



SỰ SẢN XUẤT IAA VÀ SIDEROPHORE CỦA CÁC ĐÒNG VI KHUẨN LIÊN HIỆP THỰC VẬT VÀ ẢNH HƯỞNG LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA CÂY BẮP (*Zea mays* L.) TRỒNG TRONG CHẬU

Đặng Thị Ngọc Thanh¹, Nguyễn Thị Xuân My² và Cao Ngọc Điệp²

¹Khoa Sư phạm Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Sài Gòn

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 12/06/2016

Ngày chấp nhận: 22/12/2016

Title:

Indole acetic acid and siderophore production by selected isolates of plant associated bacteria and their effects on growth of maize (*Zea mays* L.) in pot experiments

Từ khóa:

Cây bắp, IAA, siderophore, vi khuẩn thúc đẩy tăng trưởng thực vật, vi khuẩn liên hiệp thực vật

Keywords:

Maize, IAA, siderophores, Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), Plant Associated Bacteria (PAB)

ABSTRACT

Fifty five isolates of bacteria associated with maize were tested for the production of IAA using $Fe-HClO_4$ and $Fe-H_2SO_4$ reagents. The production of IAA in the absence and the presence of 100 mg/L of *trp* was in the range of 0.24 to 9.99 and 0.14 to 12.51 mg/L, respectively. There were 16 isolates showing a remarkable decrease in the production of IAA in the presence of *trp*. Twelve isolates were further assayed for siderophore production on the CAS agar medium according to the method modified by Srivastava et al. (2013) but there was only one of them showing the ability. The length of the changed color edges starting from the borderline between the two media PS and CAS produced by isolate DDN10b changed from 1.30 ± 0.10 cm at 2 DAI to 2.67 ± 0.21 cm at 4 DAI. Effects of 5 potential isolates on plant growth of maize were studied under pots experiments. All isolates demonstrated an increase in shoot length, fresh shoot and root weight, and dry mass of one month old plants compared to the control. The best three were VTN2b (*Bacillus subtilis*), DDN10b (*Burkholderia* sp.) and TDB1 (*Bacillus* sp.) showing effects on dry mass equivalent to 50% NPK treatment or 75% NPK treatment and were suggested for field trials.

TÓM TẮT

Năm mươi lăm dòng vi khuẩn liên hiệp cây bắp đã được kiểm tra sự sản xuất IAA với thuốc thử $Fe-HClO_4$ và $Fe-H_2SO_4$. Lượng IAA đo được là 0,24 – 9,99 mg/L khi không bổ sung *trp* và 0,14 – 12,51 mg/L khi bổ sung 100 mg/L *trp*. Khi có mặt *trp*, có 16 dòng đã biểu hiện sự giảm sản xuất IAA đáng lưu ý. Mười hai dòng đã được tiếp tục khảo sát khả năng sản sinh siderophore trên môi trường thạch CAS theo công thức cải biên bởi Srivastava et al. (2013) nhưng chỉ có một dòng thể hiện khả năng này. Dải chuyển màu do dòng DDN10b tạo ra giữa hai môi trường PS và CAS ở 2 DAI là $1,30 \pm 0,10$ cm và ở 4 DAI là $2,67 \pm 0,21$ cm. Năm dòng tiềm năng đã được nghiên cứu ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của cây bắp trồng trong chậu. Tất cả các dòng đều làm tăng chiều cao, khối lượng thân lá và rễ tươi, khối lượng chất khô của cây một tháng tuổi so với đối chứng. Ba dòng tốt nhất là VTN2b (*Bacillus subtilis*), DDN10b (*Burkholderia* sp.) và TDB1 (*Bacillus* sp.) có tác động trên sinh khối khô tương đương với nghiệm thức 50% hay 75% NPK và đã được đề xuất cho các thử nghiệm ngoài đồng.

Trích dẫn: Đặng Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Thị Xuân My và Cao Ngọc Điệp, 2016. Sự sản xuất IAA và siderophore của các dòng vi khuẩn liên hiệp thực vật và ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của cây bắp (*Zea mays* L.) trồng trong chậu. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 47a: 59-67.

1 GIỚI THIỆU

Ngày nay, người ta đã phát hiện được nhiều loài vi khuẩn liên hiệp thực vật (PAB- Plant Associated Bacteria), bao gồm cả vi khuẩn vùng rễ và vi khuẩn nội sinh, có khả năng cải thiện sự tăng trưởng của thực vật. Chúng có thể ví như các loại phân bón tổng hợp hoặc thuốc trừ sâu, thuốc trừ cỏ nhưng bên cạnh đó lại có thể hỗ trợ cho việc duy trì tính bền vững trong năng suất cây trồng và sự an toàn của môi trường (Singh, 2013). Các cơ chế thúc đẩy tăng trưởng thực vật (PGP-Plant Growth Promoting) một cách trực tiếp gồm có: sự sản xuất hoặc thay đổi nồng độ của các phytohormone, sự cố định đạm sinh học (BNF- Biological Nitrogen Fixation) cộng sinh hoặc không cộng sinh, và sự hòa tan phosphate hay các khoáng chất khác. Cơ chế PGP gián tiếp chính là sự đối kháng sinh học (bioantagonist) hay kiểm soát sinh học (biocontrol), có tác dụng giúp cây chủ hạn chế tác nhân gây bệnh hay cỏ dại thông qua sự sản xuất các kháng sinh, siderophore hay cyanide (Jha *et al.*, 2013). Như vậy, nếu sử dụng các vi khuẩn thúc đẩy tăng trưởng thực vật (PGPB- Plant Growth Promoting Bacteria) làm phân bón thì ngoài tác dụng bổ sung NPK cho cây, sản phẩm còn có tác dụng bổ sung nguồn kích tố thực vật như IAA (indole-3-acetic acid) hay thúc đẩy sự hòa tan các khoáng chất có chứa Ca hoặc Fe nhờ vào các phức chất vòng càng (chelate) như các siderophore ngoại sinh từ vi khuẩn (Hinsinger *et al.*, 2009). Hơn thế, sự cạnh tranh sắt hiệu quả còn giúp cây gia tăng đề kháng với các tác nhân gây bệnh, một đặc tính mà các loại phân bón hóa học khó mà có được.

IAA thường được coi là loại auxin tự nhiên quan trọng nhất trong các phytohormone. Ở thực vật, IAA được sản xuất ở lá non, thân và hạt thông qua các phản ứng decarboxyl hóa và transamin từ tiền chất tryptophan (trp) (Lebuhn và Hartmann, 1993). Tuy vậy, trong những điều kiện không thuận lợi, lượng phytohormone nội sinh do cây tự tổng hợp có thể mất cân đối hoặc không đủ. Khi đó, các kích tố thực vật có nguồn gốc ngoại sinh có thể được sử dụng giúp cân bằng nội tiết của cây, tạo điều kiện cực thuận cho sự tăng trưởng thực vật (Zahir *et al.*, 2000). Các lộ trình phụ thuộc trp đã được phát hiện và nghiên cứu ở thực vật và nhiều vi khuẩn. Có 4 lộ trình chính, được phân loại theo tên của chất trung gian, bao gồm: indole-3-acetamide (IAM), indole-3-pyruvate (IpyA), tryptamine, và indole-3-acetonitrile. Trong đó, lộ trình IAM được cho rằng có liên quan đến các vi khuẩn gây u thực vật, và lộ trình IpyA thường gặp ở các PAB có lợi cho thực vật (Lambrecht *et al.*, 2000). Ngược lại, đối với lộ trình không phụ thuộc trp, mặc dù đã được Prinsen *et al.* (1993) phát hiện

ở *Azospirillum brasilense* song cho đến nay tiền chất cho lộ trình này vẫn chưa được biết đến. Theo Lambrecht *et al.* (2000), đây có thể là một lộ trình nhánh của lộ trình IpyA và được điều hòa ngược (upregulation) thông qua các trình tự tương tác với auxin tương tự như trường hợp của promoter của gene *ipdC* mã hóa cho IpyA đã được biết đến.

Tương tự như cách thức huy động các chất điều hòa sinh trưởng, ngoài khả năng sản xuất và sử dụng các siderophore nội sinh (phytosiderophore), thực vật còn có thể tận dụng các lợi ích mà các siderophore do vi khuẩn sản xuất đem lại. Bacteriosiderophore được cho là có tính cạnh tranh sắt mạnh hơn so với phytosiderophore (Marschner *et al.*, 2010). Các vi khuẩn thuộc Gram âm như *Pseudomonas* và *Enterobacter* và vi khuẩn Gram dương như *Bacillus* và *Rhodococcus* đã được biết đến khả năng sản xuất siderophore (Saharan và Nehra, 2011). Các phương pháp phát hiện định tính và định lượng IAA hoặc siderophore do vi khuẩn sản xuất hiện nay chủ yếu dựa trên phản ứng màu với các loại thuốc thử và phép đo màu thông qua máy đo mật độ quang (optical density - OD) ở bước sóng thích hợp.

Mục tiêu nghiên cứu

Có tổng cộng 54 dòng vi khuẩn cố định đạm và hòa tan calcium orthophosphate liên hiệp với cây bắp trồng trên đất xám của vùng Đông Nam Bộ đã được tuyển chọn và nhận diện (Dang Thi Ngọc Thanh và Cao Ngọc Diệp, 2014a và 2014b). Tuy nhiên, đặc tính sinh tổng hợp IAA của các dòng này đã được khảo nghiệm trên hai loại môi trường nuôi cấy khác nhau: môi trường Burk's không đậm lỏng, không bổ sung tryptophan đối với vi khuẩn đất vùng rễ, và môi trường Burk's không đậm lỏng, có bổ sung 100 mg trp /L đối với vi khuẩn nội sinh. Do vậy, để tiếp tục hoàn thiện việc đánh giá khả năng PGP của các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn, loạt khảo nghiệm này đã được thực hiện với các mục đích: (1) so sánh khả năng sản xuất IAA của các dòng trong điều kiện có hoặc không có trp nhằm tìm ra một giao thức (protocol) chung, (2) xác định khả năng sản xuất siderophore của các dòng nội trội và (3) bước đầu đánh giá khả năng PGP *in vivo* của một số dòng tốt nhất trên cây bắp trồng trong chậu ở giai đoạn 0 – 1 tháng tuổi.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm *in vitro* được thực hiện từ tháng 9 đến tháng 12 năm 2014 và các thí nghiệm trên cây bắp trong chậu được tiến hành từ tháng 1 đến tháng 3 năm 2015. Bố trí thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD- Randomized Complete Design) với 3 lần lặp lại cho các thí

thí nghiệm *in vitro* và 4 lần lặp lại cho các thí nghiệm trong chậu.

2.1 Định lượng IAA *in vitro*

Khảo nghiệm khả năng tổng hợp IAA trên môi trường Burk's không đạm lỏng, không hoặc có bổ sung 100 mg trp/L đã được tiến hành trên 55 dòng PAB, bao gồm 30 dòng vi khuẩn nội sinh và 24 dòng vi khuẩn đất vùng rễ đã được tuyển chọn và công bố (Dang Thi Ngoc Thanh và Cao Ngoc Diep, 2014a và 2014b) cùng với 1 dòng vi khuẩn đất vùng rễ PDN1a hiện đang được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật đất thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Các dòng này có nguồn gốc từ cây bắp và đất vùng rễ cây bắp trồng trên đất xám tại 6 tỉnh thành vùng Đông Nam Bộ và tương đồng trình tự gene 16S rRNA với các PAB đã được báo cáo và lưu trữ dữ liệu trong NCBI ở mức 97% trở lên. Riêng dòng PDN1a, nguồn gốc từ tỉnh Bình Phước, có sự tương đồng trình tự gene 16S rRNA ở mức 99% với *Bacillus subtilis* JND-RSPi-15B (KT894726), một chủng vi khuẩn đất vùng rễ cây đậu triều (*Cajanus cajan*) của Ấn Độ, có khả năng đối kháng sinh học (Dữ liệu chưa công bố).

Đặc tính sản xuất IAA của mỗi dòng được định lượng thông qua phép đo màu theo phương pháp của Gordon và Weber (1951) với thuốc thử Fe-HClO₄ và thuốc thử Fe-H₂SO₄. Chuẩn bị mẫu bằng cách hút 2,5 mL dịch huyền phù của mỗi dòng vi khuẩn đã tiền cấy [mật số đạt khoảng 1 – 2.10⁸ CFU/mL, tương ứng với chuẩn McFarland 0,5 (Sutton, 2011)] đem chủng vào các ống Falcon chứa 25 mL môi trường Burk's không đạm lỏng trong điều kiện không có hoặc có bổ sung 100 mg/L trp. Ủ các ống trong tối, ở nhiệt độ 28 ± 2°C trong vòng 8 ngày. Tại mỗi thời điểm 2, 4, 6, và 8 ngày sau khi chủng (DAI- Days After Inoculation), hút 5 mL dịch nuôi cấy đem ly tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút, rồi thu lấy 1mL dịch vô bào để thực hiện phản ứng với thuốc thử theo tỉ lệ 1:2 với Fe-HClO₄ và tỉ lệ 1:4 với Fe-H₂SO₄. Đường chuẩn từ 0 – 5 mg/L được thực hiện bằng cách pha loãng từ dung dịch chuẩn IAA 100 mg/L. Màu hồng xuất hiện như sự chỉ thị của IAA với thuốc thử. Đo độ hấp phụ quang của mẫu ở bước sóng 530 nm sau khi phối trộn với thuốc thử và ủ trong điều kiện tối 15 phút. Đối chứng âm được thực hiện cùng quy trình với sự thay thế 2,5 mL dịch huyền phù tiền cấy bằng 2,5 mL nước khử ion.

2.2 Khảo sát khả năng sản xuất siderophore *in vitro*

Dựa trên kết quả định lượng các khả năng có định đạm, hòa tan phosphate và tổng hợp IAA

cũng như kết quả định danh thông qua tương đồng trình tự gene 16S rRNA, có 12 dòng trong tổng số 55 dòng PAB đã được tiếp tục lựa chọn để khảo sát định tính khả năng sản sinh siderophore trên môi trường thạch CAS do Srivastava *et al.* (2013) cải biên từ công thức của Schwyn và Neilands (1987). Tiến hành nhỏ 50 µL dịch huyền phù của mỗi dòng vi khuẩn đã tiền cấy 2 ngày trong môi trường PS lỏng (10 g peptone, 20 g sucrose) lên bề mặt thạch đĩa CAS đã hấp tiết trùng. Ủ ở nhiệt độ 28 ± 2°C và quan sát sau 1 đến 2 ngày. Sự xuất hiện khuẩn lạc chứng tỏ dòng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường CAS và sự xuất hiện vòng halo màu tím đến hồng hoặc cam chỉ thị cho sự sản sinh siderophore của vi khuẩn (Machuca và Milagres, 2003). Tiếp tục khảo sát sự sản xuất siderophore của các dòng theo phương pháp cấy ria vào nửa đĩa chứa môi trường dinh dưỡng (PS) trên thạch đĩa PS-CAS (Srivastava *et al.*, 2013). Sự chuyển màu từ màu xanh đặc trưng của nửa thạch CAS sang tím, hồng hoặc cam chỉ thị sự sản sinh siderophore của vi khuẩn. Đo chiều rộng của dải chuyển màu để đánh giá và so sánh khả năng sản xuất siderophore giữa các dòng vi khuẩn.

2.3 Khảo nghiệm đặc tính PGP *in vivo* trên cây bắp trồng trong chậu

Năm trong số 12 dòng vi khuẩn đã qua khảo nghiệm khả năng sinh siderophore được tiếp tục tiến hành khảo nghiệm đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật trên cây bắp giống Wax48 trồng trong chậu. Sự tuyển chọn này dựa trên kết quả xác định đặc tính PGP *in vitro* kết hợp với kết quả định danh qua tương đồng trình tự gene 16S rRNA.

2.3.1 Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn

Mỗi dòng vi khuẩn được tăng sinh trong bình tam giác 250 mL chứa 150 mL môi trường (lỏng) đã sử dụng để phân lập chúng (LGI/NFb đối với các vi khuẩn nội sinh, Burk's không đạm/NBRIP đối với vi khuẩn đất vùng rễ) cho đạt mật số khoảng 1 – 2.10⁸ CFU/mL (chuẩn McFarland 0,5).

2.3.2 Xử lý hạt và chủng vi khuẩn vào hạt nảy mầm

Hạt bắp (giống thương mại Wax48, công ty Syngenta Việt Nam) được tiến hành khử trùng bề mặt với cồn 96%, calcium hypochloride 2% và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Ủ hạt trong đĩa Petri đựng giấy lọc ẩm cho đến khi nảy mầm và ra rễ (1 - 2 mm). Chuyển hạt vào bình chứa dịch khuẩn đã kiểm tra và điều chỉnh mật số tế bào, ủ ở nhiệt độ 28 ± 2°C trong vòng 3 giờ.

2.3.3 Trồng cây trong chậu

Mẫu đất thí nghiệm là đất xám (acrisols) có thành phần cơ giới gồm 88,61% cát, 9,79% thịt và

1,6% sét. Các chỉ tiêu dinh dưỡng khác bao gồm: pH 5,85, chất hữu cơ 1,78%, đạm tổng số 0,14%, lân dễ tiêu 3,87 mg P₂O₅/100g đất, kali hữu hiệu 37,67 mg K₂O/kg đất.

Gieo 3 hạt bắp trong mỗi chậu nhỏ (φ 15 cm) chứa 0,5 L đất. Khi cây con có khoảng 2 – 3 lá thì tỉa bỏ chừa lại 1 cây/chậu. Có 10 nghiệm thức được thực hiện, bao gồm: bắp được chủng vi khuẩn (5 nghiệm thức tương ứng 5 dòng vi khuẩn); bắp không được chủng vi khuẩn nhưng được bón 25%, 50%, 75% hoặc 100% phân khoáng NPK (4 nghiệm thức tương ứng 4 mức phân), và một nghiệm thức đối chứng âm, không bón phân cũng không chủng vi khuẩn (1 nghiệm thức). Mỗi nghiệm thức thực hiện trên 4 chậu tương ứng với 4 lần lặp lại. Bốn mươi chậu được sắp thành 4 hàng, mỗi hàng 10 chậu theo kiểu CRD trên mảnh đất có diện tích khoảng 1.750 m² tại ấp 3, xã Phước Vĩnh An, huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh. Hàng cách hàng 70 cm và chậu cách chậu 25 cm, tương ứng mật độ 57.000 cây/ha (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2001).

Theo Nguyễn Đức Cường (2010), lượng phân hóa học dùng cho 1 hectare bắp trồng trên đất xám hoặc đất bạc màu gồm có 333 – 400 kg phân urea, 935 – 1125 kg phân lân super phosphate và 375 – 450 kg phân kali KCl. Do vậy, lượng dùng cho 0,5 L đất ở liều 100% NPK trong thí nghiệm này bao gồm 0,092 g phân urea (N ≥ 46,3%), 0,258 g phân lân super phosphate (16% P₂O₅) và 0,103 g phân kali KCl (K₂O ≥ 61%). Toàn bộ lượng phân này được bón hết một lần ngay sau khi tỉa bỏ bớt cây trong chậu (7 ngày sau khi gieo).

2.3.4 Chỉ tiêu theo dõi

Đánh giá khả năng PGP của các dòng PAB dựa trên chiều cao cây, chiều dài bộ rễ, diện tích lá, khối lượng tươi của thân lá và khối lượng tươi của rễ, khối lượng chất khô. Số liệu được thu thập khi cây bắp con kết thúc giai đoạn sinh trưởng chậm (khoảng 9 lá, sau 30 ngày gieo hạt).

2.4 Phương pháp phân tích dữ liệu

Các số liệu định lượng được tính toán và kiểm định thống kê bằng phân tích phương sai một nhân tố ở độ tin cậy 95% bằng Microsoft Excel 2010. So sánh các giá trị trung bình bằng kiểm định Duncan nhờ phần mềm thống kê SPSS ver. 16.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng sản xuất IAA *in vitro* của các dòng PAB

Cả 55 dòng PAB đã khảo sát đều có khả năng tổng hợp IAA trong điều kiện có hoặc không có bổ sung 100 mg/L trp. Lượng IAA tính bình quân qua

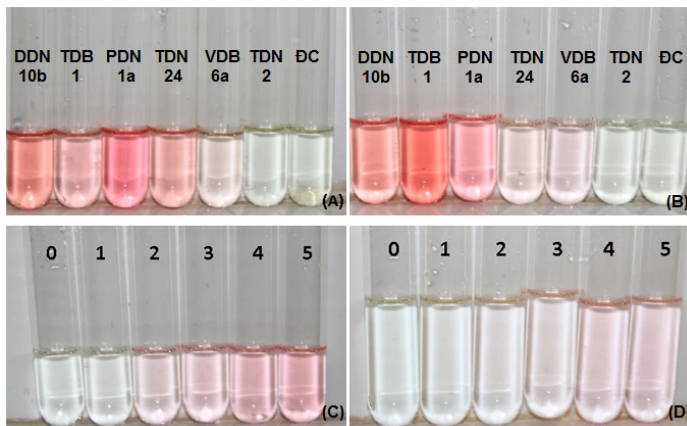
4 đợt đo mẫu dao động từ 0,24 – 9,99 mg/L trong điều kiện không bổ sung trp và dao động từ 0,14 – 12,51 mg/L trong điều kiện có bổ sung trp. Trong đó, có 16 dòng PAB (29,09%) biểu hiện sự giảm lượng IAA bình quân khi bổ sung 100 mg/L trp vào môi trường nuôi cấy so với đối chứng không bổ sung trp. Đối với mỗi dòng, trong cùng một đợt đo mẫu, lượng IAA được tổng hợp ở hai lô thí nghiệm (có hay không có bổ sung trp) cũng có thể thấy sự khác biệt (Hình 1A, 1B) chứng tỏ sự đa dạng trong cơ chế hoạt động sinh tổng hợp IAA phụ thuộc nhiều yếu tố như thành phần môi trường hay thời gian nuôi cấy. Kết quả định lượng IAA của mỗi dòng tại mỗi đợt đo mẫu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức α=5% khi sử dụng thuốc thử Fe-HClO₄ hay Fe-H₂SO₄. Tuy vậy, màu hồng do phản ứng của IAA với thuốc thử Fe-HClO₄ đậm hơn so với thuốc thử Fe-H₂SO₄ ở cùng một nồng độ IAA (giá trị OD 530 nm cũng cao hơn) có thể hữu ích cho các khảo nghiệm định tính ở những mẫu có hàm lượng IAA thấp (Hình 1C, 1D).

Tuy chưa biết rõ về lộ trình không phụ thuộc trp nhưng khả năng tổng hợp IAA của 55 dòng PAB trong nghiên cứu này cũng tương tự như quan sát của Horemans và Vlassak (1985) trên *Azospirillum brasilense*: các vi khuẩn này có khả năng tổng hợp IAA ở mức cao mà không cần bổ sung trp với điều kiện môi trường nuôi cấy phải có sự hiện diện của NH₄⁺ và iều khí. Năm mươi lăm dòng PAB đã tuyển chọn này vốn là những vi khuẩn có khả năng cố định đạm tốt, để có thể phát triển trong môi trường Burk's không đạm, chúng cần phải hoạt hóa cơ chế BNF để chuyển hóa N₂ trong không khí thành NH₄⁺ cung cấp cho các lộ trình biến dưỡng acid amin, trong đó có trp hoặc các tiền chất khác, từ đó hoạt hóa lộ trình IAA.

Lộ trình IAA phụ thuộc trp đã được phát hiện rộng rãi. Hầu hết các nghiên cứu về sự tổng hợp IAA ở các vi khuẩn đều cho thấy có sự gia tăng khả năng sản xuất loại auxin này trong điều kiện nuôi cấy có bổ sung trp. Tuy nhiên, trong một vài nghiên cứu có sự xuất hiện một số ít các dòng vi khuẩn biểu thị sự giảm khả năng sản xuất IAA khi bổ sung trp vào môi trường nuôi cấy so với các đối chứng không bổ sung, ví dụ như nghiên cứu của Ahmad *et al.* (2004) hay của Mohite (2013). Sự giảm sản xuất IAA ở một nồng độ tryptophan nhất định hay một nồng độ IAA nhất định có thể được lý giải theo cơ chế mà Lambrecht *et al.* (2000) đã tổng hợp dựa trên mô hình các vi khuẩn *Azospirillum* sản xuất IAA không phụ thuộc trp mà Prinsen *et al.* (1993), Okon và Vanderleyden (1997) đã phát hiện và nghiên cứu. Gene *ipdC* mã hóa chất trung gian IpyA vốn có promoter chứa

trình tự đáp ứng với auxin AuxRE (auxin-responsive element) và được điều hòa theo kiểu kiểm soát dương tính ngược (positive feedback control): IAA trong môi trường kích thích sản xuất IAA. Tuy nhiên, đồng thời với tăng sản xuất IAA thì các tiền chất IAA (IAA-precursor) ví dụ như trp cũng được tạo ra. Sự điều hòa biến dưỡng trp như

đã biết lại theo kiểu kiểm soát âm tính ngược (negative feedback control). Do vậy, sự giới hạn trong sản xuất IAA đã được xem là kết quả của một sự tương tác phức tạp giữa nhiều yếu tố chưa được biết trong lộ trình nhánh của lộ trình IpyA như các enzyme, các gene,... kể cả nồng độ các tiền chất IAA có trong môi trường.



Hình 1: Phản ứng màu với thuốc thử của một số dòng PAB ở 4 DAI so với đường chuẩn

Phản ứng màu với Fe-HClO₄ trong điều kiện không có (A) hoặc có bổ sung 100 mg/L trp (B);

Đường chuẩn 0 - 2,5 mg/L IAA với Fe-HClO₄ (C) và với Fe-H₂SO₄ (D)

Qua sự khảo sát trở lại khả năng sản xuất IAA của 55 dòng PAB, có 12 dòng được tiếp tục chọn lựa cho việc khảo sát khả năng sản xuất siderophore. Bảng 1 sau đây sẽ trình bày tóm tắt đặc tính PGP *in vitro* của 12 dòng này. Phân hạng các giá trị trung bình được trắc nghiệm riêng theo

hai nhóm đối tượng: vi khuẩn đất vùng rẫy (25 dòng + 1 đối chứng) và vi khuẩn nội sinh (30 dòng + 1 đối chứng). Hai cột giá trị NH₄⁺ và P₂O₅ được trích từ bài báo đã công bố (Dang Thi Ngọc Thanh và Cao Ngọc Diệp, 2014a và 2014b).

Bảng 1: Đặc tính PGP *in vitro* của 12 dòng PAB cây bắp trồng trên đất xám vùng Đông Nam Bộ

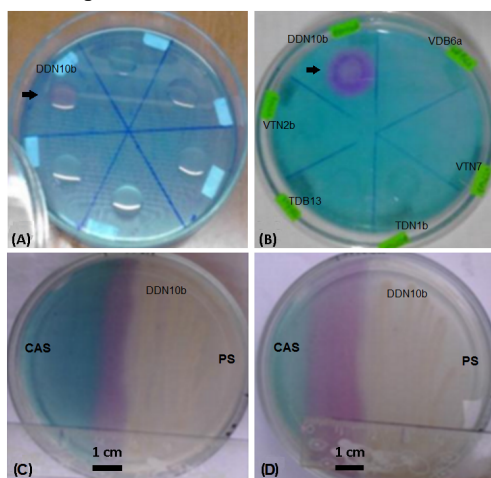
Tên dòng	Nguồn gốc	Lượng NH ₄ ⁺ (mg/L)	Lượng P ₂ O ₅ (mg/L)	Lượng IAA (không trp) (mg/L)	Lượng IAA (bổ sung trp) (mg/L)
PDN1a	Đất vùng rẫy, Bình Phước	0,31 ^l	51,10 ^{hi}	8,28 ^c	6,58 ^c
DDN10b	Đất vùng rẫy, Đồng Nai	0,46 ^f	110,52 ^a	9,63 ^a	12,51 ^a
TDB1	Đất vùng rẫy, Tây Ninh	0,76 ^a	34,76 ^{lm}	3,76 ^g	7,53 ^c
TDN24	Đất vùng rẫy, Tây Ninh	0,65 ^c	43,60 ^k	3,78 ^f	3,68 ^k
TDB13	Đất vùng rẫy, Tây Ninh	0,75 ^a	25,59 ^p	8,77 ^b	9,68 ^b
VDB7b	Đất vùng rẫy, Bà Rịa-Vũng Tàu	0,53 ^e	70,34 ^c	2,52 ^j	7,39 ^c
VDB6a	Đất vùng rẫy, Bà Rịa-Vũng Tàu	0,41 ^g	71,24 ^c	2,25 ^k	5,38 ^g
DTN1b	Thân cây bắp, Đồng Nai	1,37 ^h	58,96 ^k	7,14 ^d	10,98 ^f
TRL6b	Rễ cây bắp, Tây Ninh	0,30 ^{uv}	51,94 ^o	6,89 ^e	14,57 ^a
VTN7	Thân cây bắp, Bà Rịa-Vũng Tàu	1,25 ^j	76,88 ^e	9,64 ^b	5,15 ^o
VTN2b	Thân cây bắp, Bà Rịa-Vũng Tàu	1,44 ^f	88,56 ^a	0,71 ^t	0,96 ^w
HTN1b	Thân cây bắp, TP. Hồ Chí Minh	1,85 ^d	48,83 ^r	0,42 ^u	9,71 ⁱ

3.2 Khả năng sản xuất siderophore *in vitro* của các dòng PGPB

Sắt là một yếu tố tăng trưởng quan trọng cho tất cả các sinh vật sống. Trong điều kiện khan hiếm sắt, một số vi khuẩn, nấm và một số Hòa thảo có khả năng sản xuất siderophore để hình thành phức hợp hòa tan Fe³⁺ từ khoáng sản. Trong 12 dòng

PGPB được khảo sát, chỉ có dòng DDN10b tạo được vòng halo trên môi trường CAS cải biên sau 48 giờ như mô tả của Machuca và Milagres (2003). Các dòng VTN7, TDB13 và DTN1b có khả năng phát triển trên môi trường thạch CAS nhưng không tạo vòng sáng (Hình 2A, 2B). Có một số tác giả cho rằng việc nhỏ trực tiếp dịch huyền phù vi khuẩn lên thạch CAS sẽ khiến vi khuẩn tiếp xúc

trực tiếp với một loại môi trường có tính độc, có thể gây chết đối với một số dòng. Do vậy, phương pháp mà Srivastava *et al.* (2013) đã sử dụng là một hình thức cải biên để khắc phục nhược điểm trên. Vi khuẩn được cấy rìa trên nửa tấm thạch chứa môi trường dinh dưỡng (PS) và siderophore trong sản phẩm tiết (nếu có) sẽ khuếch tán dễ dàng sang nửa tấm thạch CAS kê bên và làm biến đổi màu xanh của chất chỉ thị. Theo phương pháp này, cả 12 dòng được khảo sát đều phát triển tốt trên nửa tấm thạch PS, song chỉ có dòng DDN10b tạo dải đổi màu (từ xanh sang tím) trên nửa tấm thạch CAS. Bề ngang của dải chuyển màu đo được ở 2 DAI là $1,30 \pm 0,10$ cm và ở 4 DAI là $2,67 \pm 0,21$ cm (Hình 2C, 2D). So sánh giá trị này giữa các dòng (nếu có) có thể giúp sơ bộ đánh giá và tuyển các chọn dòng có tiềm năng sản xuất siderophore.



Hình 2: Phản ứng tạo màu của các PAB trên môi trường thạch CAS và thạch PS-CAS

Phản ứng tạo màu với thuốc thử CAS ngay sau khi nhỏ giọt (A) và vòng halo ở 5 DAI (B); Dải chuyển màu của dòng DDN10b trên thạch PS-CAS ở 2 DAI (C) và ở 4 DAI (D)

3.3 Đặc tính PGP *in vivo* của các PAB trên cây bắp trồng trong chậu

Năm dòng PAB có kết quả định lượng đặc tính PGP cao đã được tuyển chọn cho việc đánh giá khả năng PGP trên cây bắp con trồng trong chậu, gồm có dòng DTN1b (tương đồng với *Azotobacter vinelandii*), dòng DDN10b (tương đồng với *Burkholderia* spp.), dòng TDB1 (tương đồng với *Bacillus* sp.), dòng VTN2b (tương đồng với

Bacillus subtilis), và dòng VTN7 (tương đồng với *Enterobacter cloacae*) (Dang Thi Ngoc Thanh và Cao Ngoc Diep, 2014a và 2014b). Riêng dòng TDB13, mặc dù có kết quả cố định đạm và tổng hợp IAA cao nhưng không được tiếp tục khảo sát vì có sự tương đồng cao với vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans*, một loài có khả năng gây bệnh cơ hội cho người. Hiệu quả PGP của 5 dòng đã khảo sát so với các đối chứng chỉ bón phân hóa học thể hiện qua Bảng 2.

Bảng 2 cho thấy có sự gia tăng của chiều cao cây theo sự gia tăng các mức phân bón hóa học, trong khi đó chiều dài bộ rễ lại có khuynh hướng giảm. Mức bón 50% đến 100% NPK cho độ dài bộ rễ thấp nhất, từ 35,9 đến 37,85 cm, không khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha=0,05$. Về tác động của các dòng vi khuẩn, ngoại trừ DTN1b, các dòng còn lại đều làm gia tăng chiều cao cây so với đối chứng âm. Ngược lại, ở nghiệm thức chủng vi khuẩn DTN1b, cây bắp con có bộ rễ phát triển dài nhất: 52,03 cm, gấp 1,23 lần so với đối chứng âm không bón NPK và gấp 1,37 lần so với nghiệm thức bón 100% NPK. Có lẽ sự thiếu dinh dưỡng đã khiến cây phát triển bộ rễ theo chiều dài để vươn tới nguồn dinh dưỡng ở tầng đất sâu hơn.

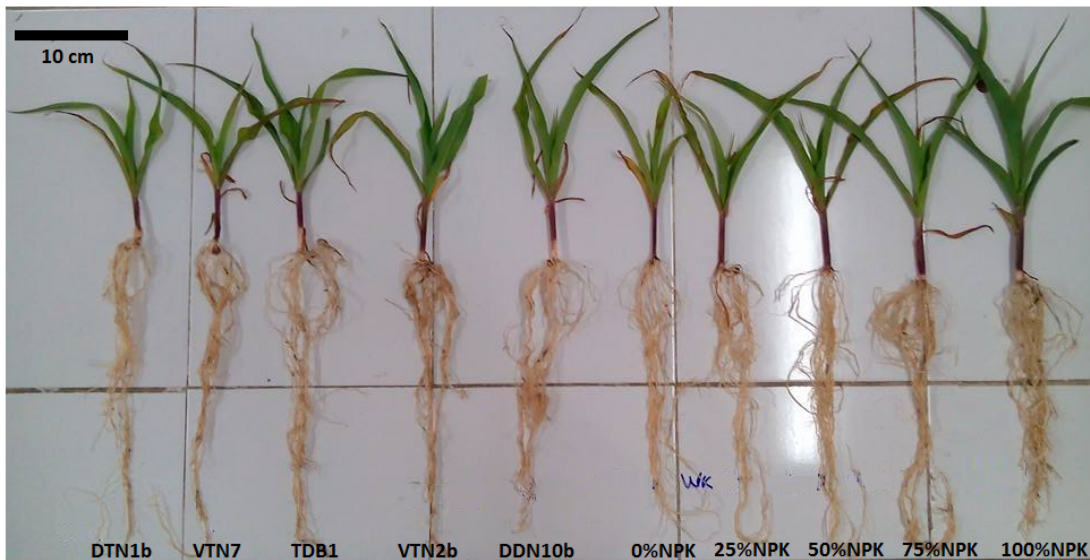
Trong khi hai chỉ tiêu chiều cao cây và chiều dài bộ rễ có hệ số biến thiên (CV - Coefficient of Variation) khá cao, thì diện tích bộ lá khá ổn định với CV khoảng 2%. Tuy vậy, có thể quan sát thấy sự biểu hiện của việc thiếu dinh dưỡng qua màu sắc bộ lá của nghiệm thức đối chứng âm cũng như ở mức bón 25% NPK: lá ngả vàng hơn và ở các lá già có vết xém đỏ do thiếu đạm (Hình 3). Hiện tượng này không được quan sát thấy trên các cây có chủng vi khuẩn chứng tỏ khả năng bù đắp dinh dưỡng cho cây bắp trong giai đoạn 0 – 1 tháng tuổi của các dòng PAB đã tuyển chọn.

Về khối lượng tươi của thân lá và rễ, có thể nhận thấy không một dòng vi khuẩn nào có hiệu quả ngang bằng với mức bón 100% NPK hóa học. Tuy vậy, nếu so sánh với mức bón 75 % NPK, dòng vi khuẩn nội sinh VTN2b cho khối lượng thân lá đạt 115,91% và dòng DDN10b cho hiệu quả đạt 83,76%. Tương tự, trên sinh khối tươi của rễ, việc chủng cho cây bắp với các dòng VTN2b, TDB1 và DDN10b đều cho hiệu quả tốt hơn so với mức bón 75% NPK, tăng từ 7 – 19% so với nghiệm thức này (Hình 4).

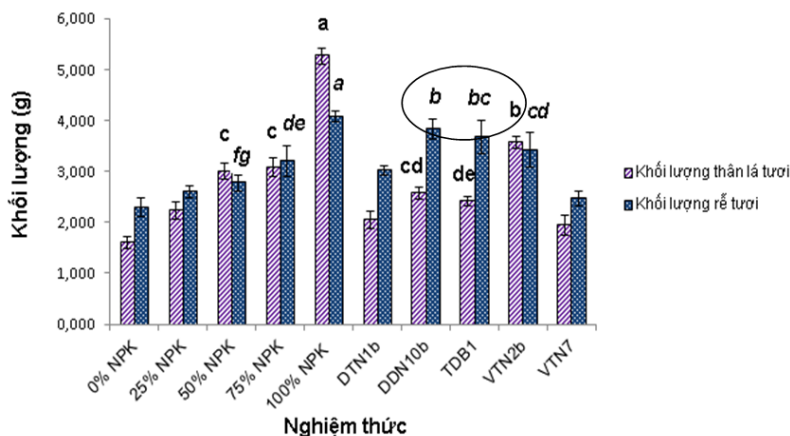
Bảng 2: Tác động các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn và các mức bón phân NPK trên cây bắp trồng trong chậu

Nghiệm thức	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài bộ rễ (cm)	Diện tích lá (cm ²)	Khối lượng thân lá tươi (g)	Khối lượng rễ tươi (g)	Khối lượng chất khô (g)
0% NPK	21,35 ^{de}	42,25 ^{bc}	89,76 ^e	1,61 ^h	2,29 ^h	0,58 ^c
25% NPK	23,45 ^{bcde}	46,55 ^b	152,11 ^d	2,24 ^{ef}	2,61 ^{gh}	0,71 ^d
50% NPK	25,63 ^{bc}	35,90 ^d	166,01 ^c	3,01 ^c	2,78 ^{fg}	0,89 ^c
75% NPK	25,90 ^b	36,10 ^d	167,53 ^c	3,08 ^c	3,20 ^{de}	0,98 ^b
100% NPK	30,93 ^a	37,85 ^d	177,49 ^b	5,27 ^a	4,09 ^a	1,41 ^a
DTN1b	20,83 ^e	52,03 ^a	163,17 ^c	2,05 ^{de}	3,01 ^{ef}	0,71 ^d
DDN10b	22,98 ^{bcde}	35,53 ^d	184,78 ^a	2,58 ^{fg}	3,83 ^b	0,84 ^c
TDB1	22,45 ^{cde}	38,20 ^{cd}	166,18 ^c	2,42 ^{de}	3,67 ^{bc}	0,83 ^c
VTN2b	24,58 ^{bcd}	35,28 ^d	187,92 ^a	3,57 ^b	3,42 ^{cd}	1,01 ^b
VTN7	23,08 ^{bcde}	42,35 ^{bc}	169,11 ^c	1,94 ^g	2,47 ^{gh}	0,66 ^{de}
CV (%)	8,26	7,07	2,35	5,48	6,85	6,55

Ghi chú: Những giá trị trong cùng một chỉ tiêu có mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $\alpha=0,05$



Hình 3: Cây bắp thu được qua 10 nghiệm thức, trong đó cây bắp bón 100% NPK là tốt nhất (bìa phải)

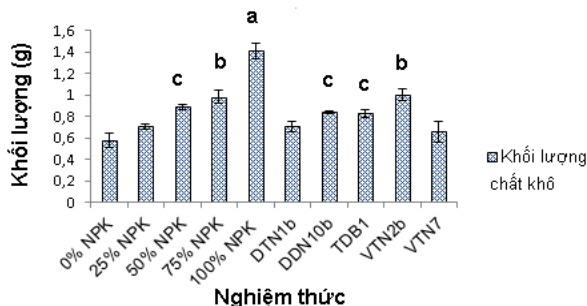


Hình 4: Hiệu quả của các dòng vi khuẩn và các mức phân hóa học trên khối lượng thân lá tươi và khối lượng rễ tươi của cây bắp con trồng trong chậu

Những số trên đầu mỗi cột có cùng một chữ cái không khác biệt về ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Về khối lượng chất khô của cây bắp, dòng VTN2b cho kết quả tốt nhất: 1,01 g, không khác biệt có ý nghĩa ($\alpha=0,05$) so với nghiệm thức bón 75% NPK. Nghiệm thức chủng hạt bắp với dòng

DDN10b và dòng TDB1 cho khối lượng chất khô ngang với mức bón 50% phân hóa học về mặt thống kê (Hình 5).



Hình 5: Hiệu quả của các dòng vi khuẩn và các mức phân hóa học trên khối lượng chất khô của cây bắp con trồng trong chậu

Những số trên đầu mỗi cột có cùng một chữ cái không khác biệt về ý nghĩa thống kê ở mức 5%

So với đối chứng không chủng vi khuẩn và không bón phân hóa học, các dòng VTN2b, DDN10b và TDB1 cho hiệu quả trên lượng chất khô của cây bắp con tăng gấp 1,43 - 1,74 lần. Điều này tương tự như kết quả mà Piromyou và *ctv.* (2011) đã đạt được trên cây bắp con tuổi trồng trong chậu và ngoài đồng, giai đoạn 4 - 5 tuần tuổi. Trong nghiệm thức chủng vi khuẩn SUT 47 ở mật số 10^8 CFU vào hạt, lượng chất khô của rễ và thân lá cây bắp con đã tăng từ 1,41 - 1,65 lần so với đối chứng. Dòng SUT 47 vốn được phân lập từ rễ cây bắp trồng tại Đồng Bắc Thái Lan và đã thể hiện khả năng tổng hợp IAA cũng như ACC-deaminase cao nhất trong tổng số 153 dòng PGP đã được khảo sát.

Các nghiên cứu khác của Lwin và *ctv.* (2012), Szilagy-Zecchin và *ctv.* (2014) về tác động của các vi khuẩn PGP trên sinh khối cây bắp con trồng trong chậu cũng cho thấy sự gia tăng có ý nghĩa về khối lượng chất khô/tươi của rễ, gấp 1,01 - 1,43 lần so với đối chứng. Các chủng tốt nhất đều thể hiện khả năng sản xuất IAA cao. Trong số đó, hai chủng R1 và R3 trong nghiên cứu của Lwin và *ctv.* (2012) còn có khả năng cố định đạm, và hai chủng CNPSo 2480 (*Enterobacter* sp.) và CNPSo 2481 (*Bacillus* sp.) trong nghiên cứu của Szilagy-Zecchin và *ctv.* (2014) ngoài khả năng BNF, còn có thể sản xuất siderophore và các enzyme thủy giải có tác dụng kháng nấm.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Năm mươi lăm dòng vi khuẩn liên hiệp cây bắp đã được khảo sát đều có khả năng tổng hợp IAA trong điều kiện không có hoặc có bổ sung tryptophan. Trong đó, có 39 dòng biểu hiện sự tăng

sản xuất IAA và 16 dòng biểu hiện sự giảm sản xuất IAA khi bổ sung 100 mg/L trp vào môi trường nuôi cấy Burk's không đậm lỏng. Trong 12 dòng được tiếp tục khảo sát khả năng sản sinh siderophore trên môi trường thạch CAS cải biên, chỉ có dòng DDN10b thể hiện khả năng này. Năm dòng có hoạt tính PGP cao đã được tiếp tục thử nghiệm trên cây bắp trồng trong chậu. Tất cả các dòng đều làm gia tăng có ý nghĩa thống kê chiều cao cây, khối lượng thân lá và rễ tươi, khối lượng chất khô so với đối chứng âm và nghiệm thức bón 25% NPK.

4.2 Đề xuất

Ba dòng tốt nhất bao gồm VTN2b, DDN10b và TDB1 có tác động trên sinh khối khô của cây tương đương với mức bón 50 - 75% phân NPK hóa học nên được đề xuất cho các thử nghiệm tiếp theo trên cây bắp canh tác ngoài đồng.

LỜI CẢM ƠN

Các thí nghiệm này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường dành cho nghiên cứu sinh. Tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ và giúp đỡ của Trường Đại học Cần Thơ và Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2005. Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turkish Journal of Biology*. 29: 29-34.
- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2001. *Tuyên tập tiêu chuẩn nông nghiệp Việt Nam. Tập 1, Tiêu chuẩn trồng trọt*. Trung tâm Thông

- tin Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Hà Nội, tr.56.
- Dang Thi Ngoc Thanh, Cao Ngoc Diep, 2014a. Isolation and Identification of Rhizospheric Bacteria in Acrisols of Maize (*Zea mays L.*) in the Eastern of South Vietnam. *American Journal of Life Sciences*. 2(2): 82-89. (doi: 10.11648/j.ajls.20140202.18).
- Dang Thi Ngoc Thanh, Cao Ngoc Diep, 2014b. Isolation, Characterization and Identification of Endophytic Bacteria in Maize (*Zea mays L.*) Cultivated on Acrisols of the Southeast of Vietnam. *American Journal of Life Sciences*. 2(4): 224-233. (doi: 10.11648/j.ajls.20140204.16)
- Gordon, S.A., Weber, R.P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Journal of Plant Physiology*. 26(1): 192-195.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil Journal*. 321: 117-152.
- Horemans, S., Vlassak, K., 1985. Production of indol-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense*. In: Klingmuller, W. (Eds.), *Azospirillum, III: Genetics, Physiology, Ecology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 98-108.
- Jha, P.N., Gupta, G., Jha, P., Mehrotra, R., 2013. Association of Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable Agriculture. *Greener Journal of Agricultural Sciences*. 3(2): 73-84.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek A., Vanderleyden, J., 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*. 8(7): 298-300.
- Lebuhn, M., Hartmann, A., 1993. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. *Journal of Chromatography A*. 629(2): 255-266.
- Lwin, K.M., Myint, M.M., Tar T., Aung W.Z.M., 2012. Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid- IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering Journal*. 16(5): 138-144.
- Machuca, A., Milagres, A.M., 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters In Applied Microbiology*. 36(3): 177-81.
- Marschner, P., Crowley, D., Rengel, Z., 2010. *Soil Solutions for a Changing World*. 19th World Congress of Soil Science, 1 – 6 August 2010, Brisbane, Australia. Published on DVD.
- Mohite, B., 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13(3): 638-649.
- Nguyễn Đức Cường, 2010. *Kỹ thuật trồng ngô*. NXB. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr.74.
- Okon, Y., Vanderleyden, J., 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *American Society for Microbiology News Magazine*. 63: 366-370.
- Piromyong, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology*. 47(1): 44-54.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Onckelen, H., 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a nontryptophan-dependent pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 6: 609-615.
- Saharan, B.S., Nehra, V., 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*. 21: 1-30.
- Singh, J.S., 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria- potential microbes for sustainable agriculture. *Resonance*. 18(3): 275-281.
- Srivastava, M.P., Tiwari, R., Sharma, N., 2013. Effect of different cultural variables on siderophores produced by *Trichoderma* spp. *International Journal of Advanced Research*. 1(7): 1-6.
- Sutton, S., 2011. Determination of Inoculum for Microbiological Testing. *Journal of GXP Compliance*. 15: 49-53.
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C., Galli-Terasawa, L.V., 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays L.*) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*. 4(26). (Published online 7 May 2014, doi: 10.1186/s13568-014-0026-y)
- Zahir, Z.A., Abbas, S.A., Khalid, M., Arshad, M., 2000. Substrate Dependent Microbial Derived Plant Hormones for Improving Growth of Maize Seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 3(2): 239-291.