

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ RHIZOBIUM CHO KEO LAI, KEO TAI TƯỢNG TẠI VƯỜN ỚM VÀ RỪNG TRỒNG

Lê Quốc Huy

Nguyễn Minh Châu

Trung tâm Nghiên cứu Sinh thái và Môi trường rừng

Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

Tóm tắt

Hybrid Acacia (*A. mangium* + *A. auriculiformis*) and *A. mangium* are presently important for many Afforestation Projects in Vietnam, regarding both economical and ecological purposes. The research of rhizobium technology development was set up in the context of Five Million Hectar Afforestation Program. A useful rhizobium technology has been successfully studied and developed for the two species including isolating & screening techniques in in-vitro, glass-house and nursery, multiplication & inoculum production techniques, storage & maintenance techniques, inoculation and inoculum application techniques at nursery and plantation stages. Six strains of most beneficial rhizobia for hybrid acacia and *A. mangium* has been selected and developed inoculant for application in nursery and plantation trials. The growth response of hybrid acacia in nursery to the rhizobium application was as high as 200% apx. as compared to 100% in control (height, diameter, dried weight) and similarly 30 % after one year & 20%(height, diameter) after two year of planting in plantation trials.

Key words: Hybrid acacia, *A. mangium*, rhizobium, strain, inoculant application

Mở đầu

Hàng năm trên toàn thế giới có khoảng 120- 160 triệu tấn Nitơ khí quyển được cố định và chuyển hoá thành nguồn đạm dưới các dạng khác nhau thông qua quá trình cố định đạm sinh học tự nhiên, (Gibson, 1995). Lượng đạm này ước tính gấp khoảng 2 lần lượng phân nitơ hoá học sản xuất ra hàng năm trên thế giới. Thông qua cộng sinh giữa vi khuẩn rhizobium với rễ các cây họ đậu, quá trình cố định đạm sinh học được thực hiện, cây chủ sẽ lấy được nguồn đạm vô cơ cho sinh trưởng, ngược lại vi khuẩn sẽ có được các nguồn hydrat cacbon (đường, tinh bột) cho hoạt động sống. Quan hệ cộng sinh này có vai trò quan trọng trong chu trình dinh dưỡng nitơ, ổn định năng suất cây trồng và bền vững hệ sinh thái (Macdicken, 1994. Balasundaran, 1995). Lĩnh vực cộng nghệ vi khuẩn cố định đạm rhizobium đang được quan tâm, thu hút nhiều nghiên cứu và áp dụng cho nhiều cây trồng khác nhau. Keo lai và Keo tai tượng là 2 loài cây trồng quan trọng của Chương trình 5 triệu ha rừng và nhiều chương trình trồng rừng khác ở Việt Nam. Kỹ thuật tuyển chọn, sản xuất chế phẩm rhizobium có hiệu lực cộng sinh cao ứng dụng cho keo lai, keo tai tượng vườn ươm và rừng trồng sẽ góp phần làm tăng chất lượng, hiệu quả sản xuất cây con và năng suất rừng trồng.

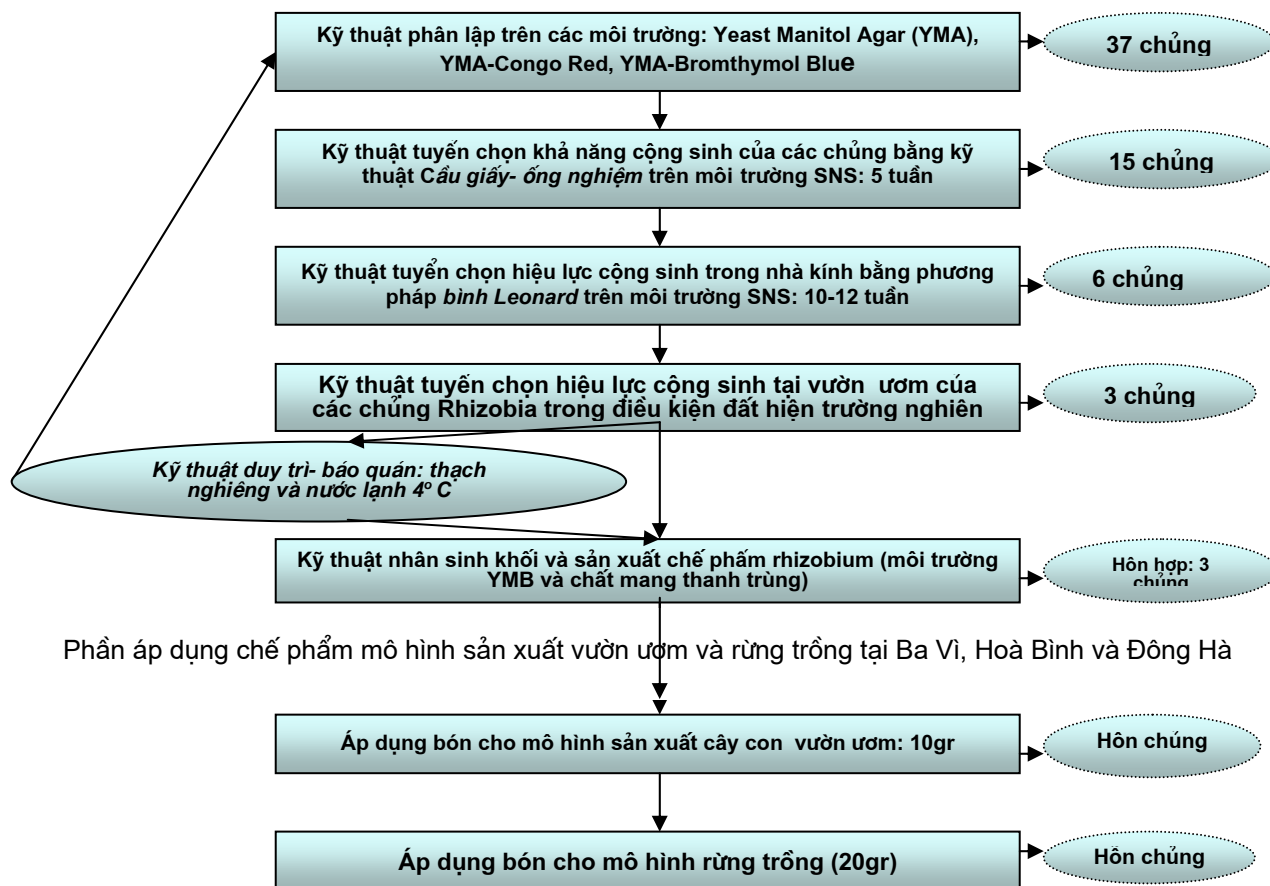
Vật liệu và phương pháp nghiên cứu của đề tài

Kỹ thuật phân lập & tuyển chọn các chủng rhizobium có hiệu lực cộng sinh cao

Các chủng vi khuẩn rhizobium được phân lập từ nốt sần rễ của cây chủ keo lai và tai tượng sinh trưởng trên một số vùng sinh thái & lập địa khác nhau. Quá trình phân lập được tiến hành trên môi trường YMA (Yeast Manitol Agar), YMA- Red Congo & YMA- Bromthymol Blue (Somasegaran và Hoben, 1985), qua đó các chủng được phân lập & phân loại ra 2 nhóm là *Rhizobium* sinh trưởng nhanh, phản ứng acid màu vàng và nhóm *Bradyrhizobium* sinh trưởng chậm, phản ứng kiềm màu xanh trên môi trường trên môi trường YMA- Bromthymol Blue. Các chủng phân lập sau đó được tuyển chọn qua nhiều bước, trước hết là khả năng hình thành cộng sinh nốt sần với cây chủ trong điều kiện in-vitro bằng phương pháp Cầu giấy- ống nghiệm trên môi trường SNS (Seedling Nutrition Solution) (Gibson 1963, 1995, Vincent 1970, Somasegaran & Hoben 1985); chỉ tiêu đánh giá là số lượng và chất lượng nốt sần hình thành.

Bước tiếp theo là tuyển chọn hiệu lực cộng sinh với cây chủ trong điều kiện nhà kính bằng phương pháp bình Leonard trên môi trường SNS vô đạm (Nitrogen-free nutrient solution) (Vincent 1970, Somasegaran & Hoben 1985). Cây chủ được nhiễm rhizobium và sinh trưởng trong điều kiện thí nghiệm 8-10 tuần, chỉ cây nào hình thành được cộng sinh nốt sần với các chủng rhizobium nhiễm, thì chúng mới sinh trưởng tốt, bằng không sinh trưởng sẽ kém. Chỉ tiêu đánh giá lá số lượng, trọng lượng nốt sần hình thành, chiều cao, đường kính và sinh khối của cây chủ. Các chủng được đánh giá là có hiệu lực cộng sinh cao trong thí nghiệm bình Leonard sẽ được tuyển chọn hiệu lực tiếp theo trong điều kiện thí nghiệm vườn ươm với thành phần lõi bầu là đất của hiện trường áp dụng, chỉ tiêu đánh giá là số lượng, trọng lượng nốt sần, chiều cao, đường kính và sinh khối.

Hình 1. Khái quát sơ đồ công nghệ rhizobium, nghiên cứu áp dụng cho keo lai và keo tai tượng



Cây keo lai Invitro được sử dụng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tuyển chọn khả năng và hiệu lực cộng sinh invitro và nhà kính. Tương ứng đối với keo tai tượng, nguồn cây từ hạt được sử dụng cho các thí nghiệm này. Thí nghiệm vườn ươm và mô hình rừng trồng sử dụng nguồn cây hom đối với keo lai và cây hạt đối với tai tượng.

Phương pháp lên men nhân sinh khối và sản xuất chế phẩm rhizobium

Các chủng rhizobium có hiệu lực cộng sinh cao nhất cho mỗi loài keo thí nghiệm được lên men nhân sinh khối trên dây truyền kỹ thuật cải tiến đơn giản để sản xuất chế phẩm sinh học rhizobium đa chủng (Sharma, Sankaran, Balasundran & Sankar, 1996). Quá trình lên men sinh khối được tiến hành ở nhiệt độ 28-30°C, 72 giờ để đạt mật độ vi khuẩn là 10⁹ tb/ml dịch đối với chủng sinh trưởng nhanh. Các bình thủy tinh dung tích 20 lít được sử dụng để lên men (fermentor), sau 3 ngày một bình thu được 15-16 lít dịch vi khuẩn rhizobium, đủ để sản xuất 60-80kg chế phẩm. Dịch vi khuẩn hỗn hợp nhiều chủng được nhiễm vào chất mang than bùn đã xử lý và thanh trùng để sản xuất chế phẩm chất nhiễm rhizobium và được sử dụng thí nghiệm, vườn ươm và rừng trồng sau đó 7 ngày.

Phương pháp bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm nhà kính (Leonard jar) và vườn ươm được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn toàn (RCBD), 3-4 lần lặp tương ứng với 3-4 khối. Trong thí nghiệm bình Leonard nhà kính, các tác nhân thí nghiệm là 15 chủng rhizobium, được bố trí ngẫu nhiên trong từng ô.

Sơ đồ thí nghiệm tuyển chọn hiệu lực cộng sinh của các chủng bằng phương pháp bình Leonard

1	4	5	3	1	3	4	5	9	Đ	14	15	14	12	2	9
1	11	9	2	14	9	11	2	5	6	2	8	11	ĐC	5	7
1	6	13	8	8	13	6	15	7	12	10	13	1	4	6	8
Đ	15	10	7	10	7	ĐC	12	1	3	4	11	10	15	3	13
Lặp 1				Lặp 2				Lặp 3				Lặp 4			

Trong thí nghiệm vườn ươm có 6 lô: 5 lô với các tác nhân thí nghiệm là 5 chủng rhizobium cho keo lai bao gồm Cal3, IIH3.1, IH1, IL1 & IQ1, tương ứng có 5 chủng cho keo tai tượng là IH1, IIH3.1, IH2, IH1 & Cal3 và 1 lô 1 đối chứng. Mô hình rừng trồng cũng được bố trí theo khối ngẫu nhiên- RCBD (Randomized Complete Block Design), 3 khối lặp, mỗi khối có 2 lô thí nghiệm: TN1 & TN2 và 1 lô đối chứng (ĐC), trong đó: **TN1**: Nhiễm vườn ươm + bón chế phẩm sau trồng 1 tháng; **TN2**: Trồng cây nhiễm chế phẩm rhizobium tại vườn ươm; **ĐC**: Không nhiễm, không bón.

Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Các thí nghiệm nhà kính và vườn ươm được quan sát, đo đếm đầy đủ số liệu của các chỉ tiêu yêu cầu, sau đó tính toán các giá trị trung bình mẫu. Để đơn giản cho đánh giá sự khác biệt giữa các lô thí nghiệm và đối chứng, tất cả các giá trị trung bình được quy đổi về phần trăm(%), trong đó giá trị trung bình của Đối chứng tính là 100%. Sử dụng "ANOVA: single factor" và "two factors without replication" trong excel 5.0 để kiểm tra ý nghĩa sự khác biệt của các giá trị trung bình mẫu và tác nhân thí nghiệm nhiễm vườn ươm và bón rừng trồng ($p= 0.95$). Sử dụng phân tích thống kê Duncan's Multiple Range Test (Duncan 1955) kiểm tra ý nghĩa sự khác biệt của từng cặp giá trị trung bình.

Địa điểm nghiên cứu áp dụng của đề tài: 3 địa điểm

Bảng 1. Đặc điểm điều kiện lập địa hiện trường thí nghiệm

	Cẩm Quỳnh			Thung Nai			Trạm Đông Hà		
	0-10	10-20	30-40	0-10	10-20	30-40	0-10	10-20	30-40
Độ dốc	10-15°			25- 30°			10-15°		
Thực bì	Bạch đàn, sim mua, guột			Lau sậy, chè vè,			Sim, mua, ngành ngành		
Đá lẫn	30% tầng 10-30cm			50% tầng 20-30cm			30%		
Đá mẹ	Sa phiến thạch			Phiến thạch sét			Sa phiến thạch		
Độ sâu (cm)	0-10	10-20	30-40	0-10	10-20	30-40	0-10	10-20	30-40
Mùn (%)	2.03	1.6	1.2	3.50	3.2	2.4	2.26	2.12	1.80
N (%)	0.22	0.13	0.12	0.12	0.14	0.10	0.06	0.03	0.02
P ₂ O ₅ (mg/100g)	4.12	2.90	2.43	6.14	3.80	3.70	1.08	0.43	0.40
K ₂ O (mg/100g)	4.8	1.60	5.60	6.10	5.46	5.00	7.23	6.03	5.60
pHKCl	4.14	3.80	3.80	4.55	4.40	4.10	3.81	3.91	3.91

Ba Vì - Hà Tây: mô hình sản xuất vườn ươm và 2 ha rừng trồng keo lai, (ii) Hoà Bình: áp dụng cho sản xuất cây con và 4 ha mô hình rừng trồng keo lai và keo tai tượng tại Thung Nai, lâm trường Sông Đà - Hoà Bình và (iii) Đông Hà- Quảng Trị: áp dụng cho sản xuất vườn ươm và 4 ha mô hình rừng trồng keo lai và tai tượng tại Trạm thực nghiệm Lâm sinh Đông Hà, tiểu khu 177, xã Cam Liên- Cam Lộ - Quảng Trị.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân lập

Kết quả phân lập thu được 35 chủng vi khuẩn rhizobium thuần khiết từ các nốt sần của keo lai và keo tai tượng sinh trưởng trên 4 vùng sinh thái và lập địa khác nhau là Lương Sơn- Hoà Bình, Cẩm Quỳ- Ba Vì, Đồng Mô - Hà Tây, Đại Lải- Mê Linh- Vĩnh Phúc, 2 chủng có nguồn gốc từ một PTN của Thái Lan. Trong tổng số 37 chủng, có tới 32 chủng thuộc nhóm *Rhizobium* sinh trưởng nhanh, khuẩn lạc rõ rệt sau 3 ngày, phản ứng axit màu vàng trên môi trường YMA-BTB, chỉ có 5 chủng là thuộc nhóm *Brandyrhizobium* sinh trưởng chậm, phản ứng màu xanh trên môi trường YMA-BTB (bảng 2). Kết quả này phù hợp với các công bố cho rằng có hơn 90% số chủng phân lập từ keo tai tượng và keo lá tràm là thuộc nhóm sinh trưởng nhanh (Sharma, Sankaran, Balasundaran, Sanka, 1995; Ty & Thang, 1995; Lafay & Burdon, 1998; Mahobia, Mahna, 2002). Điều này góp phần làm sáng tỏ thêm vấn đề đang bàn cãi cho rằng hầu hết các chủng vi khuẩn rhizobia cộng sinh với cây họ đậu nhiệt đới và các loài keo đều thuộc nhóm sinh trưởng chậm *Brandyrhizobium*.

Bảng 2. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn cố định đạm Rhizobia từ nốt sần

TT	Mã chủng	Địa điểm lấy nốt sần	Cây chủ	Phản ứng với YMA- CR	với YMA - BTB		Phân loại
					Vàng	Xanh	
1	IH1	Lương Sơn- HB	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
2	IH2	Lương Sơn- HB	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
3	IH3	Lương Sơn- HB	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
4	IH4	Lương Sơn- HB	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
5	IH5	Lương Sơn- HB	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
6	IIH3.1	Lương Sơn- HB	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
7	IIH3..2	Lương Sơn- HB	Tai tượng	Không màu		*	Brandyrhizo
8	IB1	Đá chông- BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
9	IB2	Đá chông- BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
10	IB3	Đá chông- BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
11	IB4	Đá chông- BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
12	IB5	Đá chông- BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
13	IB6	Đá chông- BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
14	IIB1	Đá chông- BV	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
15	IIB2	Đá chông- BV	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
16	IIB3	Đá chông- BV	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
17	IIB4	Đá chông- BV	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
18	IIB5	Đá chông- BV	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
19	IIM1	Đồng Mô- Sơn T	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
20	IIM2	Đồng Mô- Sơn T	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
21	IIM3	Đồng Mô- Sơn T	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
22	IIM4	Đồng Mô- Sơn T	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
23	IIM5	Đồng Mô- Sơn T	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
24	IQ1	Cẩm quỳ- BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
25	IQ2	Cẩm quỳ- BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
26	IL1	Đại lải-Mê Linh	Keo Lai	Không màu		*	Brandyrhizo
27	IL2	Đại lải-Mê Linh	Keo Lai	Không màu		*	Brandyrhizo
28	IL3	Đại lải-Mê Linh	Keo Lai	Không màu		*	Brandyrhizo
29	IL4	Đại lải-Mê Linh	Keo Lai	Không màu		*	Brandyrhizo
30	CaI.3	Vườn ươm - BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
31	CaI.6	Vườn ươm - BV	Keo Lai	Không màu	*		Rhizobium
32	CaII.4	Vườn ươm - BV	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
33	CaII.6	Vườn ươm - BV	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
34	CaIII.1	Vườn ươm - BV	Lá tràm	Không màu	*		Rhizobium
35	CaIII.6	Vườn ươm - BV	Lá tràm	Không màu	*		Rhizobium
36	TL1	Thái Lan	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium
37	TL2	Thái Lan	Tai tượng	Không màu	*		Rhizobium

Đánh giá khả năng hình thành cộng sinh nốt sần với cây chủ nuôi cấy in-vitro

Bằng phương pháp "cầu giấy" trong ống nghiệm các chủng vi khuẩn rhizobium phân lập được đánh giá khả năng hình thành cộng sinh nốt sần với cây chủ trong ống nghiệm sau 5 tuần nuôi cấy vô trùng. Những chủng có khả năng cộng sinh cao là hình thành nốt sần sớm, sau 1-2 tuần, hình thành liên tục, nốt sần có màu hồng đỏ thể hiện hoạt tính cố định đạm cao, số lượng nhiều (10-15 nốt sần /cây), kích thước to thành chùm ở cổ rễ. Loại này có 7 chủng cho keo lai và 8 chủng cho keo Tai tượng. Đa số các chủng còn lại, nốt sần hình thành muộn hơn, sau 3-4 tuần, nốt sần có màu hồng, tuy nhiên số lượng không nhiều 4-8 nốt sần/cây, các chủng này được đánh giá là mức độ khá; loại này có 9 chủng cho keo lai và 8 chủng cho keo tai tượng. Một số ít các chủng có khả năng hình thành nốt sần rất muộn & yếu với cây chủ thí nghiệm, sau 4-5 tuần, số lượng rất ít, kích thước bé, không màu; loại này gồm 6 chủng cho keo lai trong đó có 2 chủng nguồn gốc từ Thái Lan và 6 chủng cho keo tai tượng. Có rất nhiều chủng hoàn toàn không có khả năng hình thành cộng sinh nốt sần với các cây chủ thí nghiệm.

Kết quả cho thấy rằng (i) đa số các chủng có khả năng hình thành cộng sinh nốt sần mức độ cao và khá với cây chủ thí nghiệm là keo lai và keo tai tượng, (ii) một số chủng được phân lập từ keo lai (hoặc keo tai tượng) lại có khả năng hình thành cộng sinh nốt sần cao cả với 2 loài keo này, gồm IH1, IHH3.1, IHH3.2, IQ1, IL3, IL4, (iii) có rất nhiều chủng không có khả năng hình thành cộng sinh nốt sần hoặc có nhưng rất yếu với chính cây chủ mà trước đó chúng cộng sinh và được phân lập ra. Kết quả này tương tự với công bố của ACIAR nghiên cứu về tính đa dạng và đặc hiệu loài trong hình thành quan hệ cộng sinh cố định đạm giữa rhizobium với các loài keo; trong 22 chủng phân lập từ mỗi loài thì chỉ có rất ít trong số đó hình thành được cộng sinh hiệu quả đầy đủ với loài cây chủ mà chúng được phân lập ra và tương tự như vậy (Gibson, 1995).

Kết quả đánh giá hiệu lực cộng sinh bằng thí nghiệm bình Leonard trong nhà kính

Kết quả cho thấy rằng, các cây hình thành được cộng sinh nốt sần với các chủng rhizobium có sinh trưởng tốt, các chỉ tiêu đo đếm chiều cao (Hn), đường kính gốc (Do) cao hơn hàng chục thậm chí hàng trăm lần so với đối chứng, đặc biệt chỉ tiêu trọng lượng khô (thân, lá, rễ). Trong điều kiện môi trường vô đạm, nếu cây chủ không hình thành được cộng sinh thì sinh trưởng kém, vàng vọt và chết. Các chủng IB2, IB3 hoàn toàn không có khả năng hình thành cộng sinh.

Bảng 3. Hiệu lực cộng sinh của các chủng Rhizobium với Keo lai trong thí nghiệm bình Leonard nhà kính

STT	Mã chủng	Hn.		Do		Số lượng nốt sần	Trọng lượng khô	
		cm	%(so ĐC)	cm	%(so ĐC)		gr	%(so ĐC)
1	IH1	45.5	507	0.23	563	28	2.06	6868
2	CaI.3	44.0	489	0.25	625	58	1.98	6600
2	IL3	36.2	402	0.20	500	32	1.62	5400
4	IHH3.1	34.3	381	0.19	469	36	1.43	4767
5	IQ1	33.3	369	0.18	438	23	1.21	4033
6	CaIII.1	18.2	202	0.10	244	49	0.18	600
7	IB5	31.5	350	0.20	500	41	1.16	3867
8	IL4	31.0	344	0.15	375	13	1.13	3767
9	IHH3.2	28.5	317	0.18	438	21	0.73	2433
10	IH2	26.8	297	0.13	313	13	0.60	1983
11	CaI.6	12.2	135	0.10	238	4	0.08	267
12	IIB5	25.9	288	0.18	458	36	0.48	1600
13	CaIII.6	23.8	264	0.14	344	34	0.25	833
14	IH3	18.2	202	0.08	189	6	0.18	600
15	ĐC	9.0	100	0.04	100	0	0.03	100
16	IB2	7.4	82	0.08	200	0	0.03	83
17	IB3	6.64	74	0.06	150	0	0.02	60

Kết quả đánh giá hiệu lực cộng sinh trong thí nghiệm vườn ươm

5 chủng được đánh giá có hiệu lực nhất cho mỗi loài keo trong thí nghiệm bình Leonard sẽ được tuyển chọn hiệu lực tiếp tục trong thí nghiệm vườn ươm. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 5 & 6 dưới đây cho thấy, các chủng CaI3, IHH3.1, IH1 và IL3 được đánh giá là hiệu lực cộng sinh cao nhất đối với keo lai và sẽ được

sử dụng cho lên men nhân sinh khối và sản xuất chế phẩm áp dụng cho mô hình vườn ươm và rừng trồng, tương tự đối với keo tai tượng thì các chủng IH1, IB5, IH2 và IL3 được đánh giá là có hiệu lực cộng sinh cao nhất trong điều kiện vườn ươm.

Bảng 5. Hiệu lực cộng sinh rhizobium tuyển chọn với Keo tai tượng vườn ươm (Chè 2000)

STT	Mã chủng	Hn		Do		nốt sần		Trọng lượng khô	
		(cm)	(%)	(cm)	(%)	SL	(gr)	(gr)	(%)
1	IH1	85.7	183.9	0.46	255.6	35.4	0.81	8.33	330.6
2	IH3.1	79.2	167.0	0.40	222.2	25.2	0.73	7.86	311.9
3	IH2	77.7	166.7	0.46	255.6	23.2	0.64	6.76	268.3
4	IL3	70.6	151.5	0.41	227.8	20.6	0.29	5.53	219.4
5	CaI3	66.5	142.7	0.36	146.7	17.0	0.24	4.14	164.3
6	ĐC	46.6	100	0.18	100	15.0	0.18	2.52	100

Bảng 6: Hiệu lực cộng sinh rhizobium tuyển chọn với Keo lai vườn ươm (Chè 2000)

1	CaI.3	99.4	219.0	0.61	217.9	73.8	0.43	12.3	344.5
2	IH3.1	71.4	157.4	0.41	146.4	63.4	0.39	9.23	321.6
3	IH1	62.8	138.2	0.46	164.3	60.8	0.26	8.59	299.3
4	IL3	54.5	120.1	0.40	177.1	43.0	0.23	6.07	214.5
5	IQ1	69.8	153.8	0.38	135.7	20.0	0.17	4.05	141.1
6	ĐC	45.4	100	0.28	100	13.0	0.11	2.87	100

Kết quả cho thấy hiện tượng là một số chủng có hiệu lực cộng sinh rất cao trong bước tuyển chọn bình Leonard trước đó, nhưng trong tuyển chọn vườn ươm thì lại không phải là hiệu lực nhất như trường hợp của chủng IH2, CaI3 đối với keo tai tượng và IL3, IQ1 với keo lai. Có thể giả thuyết rằng là trong điều kiện vườn ươm một số một số chủng không có khả năng cao trong thích nghi với các yếu tố bất lợi của đất về dinh dưỡng, pH, độ ẩm và sự cạnh tranh của vi sinh vật bản địa, do đó hiệu lực cộng sinh đã bị giảm mạnh, mất hoạt tính.

Hình 3: Quy trình kỹ thuật sản xuất chế phẩm rhizobium

Đề tài đã sản xuất được 600kg chế phẩm rhizobium để sử dụng cho các thí nghiệm và thử nghiệm hiện trường. Chế phẩm được kiểm tra mật độ vi khuẩn định kỳ, kết quả thấy rằng số lượng tế bào tại thời điểm nhiễm là $2,5 \times 10^8$ /1g, sau 10 ngày nhiễm số lượng tế bào tăng lên tới $>10^9$ tb/1gam, và sau đó giảm dần cho tới thời điểm 6 tháng còn khoảng $>10^8$ tb/gam và giảm mạnh từ tháng thứ 7 trở đi, đến tháng thứ 12 chỉ còn lại xấp xỉ 8 triệu tb/g chế phẩm (hình 2).

ÁP dụng chế phẩm Rhizobium cho vườn ươm và rừng trồng keo lai & tai tượng

Tại vườn ươm keo lai Đá Chông- Ba Vì, khi nhiễm chế phẩm 10g/cây, sinh trưởng chiều cao cây con (Hn) là 244%, P 239%, và Do là 173% so đối chứng là 100%. Số liệu tương ứng ở vườn ươm keo lai Hoà Bình là Hn 167%; P 171% và Do 150% và vườn ươm keo lai Đông Hà là Hn 170%; P 175% (hình 4). Phản ứng tăng sinh trưởng của cây con keo tai tượng tới nhiễm chế phẩm tại vườn ươm Hoà Bình và Đông Hà cao hơn so với keo Lai. Như vậy sự sai khác giữa bón và không bón trong mô hình vườn ươm là rất rõ rệt (P= 0.95), nhưng cũng khác nhau giữa các vườn ươm khác nhau. Điều này phụ thuộc vào kỹ thuật thao tác, chăm sóc vườn ươm và nguyên liệu giống cây con ban đầu.



Bảng 7. Tác dụng bón chế phẩm rhizobium tới sinh trưởng (%) keo lai & tai tượng rừng trồng

	Keo Lai (%)				Keo Tai tượng (%)			
	Đo lần 1		Đo lần 2		Đo lần 1		Đo lần 2	
	Do	Hvn	Do	Hvn	Do	Hvn	Do	Hvn
1. Mụ hỡnh Ba Vỡ - TN 1: bún VU' + RT - TN 2 : bún VU'	123a 117b	136a 120b	114a 105b	121a 113b				
2. Mỏ hình Hoà Bỡnh - TN 1: bún VU' + RT - TN 2 : bún VU'	125a 110b	125a 105bc	119a 108b	120a 104bc	120a 116ba	119a 110bc	116a 114ba	116a 108bac
3. Mụ hỡnh Đụng Hà - TN 1: bún VU' + RT - TN 2 : bún VU'	145a 116b	114a 107b	127a 113b	116a 106ba	123a 112b	140a 128b	115a 109b	126a 118b
4. Đỏi chớng (khỏng bún)	100c	100c	100c	100c	100c	100c	100c	100c

Do: đường kính gốc; *Hn*: chiều cao vút ngọn; Trong cùng mô hình (cả đỏi chớng, giá trị có các chữ cái giống nhau đứng sau là khác nhau không có ý nghĩa (P= 0.95)).

Trong thí nghiệm rừng trồng, số liệu sinh trưởng lần 1 được đo đếm sau trồng 10- 12 tháng và lần 2 sau 22-24 tháng. Riêng rừng trồng keo lai tại Cẩm Quy- Ba Vi, số liệu đo đếm lần 1 vào 12/2000, sau trồng 7 tháng, cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các lô thí nghiệm (TN1: bón vườn ươm và rừng trồng, TN2: chỉ nhiễm vườn ươm) với đỏi chớng: chỉ tiêu Hn cao tới 136% ở TN1, Do: 123% (đỏi chớng 100%). Trong lần đo 2 sau đó 1 năm, các số liệu tương ứng đo được là Hn: 121% và Do là 114%. Số liệu tương ứng của TN2 đo được Hn: 120% và Do: 117% trong lần đo 1 và tương ứng là 13% và 5% trong lần đo 2, thấp hơn nhiều so với TN1. Nhìn chung cho cả keo lai và tai tượng, các chỉ tiêu sinh trưởng Hn, Do của TN1 trong lần đo 1 đều tăng hơn so đỏi chớng 20-40%, và sang lần đo 2 sau đó 1 năm giảm đi còn 14-25%. Tương ứng ở TN2 thì Hn, Do tăng 10-20% so đỏi chớng ở lần đo 1 và giảm đi ít trong lần đo 2 sau đó 1 năm còn 7-13%. Qua đó thấy rằng công thức TN1 bón chế phẩm cho rừng trồng có tác dụng làm tăng sinh trưởng cao hơn so TN2 chỉ bón ở vườn ươm tới 10-15%.

Như vậy, phản ứng tăng sinh trưởng của keo lai và keo tai tượng tới bón nhiễm chế phẩm rhizobium có xu hướng giảm mạnh nếu tính từ khâu áp dụng nhà kính, vườn ươm và ra đến hiện trường rừng trồng (hình 5). Điều này được giải thích là trong thí nghiệm nhà kính và vườn ươm, các điều kiện được khống chế tối ưu có lợi các chủng vi khuẩn rhizobium thí nghiệm. Các điều kiện thí nghiệm này dần dần được "nới lỏng" và các yếu tố bất lợi cho các chủng thí nghiệm ngày càng tăng, đặc biệt khi ra đến hiện trường rừng trồng thì chỉ những chủng nào có khả năng thích nghi và cạnh tranh cao thì mới có thể tồn tại và duy trì được các hoạt tính sinh học về cộng sinh cố định đạm. Và đây cũng là nguyên lý cần thiết cho việc phân lập tuyển chọn các chủng vi khuẩn rhizobium có các hoạt tính sinh học mong muốn và bền vững.

Kết luận

1. áp dụng chế phẩm rhizobium đã chủng cho keo lai và tai tượng vườn ươm (10g/bầu) đã tác dụng tăng tất cả các chỉ tiêu sinh trưởng (Hn, Do và P) bình quân đạt 180-200% cho keo lai và 180% cho keo tai tượng (đỏi chớng 100%).
2. áp dụng bón chế phẩm rhizobium đã chủng cho keo lai và tai tượng rừng trồng (20g/cây), đã tác dụng tăng sinh trưởng chỉ tiêu đo đếm Hn và Do bình quân đạt 128-130% sau trồng 10 tháng và 118-120% sau 24 tháng cho keo lai. Tương ứng 120-125% sau trồng 10 tháng và 115-120% sau 24 tháng cho keo tai tượng (đỏi chớng 100%).
3. Công thức TN1 (bón vườn ươm và rừng trồng) có tác dụng tăng sinh trưởng keo lai và keo tai tượng rừng trồng cao hơn công thức bón TN2 (chỉ bón ở vườn ươm) trung bình từ 10-15% trên cả 2 chỉ tiêu đo đếm Hn và Do. Công thức TN2 vẫn có tác dụng tăng sinh trưởng cây keo lai, keo tai tượng tại rừng trồng so đỏi chớng 10-12% sau trồng 24 tháng trên cả 2 chỉ tiêu Hn và Do.

Tài liệu tham khảo

1. Adholeya A, Sharma M P, Bhatia N P, Tyagi C, 1997, Mycorrhizal Biofertilizer- a tool for reclamation of wasteland and bioremediation.
2. Alan Gibson, (4/1995), Tài liệu tập huấn về Rhizobium tại hội thảo quốc tế kỹ thuật Rhizobium Quảng Châu-Trung Quốc.
3. Balasundaran M., 1996: Key Issues in Mycorrhizae and Nitrogen fixing symbionts research, Kerala forest research Institute, Peechi, Trichur 680653, India.
4. Hoàng Xuân Tý và cộng sự, 1992-1995, Nâng cao công nghệ thâm canh trồng rừng Bò đề, Bạch đàn, Keo và sử dụng cây họ Đậu để cải tạo đất và nâng cao sản lượng rừng, Đề tài Khoa học cấp nhà nước KNO3.13.
5. Hoang Xuan Ty, 1996, Symbiont Screening for Nitrogen Fixing Trees on Strong Acid and Acid Sulphate soils in Vietnam. *In: Use of Mycorrhizae and Nitrogen Fixing Symbionts in Revegetating Degraded Sites.* FORSPA, Bangkok- Thailand.
6. Lê Đình Khả, 1997, Keo Lai, Nhà Xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Loretto U. Dela Cruz, 1996, Effect of Nitrogen fixing and Mycorrhizal Inoculants on Growth of tree species and soil amelioration of Mt. Pinatubo affected Grasslands.
8. Mahobia Vertica and Suresh K. Mahna, 2002, Characterization of Rhizobia Isolated from *Propolis cineraria* in Jodhpur Region, Rajasthan, India.
9. Nguyễn Hải Tuất, 1997, Phương pháp sử lý số liệu thống kê trên máy vi tính.
10. Nguyễn Huy Sơn, Tuyển chọn vi khuẩn cố định đạm cho hai loài Keo trên đất Bazan tỉnh Gialai, Tạp chí Lâm nghiệp 9/1995.
11. Nguyễn Ngọc Quyên, 1993, Nghiên cứu lựa chọn chủng *Bradyrhizobium japonicum* để sản xuất Nitrazin và ứng dụng cho cây đậu tương ở một số tỉnh Miền Bắc Việt Nam, Luận án tiến sĩ khoa học Nông nghiệp.
12. Sharma J.K., Sankaran K.V., Balasundaran M. and Sankar S., 1996, Use of Mycorrhizae and Nitrogen Fixing symbionts in Reforestation of Degraded acid soils in Kerala. *In: Use of Mycorrhizae and Nitrogen Fixing Symbionts in Revegetating Degraded Sites.* FORSPA, Bangkok- Thailand.
13. Singh Sujana, 1998, Interaction of Arbuscular Mycorrhizae Fungi with Nodule Forming Nitrogen Fixing Organisms- Part II. Factors affecting efficiency of Tripartite System.
14. Somasegaran P. and Hoben H.J., 1994, Methods in Legume Rhizobium- Technology, Niftal Project University of Hawaii, USA.
15. Trần Cẩm Vân, Nguyễn Xuân Dũng, Lý Kim Băng, Khả năng hình thành nốt sần và một số đặc tính sinh học của các chủng Rhizobium cộng sinh với cây gỗ họ Đậu cải tạo đất *Acacia mangium*, Tạp chí sinh học, 3/1995.
16. Vincent J.M., 1970, A manual for practical study of the root nodule bacteria, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.





Lên men nhân sinh khối vi khuẩn rhizobium bằng “dây truyền kỹ thuật cải tiến đơn giản”



Kiểm tra nghiệm thu mô hình rừng trồng keo lai bón chế phẩm rhizobium (Ba Vì 6/2002)



Tuyển chọn khả năng cộng sinh bằng Phương pháp “Cầu giấy- ống nghiệm”



Tuyển chọn hiệu lực cộng sinh bằng phương pháp Bình Leonard trong nhà kính

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ RHIZOBIUM cho keo lai, keo tai tượng vườn ươm và rừng trồng

Le Quoc Huy

Nguyen Minh Chau

*Trung tâm Nghiên cứu Sinh thái và Môi trường rừng
Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*

SUMMARY

Hybrid Acacia (*A. mangium* + *A. auriculiformis*) and *A. mangium* are presently important for many Afforestation Projects in Vietnam, regarding both economical and ecological purposes. The research of rhizobium technology development was set up in the context of Five Million Hectar Afforestation Program. A useful rhizobium technology has been successfully studied and developed for the two species including isolating & screening techniques in in-vitro, glass-house and nursery, multiplication & inoculum production techniques, storage & maintenance techniques, inoculation and

inoculum application techniques at nursery and plantation stages. Six strains of most beneficial rhizobia for hybrid acacia and *A. mangium* has been selected and developed inoculant for application in nursery and plantation trials. The growth response of hybrid acacia in nursery to the rhizobium application was as high as 200% apx. as compared to 100% in control (height, diameter, dried weight) and similarly 30 % after one year & 20%(height, diameter) after two year of planting in plantation trials.

Key words: Hybrid acacia, *A. mangium*, rhizobium, strain, inoculant application