	18.757720
100	6	32.283333	1.4019863	29.275613	35.291054
200	6	32.116667	1.4019863	29.108946	35.124387
400	6	33.750000	1.4019863	30.742280	36.757720
C:TB24.nam					
0	12	24.875000	.9913540	22.748221	27.001779
1	12	32.075000	.9913540	29.948221	34.201779
BC					
0 0	3	3.866667	1.9827080	-.386892	8.120226
0 1	3	27.633333	1.9827080	23.379774	31.886892
100 0	3	31.200000	1.9827080	26.946441	35.453559
100 1	3	33.366667	1.9827080	29.113108	37.620226
200 0	3	31.800000	1.9827080	27.546441	36.053559
200 1	3	32.433333	1.9827080	28.179774	36.686892
400 0	3	32.633333	1.9827080	28.379774	36.886892
400 1	3	34.866667	1.9827080	30.613108	39.120226

Multiple range analysis for TB24.m_than by TB24.mp

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	6	15.750000	X
200	6	32.116667	X
100	6	32.283333	X
400	6	33.750000	X

contrast	difference	limits

0	- 100	-16.5333	4.25356 *
0	- 200	-16.3667	4.25356 *
0	- 400	-18.0000	4.25356 *
100	- 200	0.16667	4.25356
100	- 400	-1.46667	4.25356
200	- 400	-1.63333	4.25356

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB24.m_than by TB24.nam

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	12	24.875000	X
1	12	32.075000	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-7.20000	3.00772 *

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB24.m_than by TB24.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	3	3.866667	X
2	3	27.633333	X
3	3	31.200000	XX
5	3	31.800000	XX
6	3	32.433333	XX
7	3	32.633333	XX
4	3	33.366667	X
8	3	34.866667	X

* denotes a statistically significant difference.

7.3.9 Trọng lượng rễ

Analysis of Variance for T.m_re - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:T.lanlaplai	19.20583	2	9.602917	2.188	.1489
B:T.mp	186.02792	3	62.009306	14.131	.0002
C:T.re	8.76042	1	8.760417	1.996	.1795
INTERACTIONS					
BC	52.271250	3	17.423750	3.971	.0306
RESIDUAL	61.434167	14	4.3881548		
TOTAL (CORRECTED)	327.69958	23			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for T.m_re

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	24	7.845833	.4275977	6.9284961	8.763171
A:T.lanlaplai					
1	8	7.362500	.7406209	5.7736252	8.951375
2	8	7.075000	.7406209	5.4861252	8.663875
3	8	9.100000	.7406209	7.5111252	10.688875
B:T.mp					
0	6	3.316667	.8551954	1.4819921	5.151341
100	6	8.150000	.8551954	6.3153254	9.984675
200	6	10.816667	.8551954	8.9819921	12.651341

400	6	9.100000	.8551954	7.2653254	10.934675
C:T.re					
0	12	7.241667	.6047144	5.9443559	8.538977
1	12	8.450000	.6047144	7.1526892	9.747311
BC					
0 0	3	.700000	1.2094289	-1.8946216	3.294622
0 1	3	5.933333	1.2094289	3.3387117	8.527955
100 0	3	9.700000	1.2094289	7.1053784	12.294622
100 1	3	6.600000	1.2094289	4.0053784	9.194622
200 0	3	10.066667	1.2094289	7.4720450	12.661288
200 1	3	11.566667	1.2094289	8.9720450	14.161288
400 0	3	8.500000	1.2094289	5.9053784	11.094622
400 1	3	9.700000	1.2094289	7.1053784	12.294622

Multiple range analysis for T.m_re by T.mp

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	6	3.316667	X
100	6	8.150000	X
400	6	9.100000	XX
200	6	10.816667	X

contrast	difference	limits
0 - 100	-4.83333	2.59462 *
0 - 200	-7.50000	2.59462 *
0 - 400	-5.78333	2.59462 *
100 - 200	-2.66667	2.59462 *
100 - 400	-0.95000	2.59462
200 - 400	1.71667	2.59462

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for T.m_re by T.re

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	12	7.2416667	X
1	12	8.4500000	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-1.20833	1.83467

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for T.m_re by T.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	3	.700000	X
2	3	5.933333	X
4	3	6.600000	XX
7	3	8.500000	XXX
3	3	9.700000	XXX
8	3	9.700000	XXX
5	3	10.066667	XX
6	3	11.566667	X

7.3.10 chiều dài kết hạt

Analysis of Variance for TB18.lkh - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB18.lanlaplai	8.622346	2	4.311173	.595	.5698
B:TB18.mp	8.381142	2	4.190571	.579	.5784

C:TB18.nam	14.340988	1	14.340988	1.980	.1897
INTERACTIONS					
BC	9.8826235	2	4.9413117	.682	.5275
RESIDUAL	72.425062	10	7.2425062		
TOTAL (CORRECTED)	113.65216	17			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB18.lkh

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	18	10.818519	.6516269	9.0086706	12.628366
A:TB18.lanlaplai					
1	6	10.016667	1.1286509	6.8819180	13.151415
2	6	10.733333	1.1286509	7.5985847	13.868082
3	6	11.705556	1.1286509	8.5708069	14.840304
B:TB18.mp					
100	6	10.352778	1.1286509	7.2180292	13.487526
200	6	11.783333	1.1286509	8.6485847	14.918082
400	6	10.319444	1.1286509	7.1846958	13.454193
C:TB18.nam					
0	9	11.711111	.9215396	9.1515996	14.270623
1	9	9.925926	.9215396	7.3664144	12.485437
100 0	3	10.772222	1.5961534	6.3390182	15.205426
100 1	3	9.933333	1.5961534	5.5001293	14.366537
200 0	3	13.722222	1.5961534	9.2890182	18.155426
200 1	3	9.844444	1.5961534	5.4112404	14.277648
400 0	3	10.638889	1.5961534	6.2056849	15.072093
400 1	3	10.000000	1.5961534	5.5667960	14.433204

Multiple range analysis for TB18.lkh by TB18.mp

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
400	6	10.319444	X
100	6	10.352778	X
200	6	11.783333	X

contrast	difference	limits
100 - 200	-1.43056	3.46292
100 - 400	0.03333	3.46292
200 - 400	1.46389	3.46292

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB18.lkh by TB18.nam

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	9	9.925926	X
0	9	11.711111	X

contrast	difference	limits
0 - 1	1.78519	2.82746

* denotes a statistically significant difference.

7.3.11 số hàng trên trái

Analysis of Variance for TB18.hang - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					

```
  A:TB18.lanlaplai         2.4197531      2     1.2098765      2.579     .1250
  B:TB18.mp                 .1604938      2      .0802469       .171     .8452
  C:TB18.nam                .8888889      1      .8888889      1.895     .1987
INTERACTIONS
  BC                        .1111111      2      .0555556       .118     .8895

RESIDUAL                   4.6913580     10      .4691358
------------------------------------------------------------------------------
TOTAL (CORRECTED)          8.2716049     17
------------------------------------------------------------------------------
0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.
```

Table of Least Squares Means for TB18.hang

```
------------------------------------------------------------------------------
                                                          95% Confidence
Level                 Count       Average  Stnd. Error          for mean
------------------------------------------------------------------------------
GRAND MEAN               18     12.148148     .2245251    11.524545    12.771751
A:TB18.lanlaplai
 1                        6     11.666667     .3888889    10.586555    12.746778
 2                        6     12.222222     .3888889    11.142111    13.302334
 3                        6     12.555556     .3888889    11.475444    13.635667
B:TB18.mp
 100                      6     12.111111     .3888889    11.031000    13.191223
 200                      6     12.055556     .3888889    10.975444    13.135667
 400                      6     12.277778     .3888889    11.197666    13.357889
C:TB18.nam
 0                        9     11.925926     .3175264    11.044019    12.807833
 1                        9     12.370370     .3175264    11.488463    13.252278
BC
100  0                    3     11.777778     .5499719    10.250269    13.305286
100  1                    3     12.444444     .5499719    10.916936    13.971953
200  0                    3     11.888889     .5499719    10.361380    13.416397
200  1                    3     12.222222     .5499719    10.694714    13.749731
400  0                    3     12.111111     .5499719    10.583603    13.638620
400  1                    3     12.444444     .5499719    10.916936    13.971953
------------------------------------------------------------------------------
```

Multiple range analysis for TB18.hang by TB18.mp

```
------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
------------------------------------------------------------------------------
 200         6     12.055556   X
 100         6     12.111111   X
 400         6     12.277778   X
------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
100 - 200                              0.05556       0.88135
100 - 400                             -0.16667       0.88135
200 - 400                             -0.22222       0.88135
------------------------------------------------------------------------------
             * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB18.hang by TB18.nam

```
------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
------------------------------------------------------------------------------
 0           9     11.925926   X
 1           9     12.370370   X
------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
0 - 1                                 -0.44444       0.71962
------------------------------------------------------------------------------
             * denotes a statistically significant difference.
```

7.3.12 số hạt trên hàng

Analysis of Variance for TB18.hat - Type III Sums of Squares

```
------------------------------------------------------------------------------
```

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB18.lanlaplai	4.5771605	2	2.2885802	.576	.5795
B:TB18.mp	2.8734568	2	1.4367284	.362	.7051
C:TB18.nam	.0138889	1	.0138889	.003	.9546
INTERACTIONS					
BC	.8611111	2	.4305556	.108	.8983
RESIDUAL	39.700617	10	3.9700617		
TOTAL (CORRECTED)	48.026235	17			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB18.hat

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	18	20.824074	.4386192	19.605840	22.042308
A:TB18.lanlaplai					
1	6	21.194444	.7597108	19.084401	23.304488
2	6	21.166667	.7597108	19.056623	23.276710
3	6	20.111111	.7597108	18.001068	22.221154
B:TB18.mp					
100	6	20.527778	.7597108	18.417734	22.637821
200	6	20.555556	.7597108	18.445512	22.665599
400	6	21.388889	.7597108	19.278846	23.498932
C:TB18.nam					
0	9	20.796296	.6203013	19.073453	22.519139
1	9	20.851852	.6203013	19.129009	22.574695
BC					
100 0	3	20.388889	1.0743933	17.404837	23.372941
100 1	3	20.666667	1.0743933	17.682615	23.650719
200 0	3	20.333333	1.0743933	17.349281	23.317385
200 1	3	20.777778	1.0743933	17.793726	23.761830
400 0	3	21.666667	1.0743933	18.682615	24.650719
400 1	3	21.111111	1.0743933	18.127059	24.095163

Multiple range analysis for TB18.hat by TB18.mp

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
100	6	20.527778	X
200	6	20.555556	X
400	6	21.388889	X

contrast	difference	limits
100 - 200	-0.02778	2.56387
100 - 400	-0.86111	2.56387
200 - 400	-0.83333	2.56387

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB18.hat by TB18.nam

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	9	20.796296	X
1	9	20.851852	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-0.05556	2.09339

* denotes a statistically significant difference.

7.3.13 trọng lượng hạt trên trái

Analysis of Variance for TB18.m_hat - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:TB18.lanlaplai	14.90442	2	7.452209	.350	.7130
B:TB18.mp	105.67742	2	52.838711	2.481	.1334
C:TB18.nam	11.48447	1	11.484472	.539	.4873
INTERACTIONS					
BC	28.673306	2	14.336653	.673	.5318
RESIDUAL	212.96620	10	21.296620		
TOTAL (CORRECTED)	373.70582	17			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for TB18.m_hat

Level	Count	Average	Stnd. Error	95% Confidence for mean	
GRAND MEAN	18	53.497531	1.0877249	51.073282	55.921779
A:TB18.lanlaplai					
1	6	52.211111	1.8839949	48.012189	56.410033
2	6	54.111111	1.8839949	49.912189	58.310033
3	6	54.170370	1.8839949	49.971449	58.369292
B:TB18.mp					
100	6	50.162963	1.8839949	45.964041	54.361885
200	6	54.481481	1.8839949	50.282560	58.680403
400	6	55.848148	1.8839949	51.649226	60.047070
C:TB18.nam					
0	9	52.698765	1.5382754	49.270360	56.127171
1	9	54.296296	1.5382754	50.867891	57.724702
BC					
100 0	3	49.155556	2.6643711	43.217384	55.093728
100 1	3	51.170370	2.6643711	45.232198	57.108542
200 0	3	52.251852	2.6643711	46.313680	58.190024
200 1	3	56.711111	2.6643711	50.772939	62.649283
400 0	3	56.688889	2.6643711	50.750717	62.627061
400 1	3	55.007407	2.6643711	49.069235	60.945579

Multiple range analysis for TB18.m_hat by TB18.mp

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
100	6	50.162963	X
200	6	54.481481	X
400	6	55.848148	X

contrast	difference	limits
100 - 200	-4.31852	5.93817
100 - 400	-5.68519	5.93817
200 - 400	-1.36667	5.93817

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for TB18.m_hat by TB18.nam

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	9	52.698765	X
1	9	54.296296	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-1.59753	4.84850

```
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

7.3.14 trọng lượng 100 hạt

Analysis of Variance for TB18.m_100hat - Type III Sums of Squares

```
-------------------------------------------------------------------------------
Source of variation   Sum of Squares   d.f.   Mean square    F-ratio  Sig. level
-------------------------------------------------------------------------------
MAIN EFFECTS
  A:TB18.lanlaplai          1.474733      2       .737366       .126     .8832
  B:TB18.mp                 7.745350      2      3.872675       .660     .5378
  C:TB18.nam               13.947023      1     13.947023      2.378     .1540
INTERACTIONS
  BC                      3.0489438      2     1.5244719       .260     .7761

RESIDUAL                  58.638519     10     5.8638519
-------------------------------------------------------------------------------
TOTAL (CORRECTED)         84.854568     17
-------------------------------------------------------------------------------
0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.
```

Table of Least Squares Means for TB18.m_100hat

```
-------------------------------------------------------------------------------
                                                          95% Confidence
Level                 Count       Average  Stnd. Error        for mean
-------------------------------------------------------------------------------
GRAND MEAN               18     25.403704     .5707623    24.131627    26.675780
A:TB18.lanlaplai
 1                        6     25.718519     .9885892    23.515217    27.921820
 2                        6     25.025926     .9885892    22.822624    27.229227
 3                        6     25.466667     .9885892    23.263365    27.669968
B:TB18.mp
 100                      6     24.481481     .9885892    22.278180    26.684783
 200                      6     25.951852     .9885892    23.748550    28.155153
 400                      6     25.777778     .9885892    23.574476    27.981079
C:TB18.nam
 0                        9     26.283951     .8071797    24.484962    28.082939
 1                        9     24.523457     .8071797    22.724469    26.322445
BC
100  0                    3     25.540741    1.3980763    22.424802    28.656680
100  1                    3     23.422222    1.3980763    20.306283    26.538161
200  0                    3     27.222222    1.3980763    24.106283    30.338161
200  1                    3     24.681481    1.3980763    21.565543    27.797420
400  0                    3     26.088889    1.3980763    22.972950    29.204828
400  1                    3     25.466667    1.3980763    22.350728    28.582606
-------------------------------------------------------------------------------
```

Multiple range analysis for TB18.m_100hat by TB18.mp

```
-------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------------------------------
 100         6     24.481481   X
 400         6     25.777778   X
 200         6     25.951852   X
-------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
100 - 200                             -1.47037       3.11594
100 - 400                             -1.29630       3.11594
200 - 400                              0.17407       3.11594
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for TB18.m_100hat by TB18.nam

```
-------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------------------------------
 1           9     24.523457   X
 0           9     26.283951   X
```

```
-------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
0 - 1                                  1.76049       2.54415
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

7.3.15 khả năng cộng sinh

Multiple range analysis for BOOK.gdiem by BOOK.ngt

```
-------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------------------------------
 2           4     26.250000   X
 8           5     37.466667   X
 6           3     37.722222   X
 4           3     39.722222   X
-------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
2 - 4                                 -13.4722       14.9139
2 - 6                                 -11.4722       14.9139
2 - 8                                 -11.2167       13.0991
4 - 6                                  2.00000       15.9437
4 - 8                                  2.25556       14.2605
6 - 8                                  0.25556       14.2605
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for BOOK.mdd_tui by BOOK.ngt

```
-------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------------------------------
 8           5      9.926667   X
 6           3     17.236111   XX
 4           3     22.666667   XX
 2           4     25.291667    X
-------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
2 - 4                                  2.62500       15.6519
2 - 6                                  8.05556       15.6519
2 - 8                                  15.3650       13.7472 *
4 - 6                                  5.43056       16.7325
4 - 8                                  12.7400       14.9660
6 - 8                                  7.30944       14.9660
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for BOOK.md_bui by BOOK.ngt

```
-------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
-------------------------------------------------------------------------------
 2           4      .0000000   X
 4           3      .1666667   X
 6           3      .5833333   X
 8           5     2.2200000   X
-------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
2 - 4                                 -0.16667       2.80340
2 - 6                                 -0.58333       2.80340
2 - 8                                 -2.22000       2.46226
4 - 6                                 -0.41667       2.99696
4 - 8                                 -2.05333       2.68057
6 - 8                                 -1.63667       2.68057
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```

Multiple range analysis for BOOK.md_soi by BOOK.ngt

```
-------------------------------------------------------------------------------
Method: 95 Percent LSD
Level    Count       LS Mean   Homogeneous Groups
```

```
-------------------------------------------------------------------------------
 2           4     1.3750000   X
 4           3     1.5277778   X
 8           5     3.1000000   X
 6           3     3.9111111   X
-------------------------------------------------------------------------------
contrast                            difference     limits
2 - 4                                 -0.15278       4.57801
2 - 6                                 -2.53611       4.57801
2 - 8                                 -1.72500       4.02092
4 - 6                                 -2.38333       4.89410
4 - 8                                 -1.57222       4.37742
6 - 8                                  0.81111       4.37742
-------------------------------------------------------------------------------
              * denotes a statistically significant difference.
```