

TUYỂN CHỌN GIỐNG ARBUSCULAR MYCORRHIZAE VÀ RHIZOBIUM DÙNG ĐỂ SẢN XUẤT VẬT LIỆU SINH HỌC NHẪM TÁI TẠO THẨM THỰC VẬT LÀM TIỂU CẢNH TRONG KHUÔN VIÊN

Nguyễn Thị Minh*, Nguyễn Thanh Nhân

Khoa Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email: NguyenMinh@vnua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 18.03.2016

Ngày chấp nhận: 15.07.2016

TÓM TẮT

Rhizobium và nấm rễ Arbuscular mycorrhizae đều có khả năng cộng sinh với rễ cây trồng, mang lại nhiều lợi ích cho cây chủ như kích thích sự sinh trưởng phát triển của cây, tăng khả năng chịu hạn và làm giảm tỷ lệ sâu bệnh,... Nghiên cứu được tiến hành với mục đích phân lập và tuyển chọn các chủng giống Arbuscular mycorrhizae và Rhizobium có khả năng cộng sinh cao để làm giống nguyên liệu cho sản xuất vật liệu sinh học tạo thảm thực vật làm tiểu cảnh trong khuôn viên. Kết quả đã chọn được 2 chủng nấm Arbuscular mycorrhizae và 3 chủng Rhizobium đều là những chủng sinh trưởng, phát triển nhanh, có sức sống và khả năng cộng sinh cao với cây trồng, có thể dùng làm giống để sản xuất vật liệu sinh học. Thí nghiệm xử lý vật liệu sinh học để tạo thảm cỏ chứng tỏ sự thiết lập mối quan hệ cộng sinh của Rhizobium và Arbuscular mycorrhizae trên cây chủ mang lại hiệu quả hiệp đồng làm tăng cường khả năng sinh trưởng và phát triển của cây, chống chịu cao với điều kiện bất lợi và góp phần cải thiện tính chất đất, giúp tái tạo thành công thảm thực vật dùng làm tiểu cảnh cho khuôn viên. Tỷ lệ che phủ cỏ sau 5 tuần ở công thức sử dụng vật liệu sinh học rất cao (đạt 95,63%), gấp 1,75 lần so với đối chứng (54,6%).

Từ khóa: Arbuscular mycorrhizae, Rhizobium, sự cộng sinh, vật liệu sinh học, tái tạo thảm thực vật.

Selection of Arbuscular mycorrhizae and Rhizobium for Production of Biological Materials Used to Revegetation for The Campus Scene

ABSTRACT

Rhizobium and Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are capable of symbiosis with plant roots. They bring many benefits to plant hosts as to stimulate the growth and development of plants, increase drought tolerance and reduce disease incidence. This study was executed with the aim to isolate and select Arbuscular mycorrhizae and Rhizobium strains with a high symbiosis for biological material production to revegetation of the campus scene. Two strains of Arbuscular mycorrhizal fungi and three Rhizobium strains were selected that exhibit fast growth, high vitality and symbiosis with plants and could be used for biological material production. The inoculation experiment with biological materials to the revegetation of grass proved the establishment of the symbiosis of Rhizobium and Arbuscular mycorrhizal fungi with host plants that promoted the plant growth and development and improved soil fertility. The vegetation covering rate using biomaterial treatment was very high (95.63%), 1.75 times higher than the control (54.6%) after 5 weeks of application.

Keywords: Arbuscular mycorrhizae, Rhizobium, plant symbiosis, revegetation, biological material.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đất trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng đang đứng trước nguy cơ thoái hóa nghiêm trọng do nhiều nguyên nhân khác nhau

như sản xuất nông nghiệp không bền vững, hoạt động phá rừng đặc biệt là rừng đầu nguồn, hay do chính sách bảo vệ đất không hợp lý. Sự phát triển của các khu đô thị, khu công nghiệp, biến đổi khí hậu,... đều làm giảm diện tích đất nông

nghiệp. Đất bị thoái hóa, mất dinh dưỡng, giảm độ phì nhiêu làm giảm sự đa dạng các loại vi sinh vật có ích trong đất kéo theo sự suy giảm của thảm thực vật.

Thảm thực vật bị tàn phá gây nguy cơ xói mòn, lũ lụt và mất nơi cư trú của nhiều loài sinh vật. Đó cũng là nguyên nhân dẫn đến biến đổi khí hậu, ảnh hưởng lớn tới cuộc sống của con người và sinh vật. Quá trình công nghiệp hóa và hiện đại hóa đã làm thay đổi diện mạo đời sống dân cư nói chung cũng như ảnh hưởng không nhỏ đến không gian tự nhiên, đặc biệt là ở các khu đô thị hóa. Vì thế, tạo ra không gian sống và làm việc trong lành với các khuôn viên xanh, dù là ở gia đình, trường học hay công sở,... là đòi hỏi vô cùng cấp thiết.

Các biện pháp cải tạo đất và thảm thực vật hiện nay như vật liệu giữ ẩm, bầu cây, chế phẩm sinh học chưa thực sự hiệu quả do hạn chế về mặt kỹ thuật, kinh phí, giống vi sinh vật có hiệu lực chưa cao,... Một hướng mới có triển vọng trong ứng dụng thực tiễn là sử dụng vật liệu sinh học từ một số chủng vi sinh vật có tính năng đặc biệt với hoạt tính sinh học và khả năng cộng sinh cao trên cây chủ như Mycorrhizae và Rhizobium. Vi khuẩn Rhizobium là loài sống cộng sinh với các cây họ đậu hay cây điền thanh, lục lạc lá tròn,... có khả năng cố định nitơ cung cấp cho sự phát triển của cây trồng và cải thiện tính chất đất. Arbuscular mycorrhizae (AM) là loài nấm rễ nội cộng sinh, các sợi nấm rễ liên kết chặt chẽ lại với nhau tạo thành một mạng lưới phát triển dày đặc sẽ giúp tăng khả năng hút nước và chất dinh dưỡng cung cấp cho sự phát triển của cây trồng, đặc biệt là các chất dinh dưỡng ở dạng ít tan như photpho (Dighton, 2009). Ngoài ra, hệ thống nấm rễ này còn sản xuất ra các axit mùn làm tăng độ tơi xốp và độ phì nhiêu cho đất, giúp cho cây có thể sinh trưởng và phát triển trên các vùng đất bị tàn phá nghèo dinh dưỡng (Zaki *et al.*, 2008). Vì thế, nếu chúng ta biết cách khai thác tối đa hiệu quả hiệp đồng của Arbuscular mycorrhizae và Rhizobium trong cải tạo đất và tái tạo thảm thực vật thì sẽ đảm bảo cho sự thành công trong bảo vệ môi trường.

Trên thế giới, một số tác giả đã nghiên cứu về việc ứng dụng của AM như bảo vệ rừng tại

Bangladesh theo phương pháp xử lý nấm rễ cho cây tại vườn ươm (Mridha, 2003). Dự thảo Mike Amaranthus (2001) ứng dụng nấm rễ cho cỏ Bermuda để xây dựng và bảo trì sân golf tại California và Oregon (Mỹ) giúp cải thiện, tăng cường sự phát triển và sức đề kháng của cỏ trên sân golf. Rhizobium cũng được ứng dụng nhiều trong sản xuất phân đạm sinh học hay chế phẩm vi sinh nhằm tăng năng suất rừng trồng (Lê Quốc Huy và cs., 2004). Nguyễn Thị Minh và cs. (2005, 2014) đã phân lập và tuyển chọn được giống AM dùng để xử lý cho cây trồng và sản xuất vật liệu sinh học phủ xanh đất trống. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào ứng dụng kết hợp giữa Arbuscular Mycorrhizae và Rhizobium trong sản xuất nông lâm nghiệp. Trong khi Arbuscular mycorrhizae được chứng minh là phát triển tốt hơn và kích thích sinh trưởng phát triển của cây họ đậu mạnh hơn do sự cố định nitơ phân tử (Howeler *et al.*, 1987). Ngược lại, sự liên kết của AM làm tăng sự hình thành nốt sần ở cây họ đậu, dẫn đến tăng cường sự sinh trưởng phát triển của cây (Bethelenfalvay *et al.*, 1987; Gueye *et al.*, 1987; Badr EL - Dim and Moawad, 1988; Louis and Lim, 1988; Kaur and Singh, 1988) nhờ khả năng hấp thụ photpho qua hệ sợi nấm. Chính vì vậy, Arbuscular mycorrhizae và Rhizobium mang đến hiệu quả hiệp đồng làm cho hệ cộng sinh phát huy được tối đa đặc tính tốt trên cây.

Xuất phát từ thực tế trên, với mục đích tạo tiền đề cho sử dụng vật liệu sinh học để tái tạo thảm thực vật cho nhiều mục đích khác nhau, đề tài: “*Tuyển chọn giống Arbuscular mycorrhizae và Rhizobium dùng để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật làm tiểu cảnh trong khuôn viên*” được thực hiện nhằm tuyển chọn được các giống Mycorrhizae và Rhizobium có hoạt tính sinh học và khả năng cộng sinh cao, dùng làm giống nguyên liệu để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật làm tiểu cảnh cho các khuôn viên nhỏ hẹp (nhà ở, trường học,...).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu nghiên cứu được lấy tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ các cây họ đậu (lạc, đậu

tương, điền thanh) và các cây họ hòa thảo (cỏ gừng, cỏ tranh, cỏ mần trầu). Đất vùng rễ được lấy trong phạm vi đường kính 15 - 20 cm theo phương pháp của Phillip and Hayman (1970). Với cây họ đậu, lấy nguyên bộ rễ để thu được những nốt sần.

Phân lập bào tử Arbuscular mycorrhizae trực tiếp từ đất vùng rễ của cây trồng theo phương pháp sàng ướn cải tiến (Gerderman and Nicoson, 1963). Quan sát hình thái và đo kích thước của bào tử, phân loại Arbuscular mycorrhizae theo hệ thống của Franke and Morton (1994). Hình dạng và kích thước của bào tử được xác định theo bảng so sánh của Morton (1988). Màu sắc của bào tử được xác định bằng bảng màu chuẩn 4 nhân tố CMYB (Cyan/ Magenta/ Yellow/ Black) (theo INVAM). Xác định số lượng bào tử AM theo phương pháp đếm trực tiếp (Brundrett, 1991). Đánh giá đặc tính sinh học của các chủng giống Arbuscular mycorrhizae bằng cách xác định tỷ lệ nảy mầm, sự phát triển của hệ sợi (theo 4 cấp độ: A, B, C, D) và quá trình sinh trưởng của bào tử nấm rễ (theo 3 mức phân hạng: I, II, III) trong dung dịch chiết đất với 10 bào tử theo dõi trong điều kiện tối ở 25°C (Nguyễn Thị Minh và cs., 2005; 2014).

Thí nghiệm chậu vại theo phương pháp của Viencent (1976) với 5 lần nhắc lại trong chậu đất vô trùng trên cây cỏ mần trầu (*Eleusine indica*) được thực hiện trong nhà lưới của Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Hạt giống được khử trùng trong dung dịch NaClO 10%, rửa sạch bằng nước cất rồi cho nảy mầm trên giấy lọc ẩm trong đĩa petri vô trùng ở 25°C. Sau khi hạt nảy mầm và ra rễ khoảng 2 - 3cm, cây con sẽ được đặt vào trong chậu đất vô trùng (3 cây/300g đất). Đất được sàng qua rây 2mm và khử trùng 2 lần ở 80°C trong nồi hấp trước khi sử dụng. Bào tử AM được nhiễm vào hệ rễ của cây chủ với 10 bào tử/chậu. Xác định các chỉ tiêu sinh trưởng của cây chủ và sự thiết lập quan hệ cộng sinh của nấm rễ trên cây sau 30 ngày xử lý nấm rễ. Xác định tỷ lệ xâm nhiễm của nấm rễ vào rễ cây chủ theo phương pháp phóng đại ô giao nhau của McGonigle (1990) và đếm số lượng bào tử tạo thành từ thí nghiệm chậu vại theo phương pháp trực tiếp (Brundrett, 1991).

Phân lập các chủng vi khuẩn Rhizobium từ nốt sần cây họ đậu trên môi trường chuyên tính (YMA). Đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng Rhizobium theo phương pháp nuôi cấy trực tiếp trên môi trường YMA ở các điều kiện khác nhau, sử dụng streptomycin để đánh giá khả năng cạnh tranh của Rhizobium với các mức 300, 500, 800 và 1.000 mg/L môi trường. Khả năng cộng sinh của Rhizobium được đánh giá theo phương pháp xử lý cho hạt giống trong chậu cát vô trùng (3 hạt, 300 g cát/chậu) có bổ sung dung dịch dinh dưỡng không nitơ trong thời gian 30 ngày. Các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của cây trồng, số lượng nốt sần và nốt sần hữu hiệu được xác định theo phương pháp đo đếm trực tiếp. Giống Rhizobium được phân loại dựa trên phản ứng đổi màu trên môi trường YMA có chứa Bromothymol blue (20 mg/l) do khả năng axit hóa hay kiềm hóa môi trường của chúng khi sinh trưởng và phát triển (Saeki *et al.*, 2005).

Vật liệu sinh học (VLSH) được sản xuất theo quy trình của Nguyễn Thị Minh và cs. (2014) với chất nền chính là đất phù sa sông Hồng, giống AM và Rhizobium. Chất lượng của vật liệu sinh học được xác định theo các phương pháp thông dụng hiện hành theo tiêu chuẩn Việt Nam. Thử nghiệm tái tạo thảm thực vật gồm 2 công thức: đối chứng (có bổ sung dinh dưỡng NPK tương đương trong VLSH) và sử dụng vật liệu sinh học, được tiến hành theo khối ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, diện tích ô thí nghiệm là 1m². Sau 5 tuần theo dõi, các chỉ tiêu tính chất đất được phân tích và xác định tỷ lệ che phủ và sự sinh trưởng phát triển của cây (cỏ hoàng lạc - *Arachis pinto*) để đánh giá hiệu quả của vật liệu sinh học. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây, số lượng nốt sần và bào tử AM, tỉ lệ che phủ (được xác định thông qua chỉ số diện tích lá) bằng cách đo đếm trực tiếp. Mức độ xâm nhiễm của AM trên cây chủ được xác định theo phương pháp phóng đại ô giao nhau của McGonigle (1990) sau khi nhuộm rễ bằng trypan blue.

Số liệu của nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn Rhizobium

Từ 15 mẫu rễ của 3 loại cây (điền thanh, đậu tương, lạc) trên đất phù sa sông Hồng đã phân lập được 24 chủng Rhizobium. Khả năng cộng sinh của Rhizobium được đánh giá thông qua xử lý trực tiếp giống vi khuẩn cho hạt đậu xanh, kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Thời gian mọc nốt sần càng sớm, số lượng nốt sần hữu hiệu càng nhiều chứng tỏ khả năng cố định nitơ phân tử của vi khuẩn Rhizobium càng cao và thiết lập được mối quan hệ cộng sinh tốt trên cây chủ. Do đó, 10 chủng Rhizobium có khả năng cộng sinh cao nhất gồm có RT1, RT3, RT5 (vi khuẩn nốt sần điền thanh), RD3, RD4, RD5 (vi khuẩn nốt sần đậu tương) và RL1, RL2, RL4, RL5 (vi khuẩn nốt sần lạc) đã được lựa chọn

cho nghiên cứu tiếp theo. Đặc tính sinh học chủ yếu của 10 chủng Rhizobium đã lựa chọn được thể hiện ở bảng 2. Tất cả các giống Rhizobium được lựa chọn đều có khả năng mọc nhanh, thích ứng ở pH trung tính, ưa ẩm và khả năng cạnh tranh khá cao. Trong đó, 3 chủng Rhizobium có đặc tính sinh học cao nhất (thích ứng nhiệt độ và pH rộng, khả năng cạnh tranh cao) là RT1, RD5 và RL4 được tuyển chọn làm giống để sản xuất vật liệu sinh học.

Bảng 3 thể hiện kết quả phân loại các giống Rhizobium đã được tuyển chọn. Trong đó có một giống thuộc nhóm 1 - làm axit hóa môi trường (*Shinorhizobium fredii*) và 2 giống thuộc nhóm 2 - làm kiềm hóa môi trường (*Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium vigna*). Kết quả này cũng khá tương đồng với nghiên cứu của Saeki *et al.* (2005), nhóm *Bradyrhizobium* chiếm ưu thế trong các giống Rhizobium trên đất phù sa.

Bảng 1. Khả năng cộng sinh của các chủng Rhizobium

Ký hiệu giống	Nguồn gốc	Thời gian xuất hiện nốt sần (ngày)	Số lượng nốt sần hữu hiệu (nốt/cây)
RT1	Điền thanh	15,3	10,6
RT2	Điền thanh	21,6	3,3
RT3	Điền thanh	17,3	4,3
RT4	Điền thanh	22,6	1,6
RT5	Điền thanh	18,6	8,3
RT6	Điền thanh	24,3	2,0
RT7	Điền thanh	21,3	2,6
RT8	Điền thanh	23,0	1,3
RT9	Điền thanh	25,0	0
RT10	Điền thanh	24,3	1,0
RT11	Điền thanh	19,6	1,6
RT12	Điền thanh	20,3	0
RT13	Điền thanh	22,6	0
RD1	Đậu tương	16,3	2,3
RD2	Đậu tương	16,0	3,3
RD3	Đậu tương	14,3	4,6
RD4	Đậu tương	15,3	5,3
RD5	Đậu tương	13,6	7,3
RD6	Đậu tương	15,6	3,6
RL1	Lạc	14,3	7,6
RL2	Lạc	14,6	5,6
RL3	Lạc	17,6	1,3
RL4	Lạc	16,3	6,3
RL5	Lạc	16,6	4,6

Tuyển chọn giống Arbuscular mycorrhizae và Rhizobium dùng để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật làm tiểu cảnh trong khuôn viên

Bảng 2. Một số đặc tính sinh học của các chủng Rhizobium

Giống VSV	pH thích ứng	Khả năng kháng kháng sinh (mg/L)	Khả năng thích ứng t° (°C)	Thời gian mọc (h)
RT1	5 ÷ 7	300 ÷ 800	25 ÷ 35	24
RT2	6 ÷ 7	300 ÷ 500	25 ÷ 30	48
RT5	6 ÷ 8	300 ÷ 1.000	20 ÷ 35	36
RĐ3	6 ÷ 7	300 ÷ 800	25 ÷ 35	48
RĐ4	6 ÷ 7	300 ÷ 1.000	20 ÷ 30	36
RĐ5	5 ÷ 8	300 ÷ 1.000	20 ÷ 35	48
RL1	5 ÷ 7	300 ÷ 800	25 ÷ 35	24
RL2	6 ÷ 7	300 ÷ 500	25 ÷ 30	48
RL4	6 ÷ 8	300 ÷ 1.000	20 ÷ 35	36
RL5	6 ÷ 7	300 ÷ 800	25 ÷ 35	48

Bảng 3. Phân loại giống Rhizobium

Giống Rhizobium	Màu sắc YMA - BT	Phân loại
RT1	Vàng	Nhóm 2 (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>)
RĐ5	Xanh	Nhóm 1 (<i>Shinorhizobium fredii</i>)
RL4	Vàng	Nhóm 2 (<i>Bradyrhizobium vigna</i>)

3.2. Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm rễ Arbuscular mycorrhizae

Ba loại cỏ có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh và phổ biến trong tự nhiên là cỏ tranh, cỏ gừng, cỏ mần trầu và một loại cây họ đậu (điền thanh) được lựa chọn để phân lập nấm rễ. Từ các mẫu đất vùng rễ đã phân lập và lựa chọn được 11 chủng bào tử nấm rễ (kí hiệu từ AM1 - AM11) để tiến hành nghiên cứu đặc tính sinh học.

11 chủng nấm rễ được lựa chọn để nghiên cứu đặc tính sinh học đã được phân loại theo hệ thống của Franke và Morton (1994) bằng phương pháp hình thái học (Bảng 4) gồm có:

- 3 chủng thuộc giống *Gigaspora* được ký hiệu từ *Gigaspora* sp1 đến *Gigaspora* sp3;
- 3 chủng thuộc giống *Glomus* được ký hiệu từ *Glomus* sp1 đến *Glomus* sp3;
- 3 chủng thuộc giống *Scutellospora* được ký hiệu từ *Scutellospora* sp1 đến *Scutellospora* sp3;
- 2 chủng thuộc giống *Acaulospora* được ký hiệu là *Acaulospora* sp1 và *Acaulospora* sp2.

Kết quả này cũng gợi ý rằng quần thể nấm rễ trong đất Việt Nam khá đa dạng, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Súc và cs. (2005) về AM trên đất trồng bưởi.

3.2.1. Kết quả sự sinh trưởng của bào tử nấm rễ

Sau 15 ngày nuôi cấy, đa số bào tử vẫn ở giai đoạn đầu của thời kỳ sinh trưởng kiểu A, một số đã chuyển sang giai đoạn kiểu B và C, đặc biệt khá nhiều bào tử đã ở giai đoạn sinh trưởng mạnh, phân nhiều nhánh (kiểu D). Trong đó phát triển nhanh và mạnh nhất là chủng AM1 và AM10, yếu nhất là chủng AM7 (Hình 1a).

Sau 30 ngày nuôi cấy, hầu hết các bào tử chuyển sang giai đoạn sinh trưởng cuối cùng (kiểu D), nhiều bào tử sinh trưởng chậm vẫn ở giai đoạn kiểu A. Số lượng bào tử phát triển ở kiểu C tăng lên. Chủng sinh trưởng mạnh nhất là AM1, AM5, AM10 và yếu nhất là chủng AM7 và AM3 (Hình 1b).

Bảng 4. Hình thái học và phân loại của các chủng Arbuscular mycorrhizae

Ký hiệu giống	Hình dạng	Màu sắc	Kích thước (μm)	Phân loại
AM1	Hình cầu, gần hình cầu, một số bất quy tắc	Trắng tới kem, vàng sẫm, trong	260 - 375	<i>Gigaspora</i> sp1
AM2	Hình cầu, gần hình cầu, một số bất quy tắc	Vàng rom tới vàng xanh tươi	250 - 385	<i>Gigaspora</i> sp2
AM3	Hình cầu, gần hình cầu	Màu kem tới vàng, vàng sẫm	205 - 290	<i>Gigaspora</i> sp3
AM4	Hình cầu, gần hình cầu, một số bất quy tắc	Nâu vàng nhạt tới nâu cam	100 - 210	<i>Glomus</i> sp1
AM5	Hình cầu, gần hình cầu, hình elip	Trắng tới nâu vàng, vàng nhạt	120 - 265	<i>Glomus</i> sp2
AM6	Hình cầu, gần hình cầu, thuôn dài, hình elip	Trắng tới vàng nhạt	110 - 275	<i>Glomus</i> sp3
AM7	Hình cầu, gần hình cầu	Xanh xám tới màu đồng sẫm, kem đậm	215 - 360	<i>Scutellospora</i> sp1
AM8	Hình cầu, gần hình cầu	Vàng rom nhạt tới nâu cam	200 - 345	<i>Scutellospora</i> sp2
AM9	Gần hình cầu tới thuôn dài	Vàng nhạt tới nâu đỏ nhạt	180 - 320	<i>Scutellospora</i> sp3
AM10	Hình cầu, gần hình cầu, một số thuôn dài	Nâu vàng nhạt tới nâu cam sẫm, đen	130 - 260	<i>Acaulospora</i> sp1
AM11	Hình cầu, gần hình cầu, một số bất quy tắc	Vàng nhạt tới nâu cam	125 - 245	<i>Acaulospora</i> sp2

3.2.2. Tỷ lệ nảy mầm và sự phát triển hệ sợi của bào tử nấm rễ

Tại thời điểm 30 ngày nuôi cấy, chủ yếu các bào tử có hệ sợi phát triển ở mức 1 và mức 2, chỉ có một số bào tử có hệ sợi phát triển mạnh ở mức 3 với nhiều cấu trúc đặc trưng. Phát triển nhanh và mạnh nhất là bào tử chủng AM1 và AM10, yếu nhất là chủng AM3 và AM7 (Hình 2).

Tỷ lệ nảy mầm của bào tử cũng cho kết quả tương tự. Tất cả các chủng đều có tỷ lệ nảy mầm của bào tử từ 50% trở lên. Trong đó, tỷ lệ nảy mầm cao nhất đạt 80% (với AM1, AM10), thấp nhất là 50% (AM3, AM6, AM7 và AM8).

Từ kết quả nghiên cứu chúng tôi đã chọn được 4 chủng AM có hoạt tính sinh học cao nhất để tiến hành đánh giá khả năng cộng sinh trên cây trong thí nghiệm chậu vại bao gồm *Gigaspora* sp1 (AM1), *Acaulospora* sp1 (AM10), *Glomus* sp2 (AM5) và *Scutellospora* sp3 (AM9).

3.2.3. Đánh giá khả năng cộng sinh trên cây chủ của các chủng Arbuscular mycorrhizae

Khả năng cộng sinh của các chủng nấm rễ được đánh giá thông qua việc xử lý AM trên cây chủ (thí nghiệm trong chậu đất vô trùng). Chủng AM nào khi xử lý cho cây mà tăng cường được sự sinh trưởng và phát triển của cây chủ cũng như có khả năng xâm nhập vào rễ cây và sản sinh ra nhiều bào tử mới thì có sức sống cao (Nguyễn Thị Minh, 2005).

Số liệu ở bảng 5 cho thấy các chỉ tiêu theo dõi ở các công thức nhiễm bào tử nấm rễ khác nhau và đều cao hơn hẳn ở công thức đối chứng (không nhiễm). Sự sai khác này đều vượt xa sai số cho phép LSD 5% ở tất cả các chỉ tiêu theo dõi. Kết quả này khẳng định cho các nghiên cứu trước đây của Nguyễn Thị Minh và cs. (2005, 2014), xử lý AM sẽ làm tăng cường sinh trưởng phát triển của cây trồng. Trong các công thức xử lý nấm rễ, kết quả cao nhất đạt được ở công thức 2 - nhiễm AM1 và công thức 5 - nhiễm AM10, thấp nhất là ở công thức 3 - nhiễm AM5.

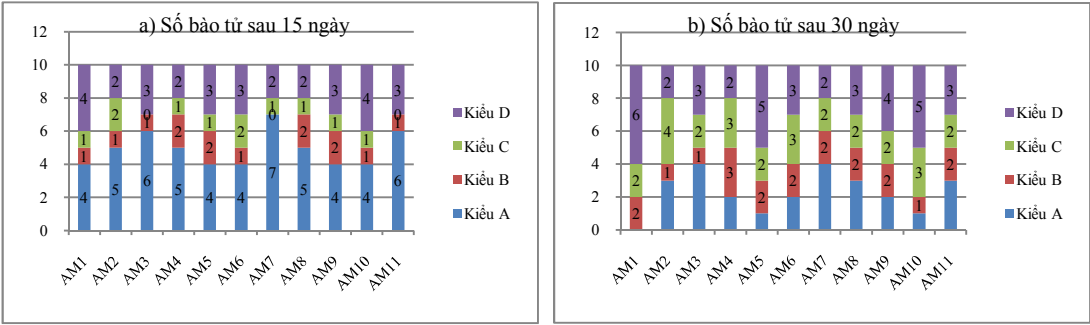
Như vậy, trong các chủng nấm rễ mới được tuyển chọn thì chủng *Gigaspora* sp1 (AM1) và *Acaulospora* sp1 (AM10) cho hiệu quả trên cây chủ cao hơn, hứa hẹn khả năng ứng dụng cao hơn các chủng còn lại.

Tuyển chọn giống Arbuscular mycorrhizae và Rhizobium dùng để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật làm tiểu cảnh trong khuôn viên

3.3. Đánh giá chất lượng của vật liệu sinh học

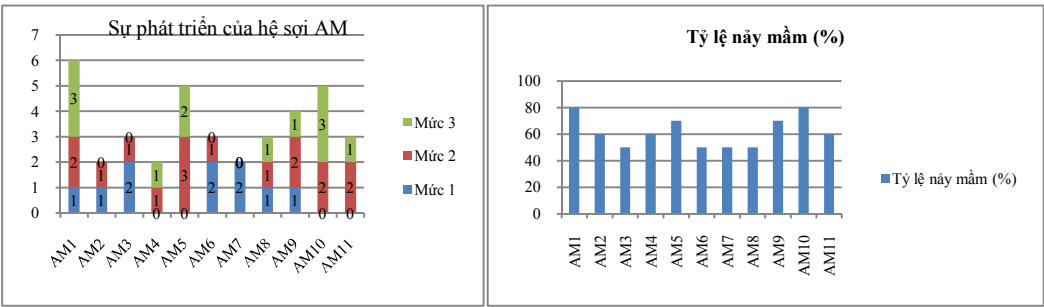
Đất sử dụng để phân lập các giống Rhizobium và Arbuscular mycorrhizae sẽ là môi trường tự nhiên lý tưởng để các giống này sinh trưởng và phát triển. Sự có mặt của Rhizobium làm tăng cường khả năng cố định nitơ, có tác

dụng thúc đẩy sự hoạt động của Arbuscular mycorrhizae cũng như hoạt động của hệ vi sinh vật hữu ích trong đất nên việc sử dụng kết hợp Arbuscular mycorrhizae với Rhizobium đem lại hiệu quả tốt hơn trên cây trồng (Alan *et al.*, 2009; Alireza *et al.*, 2011, Yanjun *et al.*, 2010).



Hình 1. Sự sinh trưởng của bào tử nấm rễ AM

Ghi chú: Kiểu A: chưa hình thành sợi; Kiểu B: Hình thành sợi ngắn; Kiểu C: Sợi nấm bắt đầu phân nhánh; Kiểu D: Sợi nấm có nhiều nhánh, hình thành cấu trúc đặc trưng.



Hình 2. Tỷ lệ nảy mầm và sự phát triển của hệ sợi nấm rễ

Ghi chú: Mức 1: Bào tử phát triển một sợi; Mức 2: Số lượng sợi nấm phát triển trung bình; Mức 3: Sợi nấm sinh trưởng mạnh tới mức tối đa với nhiều cấu trúc đặc trưng.

Bảng 5. Ảnh hưởng của xử lý nấm rễ đến một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây chủ (cỏ mần trầu - *Eleusine indica*)

Công thức	Chiều dài thân (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng thân (g)	Khối lượng rễ (g)	Mức độ xâm chiếm rễ (% theo dài rễ)	Số lượng bào tử/100 g đất
Đối chứng	14,30	6,20	1,40	0,15	1,48	1,67
Nhiễm AM1	18,52	9,88	4,69	0,41	20,98	25,67
Nhiễm AM5	16,05	8,53	2,64	0,34	12,74	13,33
Nhiễm AM9	16,84	8,72	3,31	0,35	13,37	15,0
Nhiễm AM10	17,39	9,43	3,73	0,40	17,44	22,67
LSD 5%	0,43	0,25	0,30	0,4	0,42	2,4
CV%	1,4	1,6	5,3	12,5	1,7	8,1

Vật liệu sinh học được sản xuất với chất nền chính là đất phù sa sông Hồng, hỗn hợp phân NPK (15 - 0 - 15), tổ hợp Rhizobium và Arbuscular mycorrhizae, được phối trộn theo phương pháp phối trộn chất mang không thanh trùng theo Nguyễn Thị Minh và cs. (2014). Chất lượng của vật liệu sinh học được trình bày ở bảng 6.

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, sau phối trộn độ ẩm của VLSH đạt 24,5%; giàu đạm và lân tổng số, kali ở mức trung bình. Mật độ AM và Rhizobium đều ở mức cao. Như vậy, VLSH đảm bảo được mật độ vi sinh vật cũng như hàm lượng dinh dưỡng cho cây con phát triển.

3.4. Thực nghiệm xử lý vật liệu sinh học để tạo thảm cỏ làm tiểu cảnh

Kết quả thực nghiệm đánh giá hiệu quả tái tạo thảm thực vật khi xử lý bằng vật liệu sinh học được thể hiện ở bảng 7.

Ở CT2 có sử dụng vật liệu sinh học cho hàm lượng OC% và N đều có xu hướng tăng so với CT1 (CT đối chứng), nhất là độ xốp và mật độ vi

sinh vật trong đất được tăng cường rõ rệt (Bảng 7). Bên cạnh đó, hoạt động của Rhizobium và Arbuscular mycorrhizae trong VLSH không những có tác dụng làm tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng cung cấp cho sự phát triển của cây trồng mà còn làm cải thiện tính chất đất và tăng cường hoạt động của hệ vi sinh vật trong đất. Điều này cũng khẳng định khả năng cải thiện tính chất đất của VLSH theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh và cs. (2014).

Hơn thế nữa, khi sử dụng vật liệu sinh học để tạo thảm cỏ, các chỉ tiêu sinh trưởng của cỏ cũng như sự cộng sinh của AM và Rhizobium với cây trồng ở CT2 đều cao hơn ở đối chứng và đều ở mức sai số có ý nghĩa (Bảng 8), giúp đảm bảo cho sự sinh trưởng phát triển của cây. Kết quả đạt được đã khẳng định rằng AM sẽ sinh nhiều bào tử trên cây họ đậu hơn so với các loại cây cỏ khác và ngược lại, hoàn toàn tương đồng với nghiên cứu của Howeler *et al.* (1987) và Yanjun *et al.* (2010).

Bảng 6. Một số tính chất của vật liệu sinh học

Tính chất vật lý		Tính chất hóa học				Tính chất sinh học	
pH	Độ ẩm	OC	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	AM/100g (bào tử)	Rhizobium (CFU/g)
		%					
7,5	24,5	1,07	0,50	0,16	1,48	132	1,3x10 ⁶

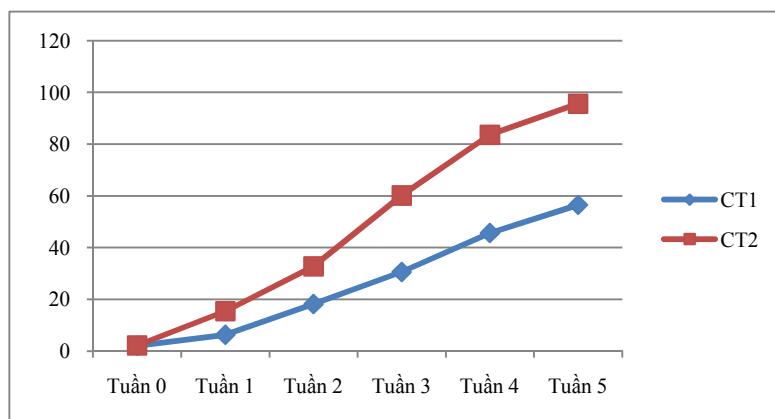
Bảng 7. Hiệu quả xử lý vật liệu sinh học tạo thảm cỏ làm tiểu cảnh

CT	Tính chất đất sau xử lý						VSVTS (10 ⁶ CFU/g)
	pH	OC	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Độ xốp	
1	6,1	1,68	0,14	0,12	1,69	46,4	8,6
2	6,5	1,75	0,17	0,13	1,72	67,3	98,7

Bảng 8. Ảnh hưởng của xử lý VLSH đến sự sinh trưởng của cỏ và hệ cộng sinh

Công thức	Chiều dài thân	Chiều dài rễ	Khối lượng thân	Khối lượng rễ	Tỷ lệ xâm nhiễm AM (%)	Số bào tử AM /100 g đất	Số lượng nốt sần/cây
	cm/cây	cm/cây	g/cây	g/cây			
1	12,13	6,08	7,39	2,01	9,48	8,25	7,32
2	19,35	12,50	18,65	8,89	45,67	45,56	22,78
LSD 5%	0,45	2,01	2,82	0,5	3,0	2,52	1,75
CV%	0,8	5,6	6,5	2,7	7,1	6,3	5,3

Tuyển chọn giống Arbuscular mycorrhizae và Rhizobium dùng để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật làm tiểu cảnh trong khuôn viên



Hình 3. Sự biến động của độ che phủ theo thời gian

Đặc biệt, tại thời điểm theo dõi sau 5 tuần, tỉ lệ che phủ cỏ ở công thức sử dụng vật liệu sinh học rất cao đạt 95,63% so với đối chứng (chỉ đạt 54,6%) (Hình 3). Kết quả này cho thấy sự phối hợp AM và Rhizobium đã rút ngắn được thời gian che phủ so với các nghiên cứu chỉ sử dụng AM trước đây của Nguyễn Thị Minh và cs. (2014) và khẳng định hiệu quả hiệp đồng của Mycorrhizae và Rhizobium trong vật liệu sinh học, giúp tái tạo thành công thảm thực vật làm tiểu cảnh.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Tuyển chọn được tổ hợp giống VSV gồm 5 chủng giống có đặc tính sinh học tốt và có khả năng cộng sinh cao với rễ cây, trong đó có 3 chủng Rhizobium (*Shinorhizobium fredii* M1, *Bradyrhizobium japonicum* và *Bradyrhizobium vigna*) và 2 chủng Arbuscular mycorrhizae (*Gigaspora* sp1, *Acaulospora* sp1) để làm giống sản xuất vật liệu sinh học.

Vật liệu sinh học từ Arbuscular mycorrhizae và Rhizobium phát huy được hiệu quả hiệp đồng của nấm rễ và vi khuẩn nốt sần, khi sử dụng tái tạo thảm cỏ có tác dụng làm tăng cường khả năng sinh trưởng phát triển của cây trồng, góp phần cải thiện tính chất đất, đặc biệt tỉ lệ che phủ ở công thức sử dụng VLSH đạt 95,63% cao hơn hẳn so với đối chứng (chỉ đạt 54,6%) nên có tiềm năng ứng dụng để tạo tiểu

cảnh cho các khuôn viên nhỏ hẹp mà đất nghèo dinh dưỡng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alan E. Richardson, José - Miguel Borea, Ann M. McNeill, Claire Prigent - Combaet (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms, *Plant soil*, 321: 305 - 339.
- Alireza Javasolee, Nasser Aliasgharzad, Gholamreza Salehi Jouzani, Mohsen Mardi and Ahmad Asgharzadeh (2011). Interactive effects of Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobial strains on chickpea growth and nutrient content in plant, *African Journal of Biotechnology*, 10(39): 7585 - 7591.
- Bard El - Din S.M.S, and Moawad H (1988). Enhancement of nitrogen fixation in lentil, faba bean, and soybean by dual inoculation with rhizobia and mycorrhizae. *Plant and Soil*, 108: 117 - 124.
- Benthlenfalvay G.J and R.N Ames (1987). Comparison of two methods for quantifying extraradical mycelium of vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51: 834 - 837.
- Brundrett, M.C. (1991). "Mycorrhizas in natural ecosystems". In: Macfayden A., M. Begon and H. Fitter (Eds). *Advances in ecological research*, Academic Press, London, pp. 171 - 313.
- Dighton J. (2009). Mycorrhizae, *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition), pp. 153 - 162.
- Franke M, and Morton J.B (1994). Ontogenetic comparisons of the endomycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions, and phylogenetic hypothesis. *Can. J. Bot.*, 72: 122 - 134.
- Gerdeman J.W, Nicosol T.H (1963). Spore of mycorrhizal Endogone species extracted from soil

- by wet - sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc., 46: 235 - 244.
- Gueye M, Diem H.G and Dommergues Y.R (1987). Variation in N₂ fixation, N and P contents of mycorrhizal *Vigna unguiculata* in relation to the progressive development of extraradical hyphae of *Glomus mosseae*. MIRCEN Journal, 3: 75 - 86.
- Howeler R.H, Sieverding E, Saif S.R (1987). Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. Plant and Soil, 100: 149 - 283.
- Kaur S, and Singh O.S (1988). Response of ricebean to single and combined inoculation with *Rhizobium* and *Glomus* in a P - deficient sterilized soil. Plant and Soil, 112: 293 - 295
- Louis I, and Lim G (1988). Differential response in growth and mycorrhizal colonization of soybean to inoculation with two isolates of *Glomus clarum* in soils of different P availability. Plant and Soil, 112: 37 - 43.
- McGonigle. T. P, M.H. Miller, D.G. Evans, G.L. Fairchild and J.A. Swan (1990b). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol., 115(3): 495-501.
- Mike Amarathus (2001). Biological tool improves establishment, growth, diseases and drought resistance of golf grasses.
- M.A.U. Mridha (2003). Application of Mycorrhizal technology in Plantation Forestry in Bangladesh. The XII World Forestry Congress, Canada.
- Nguyễn Thị Minh (2005). Phân lập và tuyển chọn nấm rễ Arbuscular mycorrhizae để xử lý cho cây trồng. Tạp chí Khoa học đất Việt Nam, 23: 46 - 51.
- Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Thu Hà, Phan Quốc Hưng (2014). Phân lập và tuyển chọn giống Arbuscular mycorrhizae dùng để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật phủ xanh. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 3+4: 49 - 55.
- Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Thu Hà, Phan Quốc Hưng, Nguyễn Tú Điệp, Vũ Thị Xuân Hương (2014). Nghiên cứu xác định các nguyên liệu chính để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật phủ xanh. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 6: 111 - 116.
- Minh Thi Nguyen, Thu Ha Nguyen, Quoc Hung Phan (2014). Research on construct the production processes of biomaterial for covered revegetation. Workshop on: "Effective land, water use in agriculture and protection of rural environment in Viet Nam and Japan". Proceeding, Hanoi, Vietnam. October, 2014.
- Nguyễn Văn Sức, Bùi Quang Xuân, Nguyễn Viết Hiệp, Nguyễn Thị Nga (2005). Nấm rễ nội cộng sinh VAM và quần thể vi sinh vật trong đất trồng bưởi đặc sản Đoan Hùng, Phú Thọ. Tạp chí khoa học đất số, 23: 42 - 46.
- Phillip J.M, Hayman D.S (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans brit Mycol Soc., 55: 158 - 161.
- Yuichi Saeki, Ai Kaneko, Toshiaki Hara, Koutaro Suzuki, Takeo Yamakawa, Minh Thi Nguyen, Yoshitaka Nagatomo, and Shoichiro Akao (2005). Phylogenetic Analysis of Soybean – nodulating Rhizobia Isolated from Alkaline Soils in Vietnam. Journal of Japanese society of Soil science and Plant nutrition, 51(7): 1043-1052.
- Vincent, J.M. (1954). The root - nodule bacteria as factors in clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore district, NSW. I. A survey of "Native" strains. Australian Journal of Agricultural Research, 5(1): 55 - 60.
- Yanjun Guo, Yu Ni and Jianguo Huang (2010). Effects of rhizobium, arbuscular mycorrhiza and lime on nodulation, growth and nutrient uptake of lucerne in acid purplish soil in China, Tropical Grasslands, 44: 109 - 114.
- Zaki Anwar Siddiqui, Mohd. Sayeed Akhtar and Kazuyoshi Futai (2008). Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry, Springer Science.