

Đánh giá tính kháng mặn của *Arabidopsis thaliana* cảm ứng bởi vi khuẩn vùng rễ phân lập tại rừng ngập mặn Cần Giờ

- Ngô Lê Phương Trinh
- Chu Nguyên Thanh
- Hoàng Thị Thanh Minh

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 04 tháng 10 năm 2016, nhận đăng ngày 20 tháng 07 năm 2017)

TÓM TẮT

Nhiễm mặn là một vấn đề lớn đáng quan tâm của nông nghiệp hiện nay và là mối đe dọa được cảnh báo trong bối cảnh biến đổi khí hậu toàn cầu. Vì vậy, những nỗ lực nghiên cứu được triển khai không ngừng nhằm tìm ra giải pháp duy trì sản lượng nông sản dưới điều kiện mặn. Sử dụng vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (Plant growth promoting rhizobacteria-PGPR) là một phương pháp đầy tiềm năng giúp cây chống chịu và duy trì sản lượng ở mức chấp nhận được trong điều kiện mặn. Từ các mẫu rễ thực vật tại rừng ngập mặn Cần Giờ, chúng tôi đã phân lập thành công 15 chủng vi khuẩn vùng rễ trên môi trường chứa 10% NaCl. Để đánh giá hiệu quả kích thích tăng trưởng thực vật, các chủng vi khuẩn được đồng nuôi cấy với *Arabidopsis thaliana* trong điều kiện *in vitro*, chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ nảy mầm và sức sống của cây con.

Từ khóa: *Arabidopsis thaliana*, cố định nitrogen, hòa tan phosphate, tăng tính kháng mặn, stress mặn, vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật

MỞ ĐẦU

Với sự nóng lên toàn cầu, trái đất đang bị đe dọa bởi sự khan hiếm nguồn nước, ô nhiễm môi trường, sự xâm thực nước biển vào đất liền. Hiện tượng mặn hóa gây tác hại nghiêm trọng đến năng suất, sản lượng, chất lượng cây trồng và gây giảm diện tích nông nghiệp. Theo thống kê, gần 6,5 % diện tích đất toàn cầu và khoảng 20 % đất nông nghiệp bị ảnh hưởng bởi quá trình mặn hóa [1]. Tại Việt Nam, đặc biệt là vùng đồng bằng sông Cửu Long, mực nước biển dâng theo từng

Kết quả là ở điều kiện stress mặn (125mM NaCl), 100% vi khuẩn ức chế sự nảy mầm của hạt, tuy nhiên 3 chủng vi khuẩn 02NP01, 04PP02 và 06NS01 lần lượt tương đồng với *Bacillus thuringiensis*, *Vibrio sp.* và *Halomonas elongata* cho thấy hiệu quả tăng cường sức chống chịu mặn của cây con. Ngoài ra, cả 3 chủng này đều có khả năng cố định nitrogen, hòa tan phosphorous vô cơ và sản xuất phytohormone auxin – Indole-3-acetic acid (IAA). Thêm vào đó, dưới điều kiện môi trường bình thường, 02NP01 và 04PP02 cải thiện khả năng nảy mầm của hạt *Arabidopsis thaliana* một cách đáng kể, khi được xử lý vi khuẩn, tỷ lệ nảy mầm tăng lần lượt là 36,60% và 69,76% so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu này cho thấy các chủng vi khuẩn được chọn lọc có thể được sử dụng như một công cụ hiệu quả để làm tăng tính kháng mặn của cây con *Arabidopsis thaliana* trong điều kiện stress mặn.

năm cùng với sự ngăn dòng của các đập thủy điện thượng nguồn sông Mekong làm cho đất bị nhiễm mặn, giảm diện tích đất trồng và ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất cây trồng. Vấn đề mặn hóa đất trồng đặt ra những thách thức không chỉ ở việc chọn giống cây trồng tăng khả năng chống chịu với các điều kiện khắc nghiệt mà còn cải thiện đất trồng thông qua tương tác của rễ thực vật với hệ vi sinh vật trong đất nhiễm mặn [2].

Plant growth promoting rhizobacteria-PGPR là những vi khuẩn vùng đất có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật. Chúng hỗ trợ thực vật hấp thu chất dinh dưỡng, sinh tổng hợp các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, ức chế các tác nhân gây bệnh lên thực vật. Bên cạnh đó, PGPR làm tăng tính kháng mặn của thực vật thông qua khả năng cảm ứng hệ thống chống chịu thực vật (Induced Systemic Tolerance-IST), sản xuất 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, kích thích tăng sự sinh tổng hợp của các enzyme và chất chống oxy hóa để giảm, giải độc các gốc tự do (Reactive oxygen species-ROS), duy trì cân bằng ion ở thực vật [3]. Nhiều kết quả nghiên cứu trên thế giới cho thấy tiềm năng của việc sử dụng vi khuẩn có lợi nhằm kích thích tăng trưởng, tăng tính kháng mặn của cây trồng trên điều kiện mặn. Phát triển trên đất ngập mặn, PGPR ảnh hưởng tích cực lên sự sinh trưởng thực vật với những thông số như tăng sinh khối, diện tích bề mặt hệ thống rễ, tăng tỉ lệ nảy mầm, tăng hàm lượng chlorophyll và tăng tính kháng bệnh [2, 3]. Tuy nhiên, chưa có một công

bổ nào tại Việt Nam về việc phân lập, định danh, khảo sát đặc điểm sinh học và đánh giá khả năng tăng tính kháng mặn lên thực vật của vi khuẩn được phân lập tại rừng ngập mặn Cần Giờ. Vì vậy nghiên cứu này bước đầu đánh giá, chọn lọc một số chủng vi khuẩn có khả năng kích thích tăng trưởng và hỗ trợ *A. thaliana* chống chịu với điều kiện stress mặn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn mẫu phân lập: Mẫu sử dụng để phân lập là rễ cây thu được từ vùng rừng ngập mặn Cần Giờ, Tp. Hồ Chí Minh (thời điểm thu mẫu tháng 3/2016). Nguồn mẫu thực vật: Hạt *A. thaliana* Col-0

Phân lập, làm thuần và bảo quản chủng vi sinh vật

Thu mẫu: Thu nhận toàn bộ rễ cùng với đất bám xung quanh, sau đó, mẫu được chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập. Thông tin về nguồn mẫu phân lập được trình bày như Bảng 1.

Bảng 1. Bảng thông tin về nguồn mẫu

Mã số mẫu	Tên mẫu	Mã số mẫu	Tên mẫu
1	Ô rô (<i>Acanthus jicifolius</i> L.)	6	Sam ở ruộng muối (<i>P. oleracea</i> L.)
2	Ráng (<i>Acrostichum aureum</i> Linn)	7	Mười giờ (<i>Portulaca grandiflora</i>)
3	Sam (<i>Portulaca oleracea</i> L.)	8	Ngoại mộc (<i>Allophylus</i> sp)
4	Sú đỏ (<i>Aegiceras floridum</i>)	9	Trang (<i>Kandelia candel</i>)
5	Xu ôi (<i>Xylocarpus granatum</i>)	10	Dà quánh (<i>Ceriop decandra</i>)

Phân lập và làm thuần: Rửa sơ đất bám quanh rễ, lắc rễ với nước cất vô trùng để thu nhận dịch khuẩn ở vùng xung quanh rễ (rhizosphere-S). Các mẫu rễ này sau đó được cắt thành từng đoạn 4–5 cm, làm sạch bằng nước cất vô trùng, bổ sung dung dịch pepton 1 %, siêu âm (sử dụng máy Delta D68 Ultrasonic Cleaner) trong 5 phút để giải phóng vi khuẩn bám chặt trên bề mặt rễ (rhizoplane-P). Để thu nhận vi khuẩn nội sinh bên trong mô rễ (endosphere-E), rễ được khử trùng bề mặt với ethanol 70 % và javel (1:3), rửa sạch javel, nghiền vô trùng và thu nhận dịch chiết.

Dịch thu nhận từ 3 vùng khác nhau của rễ được trải lên môi trường King B (peptone 20 g/L; K₂HPO₄ 1,5 g/L; MgSO₄.7H₂O 1,5 g/L; glycerol 10 mL/L; có pH=7,2 bổ sung agar 15 g/L) [4] và K7 (glucose 1 g/L, yeast extract 1 g/L, peptone 1 g/L, có pH=7, bổ sung agar 15 g/L) [5] bổ sung 10 % NaCl, với môi trường K7 dịch khuẩn cần được tiệt xử lý nhiệt ở 80 °C trong 10 phút. Các đĩa được nuôi ủ ở 30 °C trong 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc mọc riêng rẽ, làm thuần và bảo quản trong dung dịch chứa 10 % glycerol ở -80 °C.

Sàng lọc những chủng có khả năng tăng cường tính kháng mặn

Đầu tiên, hạt *A. thaliana* được khử trùng bằng lò vi sóng (Sanyo) với công suất tối đa trong vòng 7 phút, chờ nhiệt độ giảm trong 2 phút rồi xử lý lần 2 với công suất tối đa của lò trong 7 phút. Sau đó, 50 hạt đã vô trùng được đặt lên đĩa Petri có chứa bông gòn được làm ẩm bằng 9 mL MS1/5 (Murashighe and Skoog-MS), 125 mM NaCl và 1 mL vi khuẩn tăng sinh qua đêm trên môi trường Nutrient Broth (NB) 5 % NaCl được pha loãng với nước muối sinh lý để đạt $OD_{600nm}=1,0$ (khoảng 10^9 CFU/mL). Sử dụng môi trường tương tự và bổ sung 1 mL nước muối sinh lý để làm đối chứng. Hạt được ủ tối 2 ngày ở 25 °C, sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng 16 giờ mỗi ngày ở cùng điều kiện nhiệt độ. Chọn lọc những chủng khuẩn có tác động tích cực lên sự nảy mầm và tăng trưởng của *A. thaliana* để tiến hành khảo sát các hoạt tính sinh học và định danh. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Khảo sát các hoạt tính sinh học của các chủng tiềm năng

Khả năng sinh IAA: Hàm lượng IAA sản xuất bởi vi khuẩn được xác định nhờ phản ứng màu với thuốc thử Salkowski cải tiến. 10 μ L dịch khuẩn (10^8 CFU/mL) được tăng sinh trong 5 mL môi trường NB 5 % NaCl, có bổ sung 0,1 g/L tryptophane. Sau 5 ngày nuôi cấy lắc ở 30 °C, thu 1 mL dịch khuẩn, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút loại bỏ sinh khối, bổ sung thuốc thử Salkowski cải tiến với tỷ lệ dịch khuẩn: thuốc thử là 1:2. Mẫu đối chứng là môi trường NB 5 % NaCl đã hấp khử trùng. Ủ hỗn hợp trong 1 giờ, phản ứng dương tính sẽ cho màu từ hồng nhạt đến đỏ, đo mật độ quang ở bước sóng 530 nm xác định hàm lượng IAA dựa vào đường chuẩn IAA. [6]

Khả năng cố định đạm: Cấy chủng khuẩn từ môi trường NB 5% NaCl lên môi trường Modified nitrogen-free Hino and Wilson Medium (MNFM), 3% NaCl [7]. Nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Ghi nhận những chủng vi khuẩn có khả

năng hình thành khuẩn lạc, đổi màu môi trường nuôi cấy.

Khả năng hòa tan phosphorus vô cơ: Ly tâm 1mL vi khuẩn thu sinh khối từ môi trường NB 5% NaCl, huyền phù lại trong nước muối sinh lý, sao cho $OD_{600nm} = 0,1$ (khoảng 10^8 CFU/mL). Hút 2 μ L sinh khối vi khuẩn trong nước muối sinh lý cấy thành 3 điểm trên môi trường thạch Pikovskaya (PKV) 3% NaCl, nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Quan sát sự xuất hiện của vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc. Tiến hành đo đường kính khuẩn lạc và vòng phân giải sau 7 ngày nuôi cấy [8]. Chỉ số hòa tan phosphate (SI: Solubilization Index) sau 7 ngày được tính theo công thức:

$$SI = \frac{\text{Đường kính vòng phân giải} - \text{Đường kính khuẩn lạc}}{\text{Đường kính khuẩn lạc}} \quad [9]$$

Khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn: Cấy chuyển các chủng khuẩn được chọn từ môi trường King B hoặc K7 sang môi trường NB lỏng bổ sung NaCl từ 0 đến 20 % NaCl [8, 9]. Quan sát kết quả sau 1–2 ngày nuôi cấy lỏng lắc 150 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng.

Khả năng kích thích nảy mầm trong điều kiện bình thường: Hạt *A. thaliana* đã khử trùng được ngâm trong dịch khuẩn có $OD_{600nm}=0,1$; sau 2 giờ hút sạch dịch khuẩn, cấy hạt lên môi trường thạch 8 g/L agar. Hạt được ủ tối 2 ngày ở 25 °C, sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng 16 giờ mỗi ngày ở cùng điều kiện nhiệt độ.

Định danh

PCR bằng cặp mồi 16S rDNA: Quy trình PCR được thực hiện với 2 cặp mồi liệt kê trong Bảng 2 [10, 11]. Mỗi phản ứng PCR có tổng thể tích 25 μ L bao gồm: 5 μ L dung dịch đệm phản ứng PCR 5X; 1 μ L dNTP 10 mM, 2 μ L primer 10 mM; 0,5 μ L Taq polymerase 2,5 U, khuẩn lạc vi khuẩn, bổ sung nước cất vô trùng cho vừa đủ 25 μ L. Phản ứng PCR gồm các bước: biến tính bước đầu (95 °C/3 phút), 35 chu kỳ lặp lại (95 °C/15 giây, 54 °C/15 giây, 72 °C/1 phút 15 giây) và bước kéo dài cuối cùng (72 °C/5 phút).

Bảng 2. Trình tự primer cho phản ứng PCR gene 16S rDNA

STT	Tên primer	Trình tự primer (5'- 3')
1	516F	TGCCAGCAGCCGCGGTAA
	13R	AGGCCCGGGAACGTATTCAC
2	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	1525R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

Giải trình tự: Sản phẩm PCR sau tinh sạch được gửi đi giải trình tự bằng máy phân tích trình tự nucleotide tự động 3130XL Genetic Analyzer (ABI, Mỹ) tại đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford thuộc bệnh viện Nhiệt Đới. Kết quả giải trình tự được so sánh trên cơ sở dữ liệu NCBI để định danh các chủng vi khuẩn đã phân lập.

Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng chương trình Excel

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn

Nhằm phân lập vi khuẩn có khả năng sống trên môi trường mặn, chúng tôi sử dụng 2 môi trường có độ chọn lọc thấp là KingB và K7, tác nhân chọn lọc chủ yếu là nồng độ muối cao (10 % NaCl) nhằm phân lập các chủng vi khuẩn

có khả năng chống chịu với điều kiện mặn. Môi trường King B được nhiều nhóm tác giả sử dụng với mục tiêu phân lập những vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*, nhờ khả năng phát huỳnh quang của chúng dưới tia UV [4] , với môi trường K7 dịch khuẩn cần được tiệt xử lý nhiệt ở 80 °C trong 10 phút nhằm thu nhận những vi khuẩn có khả năng sinh nội bào tử chịu nhiệt thuộc chi *Bacillus* hay *Paenibacillus*. Từ 10 mẫu rễ của các loài thực vật khác nhau, đã phân lập và làm thuần được 15 chủng vi khuẩn được trình bày như trong Bảng 3. Trong đó có 6 chủng phân lập được từ vùng đất xung quanh rễ, 7 chủng sống ở bề mặt rễ và 2 chủng từ vùng mô bên trong rễ (vi khuẩn nội sinh). Có 11 chủng phân lập được trên môi trường King B và 4 chủng phân lập được trên môi trường K7. Số lượng mẫu thu được không đủ lớn, do đó, chúng tôi không tiến hành đánh giá độ đa dạng của vi sinh vật vùng rễ thu được từ mẫu.

Bảng 3. Nguồn gốc và kí hiệu các chủng vi khuẩn phân lập được trên hai loại môi trường King B 10 % NaCl và K7 10 % NaCl

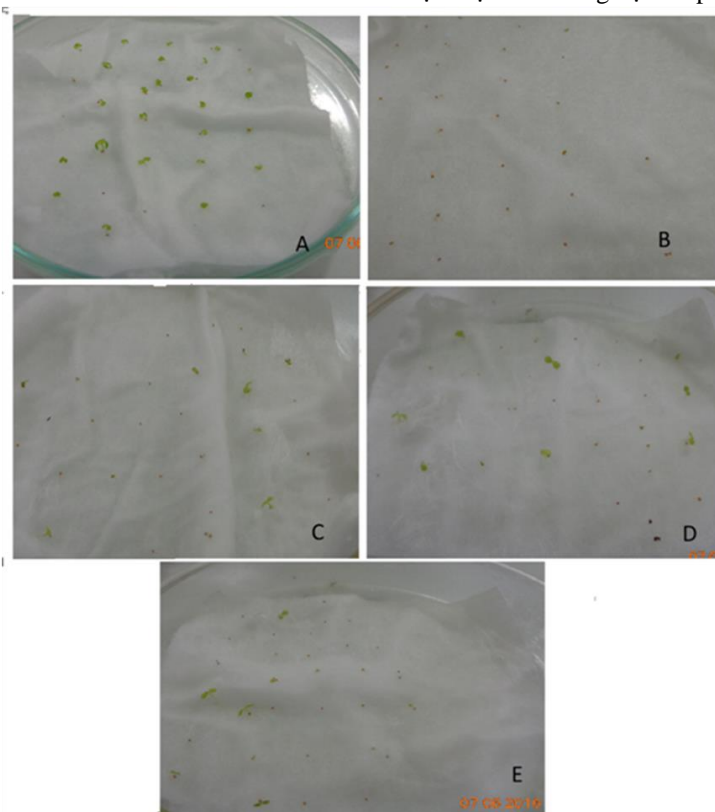
STT	Mã số mẫu	Kí hiệu chủng	
		King B, 10 % NaCl	K7, 10 % NaCl
1	01	01NS01	
		01NS03	
2	02	02NP01	
3	03	03NP01	03PS01
		03NP02	
4	04	04NS01	04PP01
			04PP02
5	06	06NS01	06PE01
		06NS08	
6	07	07NS05	
7	08	08NE02	
8	09	09NS01	
10	05, 10		

(Trong đó các kí hiệu P (positive), N (negative) là những mẫu được và không được xử lý nhiệt; S (rhizosphere), P (rhizoplane), E (endosphere) chỉ vị trí phân lập vi khuẩn).

Sàng lọc những chủng có khả năng tăng cường tính kháng mặn ở *Arabidopsis*

Trong điều kiện stress mặn (125 mM NaCl), tỉ lệ nảy mầm giảm đến 40 % và mất 5 ngày để phá vỡ miên trạng, tỷ lệ nảy mầm cao nhất đạt 60 % sau 14 ngày. Sau khi ra lá mầm, cây con ngừng tăng trưởng, đi vào giai đoạn hoàng hóa và chết ở ngày thứ 20 sau khi gieo hạt trên môi trường MS1/5 với 125 mM NaCl. Trong khi đó, trên môi trường bình thường tỷ lệ nảy mầm đạt tối đa 90 % chỉ sau 2 ngày. Cây con tăng trưởng, phát triển tốt. Toàn bộ 15 chủng vi khuẩn thu nhận từ thí nghiệm trên được đồng nuôi cấy với *A. thaliana* trên môi trường MS 1/5 chứa 125 mM NaCl. Mục đích của thí nghiệm là chọn lọc ra các chủng vi khuẩn có khả năng cải thiện tỉ lệ nảy mầm hoặc tăng cường sức sống của cây con trong điều kiện stress mặn. Kết quả thí nghiệm cho thấy, 100 % các chủng vi khuẩn được sử dụng không thể cải thiện tỉ lệ nảy mầm

của hạt, thậm chí còn làm giảm đáng kể tỉ lệ nảy mầm so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Khi đồng nuôi cấy vi khuẩn với hạt *A. thaliana* trên điều kiện mặn dẫn đến tỉ lệ nảy mầm giảm, nhưng sức sống của cây con trong điều kiện stress được cải thiện. Kết quả thí nghiệm cho thấy 3 chủng vi khuẩn 02NP01, 04PP02, 06NS01 có những ảnh hưởng tích cực lên sự tăng trưởng thực vật trong điều kiện stress như thể hiện trong Hình 1. Trong khi đó, ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn, hạt nảy mầm nhiều hơn nhưng hầu hết không phát triển thành cây con hoàn thiện. Kết quả cho thấy tỉ lệ hạt phát triển thành cây con hoàn thiện của hạt khi đồng nuôi cấy với 3 chủng vi khuẩn 02NP01, 04PP02 và 06NS01 lần lượt là 46,08 %; 34,44 % và 43,63 % so với đối chứng. Từ kết quả thí nghiệm trên, chúng tôi chọn lọc được 3 chủng vi khuẩn là 02NP01, 04PP02 và 06NS01 để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.



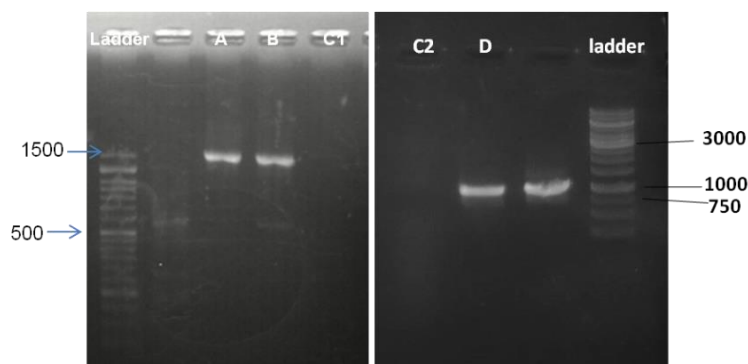
Hình 1. Ảnh hưởng của vi khuẩn lên khả năng tăng trưởng của *Arabidopsis* trên môi trường mặn

Hạt *Arabidopsis* phát triển trên (A) Môi trường MS1/5; (B) Môi trường MS1/5 125 mM NaCl; (C), (D), (E) đồng nuôi cây với chủng 02NP01, 04PP02, 06NS01 trên môi trường MS1/5 125 mM NaCl.

Định danh

Hình 2 ghi nhận kết quả điện di sản phẩm PCR thu nhận đoạn trình tự 16S rDNA của 3 chủng khuẩn cho thấy, với cặp mồi 16S rDNA 27F và 1525R khuếch đại toàn bộ trình tự 16S

rDNA nên sản phẩm PCR thu được từ chủng 02NP01 và 06NS01 có kích thước gần 1500 bp. Cặp mồi 516F và 13R sử dụng trong phản ứng PCR cho chủng 04PP02 chỉ khuếch đại đoạn trình tự có kích thước khoảng 850 bp gần như tương ứng với kích thước nhìn thấy được trên bản điện di. Ở chứng âm, không quan sát thấy bất kì vạch DNA ngoại lai nào, do đó có thể đưa ra kết luận rằng các sản phẩm PCR thu nhận được là đúng đối tượng và trình tự mục tiêu.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với các cặp mồi rDNA. (A), (B), (D) kết quả điện di của lần lượt các chủng 02NP01, 06NS01 được khuếch đại với cặp mồi 27F và 1525R, 04PP02 được khuếch đại với cặp mồi 516F và 13R (C1), (C2) chứng âm

Vùng 16S rDNA được giải trình tự và so sánh tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gene NCBI bằng công cụ BLAST được trình bày tại Bảng 4. Kết quả giải trình tự 16S rDNA cho thấy chủng vi khuẩn 02NP01 là *Bacillus thuringiensis*, 06NS01 là *Halomonas elongata* và chủng 04PP02 thuộc chi *Vibrio*. Do kết quả khuếch đại và giải trình tự 16S rDNA của chủng 04PP02 chỉ khoảng 850 bp nên thí nghiệm chưa thể vẽ sơ đồ cây phát sinh để định danh tới loài. Bên cạnh đó, kết quả thử nghiệm một số đặc điểm sinh hóa cơ bản của các chủng vi khuẩn cũng củng cố cho kết quả định danh từ trình tự 16S rDNA. Chi *Bacillus* gồm các vi khuẩn Gram dương, hình que, sinh catalase. Các thành viên thuộc chi *Halomonas* có khả năng chịu muối cao (từ 5–20 % NaCl), hình que, Gram âm và có hoạt

tính catalase. *Vibrio* là chi vi khuẩn thường được tìm thấy trong môi trường nước mặn, dương tính trong thử nghiệm catalase và tất cả thành viên thuộc chi này đều có khả năng di động. Hiện nay, một số loài thuộc các chi *Vibrio* được kiểm soát nghiêm ngặt trong thực phẩm là *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus*. Chưa có báo cáo nào cho thấy các loài này có khả năng tăng trưởng ở nồng độ muối lên đến 10 %. Trong khi đó, các chủng vi khuẩn của chúng tôi được phân lập trên môi trường chứa 10 % muối và thậm chí có thể phát triển tốt ở những nồng độ muối cao hơn. Tuy nhiên, 3 chủng này cần được đánh giá kỹ hơn về mức độ an toàn và khảo sát khả năng hỗ trợ tăng kháng mặn trên cây trồng trước khi áp dụng chúng trong thực hành nông nghiệp.

Bảng 4. Kết quả giải trình tự các chủng phân lập được

Chủng	Max Score	E-Value	Identify	Accession	Kết luận
02NP01	1821	0.00	99 %	KY003095.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>
04PP02	965	0.00	100 %	EU179263.1	<i>Vibrio</i> sp. SRB-6-17
06NS01	1746	0.00	99 %	KT164596.1	<i>Halomonas elongata</i>

Các nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh nhiều chủng vi khuẩn thuộc 3 chi *Bacillus*, *Vibrio* và *Halomonas* có khả năng sinh tổng hợp IAA, hòa tan phosphorous, sản xuất ACC deaminase hoặc cảm ứng tăng tính chống chịu của thực vật trong điều kiện mặn. [14-18]

Khảo sát hoạt tính sinh học của các chủng tiềm năng

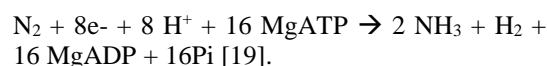
Khả năng tổng hợp IAA

Cả 3 chủng được khảo sát trên môi trường NB, 5 % NaCl bổ sung 0,1 g/L tryptophane đều cho thấy khả năng sản xuất IAA với các hàm lượng khác nhau. Dựa trên phản ứng màu, 2 chủng 04PP01 (thuộc chi *Vibrio*) và 06NS01 (tương ứng *Halomonas elongata*) tổng hợp IAA khá yếu, phản ứng màu giữa dịch nuôi cấy có sự khác biệt về màu sắc không lớn so với đối chứng trong khi đó 02NP01 (tương ứng *Bacillus thuringiensis*) có khả năng sản xuất IAA tương đối mạnh ($64,36 \pm 1,93 \mu\text{g/mL}$), với màu hồng đậm được quan sát thấy trong phản ứng màu với thuốc thử. IAA được sản xuất từ 2 chủng 04PP02 ($3,73 \pm 1,24 \mu\text{g/mL}$) và 06NS01 ($3,18 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$) là tương đối thấp, tuy nhiên nếu quá trình tổng hợp diễn ra liên tục trong suốt thời gian đồng nuôi cấy với thực vật thì vẫn đủ để gây ra tác động nhất định đối với sự tăng trưởng. Lượng IAA ngoại sinh này có thể tác động lên tăng trưởng rễ thông qua kích thích kéo dài tế bào và làm giảm hàm lượng ethylene.

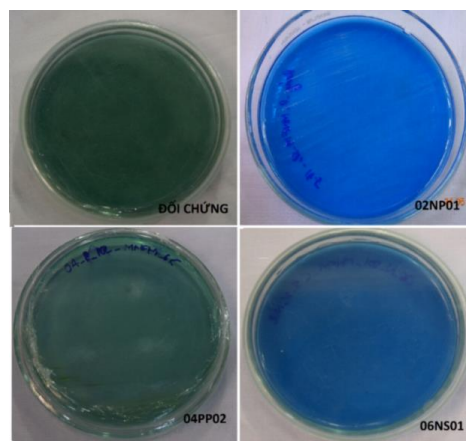
Cố định nitrogen

Khả năng cố định đạm được phát hiện thông qua sự tăng trưởng của các chủng trên môi trường vô đạm. Sự hình thành khuẩn lạc trên môi trường vô đạm chứng tỏ các chủng vi khuẩn này có khả năng sử dụng nguồn N không khí cho các quá trình của tế bào. Cả 3 chủng được khảo sát đều có

khả năng hình thành khuẩn lạc trên môi trường sau 3 ngày nuôi cấy (Hình 3). Trong đó, hai chủng 02NP01 và 06NS01 làm đổi màu chỉ thị bromothymol blue trong khi chủng 04PP02 lại không làm đổi màu. Nguyên nhân gây đổi màu môi trường là do pH môi trường tăng nhờ sự tiết NH_3 hoặc các sản phẩm có tính kiềm khác vào trong môi trường. Bromothymol blue là một chất chỉ thị pH, có màu xanh lá ở pH trung tính và chuyển sang xanh dương khi môi trường bị kiềm hóa. Nitrogenase là phức hợp metalloenzyme, hiện diện ở các vi khuẩn có khả năng cố định đạm, xúc tác phản ứng khử sinh học biến đổi dinitrogen thành ammoniac:



Khả năng cố định đạm giúp vi khuẩn tăng khả năng sống sót trên điều kiện môi trường với hàm lượng khoáng nitrogen thấp [20]. Sự tiết ammoniac hoặc các hợp chất amine từ vi khuẩn có thể được hấp thu bởi thực vật và do đó trong trường hợp này vi khuẩn đóng vai trò như phân bón sinh học tăng cường lượng nitrogen trong thực vật



Hình 3. Sự hình thành khuẩn lạc trên môi trường vô đạm của các chủng vi khuẩn

Hòa tan phosphorus vô cơ

Phương pháp xác định chỉ số hòa tan (SI) được sử dụng trong phòng thí nghiệm để chọn lọc và đánh giá sơ bộ khả năng phân giải phosphorus vô cơ của các chủng vi khuẩn. Việc phân giải phosphorus được nhận biết bằng sự hình thành vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc. Kết quả về chỉ số SI của 3 chủng vi khuẩn được trình bày ở Bảng 5. Tất cả các chủng khảo sát đều có khả năng hòa tan phosphorus. Tuy nhiên, sau 7 ngày nuôi cấy vòng phân giải được hình thành bởi 2

chủng 04PP02 và 06NS01 là khá nhỏ và không rõ ràng. Chủng 02NP01 cho thấy hiệu quả hòa tan phosphorus với vòng phân giải lớn và khá rõ.

Thực vật không thể hấp thụ được phosphorus ở dạng không tan, vi khuẩn với khả năng hòa tan phosphorus vô cơ giúp tăng khả năng hấp thụ phosphorus và tạo điều kiện thuận lợi cho sự tăng trưởng thực vật. Cả 3 chủng được sát khảo thông qua sự xuất hiện của vòng phân giải đều cho thấy khả năng hòa tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ trong môi trường PKV, 3 % NaCl.

Bảng 5. Chỉ số SI của 3 chủng vi khuẩn được khảo sát

STT	Tên chủng	Đường kính khuẩn lạc	Đường kính vòng phân giải	Chỉ số SI
1	02NP01	3,17±0,41	7,17±0,75	2,27±0,25
2	04PP02	4,00±0,00	5,83±0,41	1,45±0,10
3	06NS01	7,33±0,52	9,00±0,00	1,23±0,08

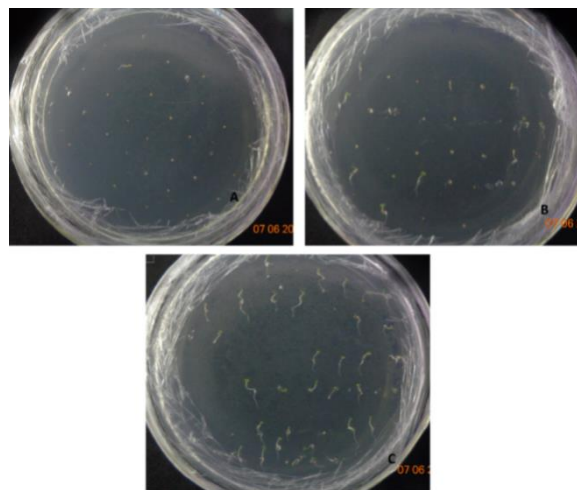
Khả năng chịu mặn của các chủng trên môi trường NB

Trong 3 chủng được khảo sát, chủng 02NP01 chỉ có khả năng sống trong môi trường với nồng độ muối từ 5 %, trong khi đó chủng 04PP02, 06NS01 có khả năng tăng trưởng ở môi trường có nồng độ muối tương ứng là 14 % và 18 %. Đáng ngạc nhiên là các chủng này đều được phân lập trên môi trường chứa 10 % NaCl, song trong thí nghiệm này chủng 02NP01 cho thấy khả năng chịu mặn chỉ ở mức từ 5 %. Kết quả này cho thấy các thành phần khác hay trạng thái (rắn, lỏng) khác nhau của môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng đến khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn trên duy trì các hoạt tính sinh học nhất định như sản xuất IAA, cố định nitrogen hay hòa tan phosphorus vô cơ trong môi trường có nồng độ NaCl từ 3–5 %.

Khả năng kích thích nảy mầm trong điều kiện thường

Thí nghiệm này được tiến hành trên lô hạt *A. thaliana* với khả năng nảy mầm kém hơn bình thường, do quá trình bảo quản hạt *A. thaliana* không đúng cách. Kết quả quan sát được sau 4

ngày cho thấy, khi đồng nuôi cấy với 2 chủng 02NP01 và 04NP02, tỷ lệ nảy mầm được cải thiện đáng kể so với đối chứng như trong Hình 4. Tỷ lệ nảy mầm trong nghiệm thức xử lý với 02NP01 và 04PP02 lần lượt là 48,34 % và 79,35 % trong khi đối chứng tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt 10,74 %.



Hình 4. Ảnh hưởng của vi khuẩn lên sự nảy mầm và sinh trưởng của *Arabidopsis* trên môi trường agar. (A), Đối chứng; (B), (C) đồng nuôi cấy với các chủng 02NP01 và 04PP02

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tuyển chọn được chủng 02NP01 tương đồng với *Bacillus thuringiensis*, 06NS01 có kết quả tương đồng với *Halomonas elongate* và 04PP02 tương đồng với *Vibrio* có khả năng tăng tính kháng mặn của cây con *A. thaliana* trong điều kiện *in vitro*. Cả 3 chủng vi khuẩn đều có khả năng chịu mặn ở nồng độ muối cao từ 5–18 % và sinh tổng hợp hormone sinh

trưởng thực vật IAA, cố định nitrogen và hòa tan phosphorus. Nghiên cứu này chỉ bước đầu đánh giá tiềm năng các chủng vi khuẩn trong tăng tính chống chịu mặn trên *A. thaliana*, và là tiền đề cơ bản cho những nghiên cứu tiếp theo. Các chủng vi khuẩn được phân lập sẽ được đánh giá khả năng tăng tính kháng mặn trên cây trồng nông nghiệp, trên đồng ruộng cũng như đánh giá mức độ rủi ro trước khi thực hành nông nghiệp.

Evaluating the salt resistance of *Arabidopsis thaliana* induced by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from Can Gio mangrove forest

- **Ngo Le Phuong Trinh**
- **Chu Nguyen Thanh**
- **Hoang Thi Thanh Minh**

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

As soil salinization is a major concern of modern agriculture and an expected threat in climate change scenarios, special effort will be required for maintaining crop production under salt stress. The use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) is a promising agricultural practice to help less salt tolerant crops to maintain an acceptable level of productivity under higher salt concentrations. Here, we have isolated the PGPR from the rhizosphere soil in Can Gio Mangrove Forest, Vietnam. Fifteen isolates of bacteria were successfully isolated on medium containing 10 % NaCl. Subsequently, to investigate the effects of PGPR isolates on the growth of *Arabidopsis thaliana*, seeds were treated with the PGPR and observed the germination as well as the seedling growth. Under stress condition, all bacteria inhibited the

germination, however, 02NP01, 04PP02 and 06NS01, identified as *Bacillus thuringiensis*, *Vibrio* and *Halomonas elongata*, respectively, could promote *Arabidopsis thaliana* seedling growth compared to the control. Further analysis found that three bacteria exhibited the ability to fix nitrogen, solubilize inorganic phosphorus and produce phytohormone-auxin. In addition, under normal condition, *Bacillus* and *Vibrio* significantly increased *A. thaliana* germination, after treatment with *Bacillus* and *Vibrio* the seed germination rate increased by 36.60 % and 69.76 % respectively compared to the control. Our research shows that isolated potential rhizobacterial strains may be used as an effective tool for enhancing *Arabidopsis thaliana* seedling growth under salinity stress.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, nitrogen fixation, phosphate solubilization, PGPR, salinity tolerance

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P. Das, K.K. Nutan, S.L. Singla-pareek, A.Pareek, Understanding salinity responses and adopting ‘ omics-based ’ approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice, *J. Frontiers in Plant Science*, 6, 1–16 (2015).
- [2]. P. Shrivastava, R. Kumar, Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation, *Saudi J. Biol. Sci.*, 22, 2, 123–131 (2015).
- [3]. J. Yang, J.W. Kloepper, C.M. Ryu, Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress, *Trends Plant Sci.*, 14, 1, 1–4(2009).
- [4]. V. Lakshmi, S. Kumari, A. Singh, and C. Prabha, Isolation and characterization of deleterious *Pseudomonas aeruginosa* KC1 from rhizospheric soils and its interaction with weed seedlings, *J. King Saud Univ. - Sci.*, 27, 2, 113–119 (2015).
- [5]. C. S. Franco, Isolation of rhizobacteria from salt tolerant plant species and evaluation of their plant growth-promotion, PhD Thesis Institute for Applied Microbiology, Justus-Liebig-University Gießen, Germany (2015).
- [6]. M.A. Gururani, C.P. Upadhyaya, V. Baskar, J. Venkatesh, A. Nookaraju, S.W. Park, Plant growth-promoting *Rhizobacteria* enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-Scavenging enzymes and improved photosynthetic performance, *J. Plant Growth Regul.*, 32, 2, 245–258 (2013).
- [7]. S.F. Wright, R.W. Weaver, Enumeration and Identification of nitrogen-fixing bacteria from forage grass roots enumeration and identification of nitrogen-fixing bacteria from forage grass roots, *Applied and Environment Microbiology*, 42, 1, 97–101 (1981).
- [8]. T. Damodaran, V. Sah, R.B. Rai, D.K. Sharma, V.K. Mishra, S.K. Jha, and R.Kannan, Isolation of salt tolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomato under sodic environment, *African J. Microbiol. Res.*, 7, 44, 5082–5089 (2013).
- [9]. H. Rodríguez, R. Fraga, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion., *Biotechnol. Adv.*, 17, 4–5, 319–339 (1999).
- [10]. P.S. Shukla, P.K. Agarwal, B. Jha, Improved salinity tolerance of *Arachis hypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria, *J. Plant Growth Regul.*, 31, 2, 195–206 (2012).
- [11]. W. Nakbanpote, N. Panitlurtumpai, A. Sangdee, N. Sakulpone, P. Sirisom, and A. Pimthong, Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil : identification and effect on rice under saline conditions, *J. Plant Interact*, 9, 1–9 (2013).
- [12]. B. Wawrik, L. Kerkhof, G. J. Zylstra, J. Jerome, and J. J. Kukor, Identification of unique type ii polyketide synthase genes in soil identification of unique type II polyketide synthase genes in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 5, 2232–2238 (2005).
- [13]. K. Nagashima, T. Hisada, M. Sato, J. Mochizuki, Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces, *Society*, 69, 2, 1251–1262 (2000).

- [14]. M. A. Siddikee, B.R. Glick, P.S. Chauhan, W. jong Yim, T. Sa, Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity, *Plant Physiol. Biochem.*, 49, 4, 427–434 (2011).
- [15]. F. F. Lafi, J. S. Ramirez-prado, I. Alam, V. B. Bajic, H. Hirt, and M. M. Saad, Draft Genome sequence of *Halomonas elongata* strain K4, an endophytic growth-promoting bacterium enhancing salinity tolerance In *Planta, American Society for Microbiology*, 4, 6, 1–2 (2016).
- [16]. C.K. Gutierrez, G.Y. Matsui, E. Lincoln, C. R. Lovell, Production of the phytohormone indole-3-acetic acid by estuarine species of the genus vibrio, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 8, 2253–2258 (2009).
- [17]. B. Jha, I. Gontia, A. Hartmann, The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential, *Plant Soil*, 356, 1–2, 265–277 (2012).
- [18]. B. Ali , S. Hasnain, Potential of bacterial indoleacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture, *Lett. Appl. Microbiol.*, 45, 2, 128–133 (2007).
- [19]. R. Dixon, D. Kahn, Genetic regulation of biological nitrogen fixation, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 8, 621–631 (2004).
- [20]. A.R. Podile, K. Kishore, Plant growth-promoting rhizobacteria, *Plant-Associated Bact.*, 195–230 (2006).