

Đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng thực vật của hai chủng *Pseudomonas* phân lập từ vùng rễ cây bắp

Chu Nguyên Thanh, Nguyễn Yến Nhi, Đào Ngọc Điệp, Trần Thị Hoài Bảo,
Hoàng Thị Thanh Minh, Bùi Văn Lê

Tóm tắt—Vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (Plant growth promoting rhizobacteria – PGPR) là những vi khuẩn phân bố tự do trong đất, trên bề mặt rễ hoặc cộng sinh bên trong rễ, có khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật và ức chế bệnh thực vật. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá tiềm năng kích thích sự tăng trưởng thực vật của 2 chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*. Các thử nghiệm *in vitro* cho thấy cả 2 chủng đều có khả năng cố định N, hòa tan P, sản sinh phytohormone (IAA và GAs), cải thiện tỉ lệ nảy mầm và các thông số tăng trưởng của *Arabidopsis thaliana*. Trong điều kiện nhà lưới, các thông số tăng trưởng của cây bắp khi được xử lý vi khuẩn (trọng lượng tươi của chồi, trọng lượng khô của rễ, hàm lượng chlorophyll) cũng gia tăng có ý nghĩa so với cây đối chứng không xử lý vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu chứng tỏ 2 chủng vi khuẩn được khảo sát là những chủng vi khuẩn có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật, cho thấy tiềm năng của chúng trong thực hành nông nghiệp bền vững.

Từ khóa—*Arabidopsis thaliana*, cây bắp, cố định N, hòa tan P, sản sinh phytohormone, PGPR, *Pseudomonas*

1 GIỚI THIỆU

Trong quá trình canh tác hiện đại, việc sử dụng quá mức phân bón hóa học, đặc biệt là nitrogen và phosphorus, dẫn tới tình trạng ô nhiễm đất, không khí và nước. Bên cạnh đó, việc sản xuất phân bón hoá học góp phần làm cạn kiệt các nguồn tài nguyên không tái sinh như dầu mỏ và khí tự nhiên (được sử dụng để sản xuất phân bón) và gây

ra những mối nguy hiểm cho con người và môi trường [1]. Do đó, việc nghiên cứu tìm ra những giải pháp thay thế và vẫn duy trì sản lượng nông sản, thân thiện với môi trường là vấn đề cấp bách. Vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (Plant Growth Promoting Rhizobacteria – PGPR) là nhóm vi khuẩn cư trú ở vùng rễ và có khả năng ảnh hưởng tích cực đến sự tăng trưởng của thực vật. Những vi khuẩn này tham gia vào các hoạt động của hệ sinh thái đất góp phần giúp hệ sinh thái trở nên năng động để chuyển hóa chất dinh dưỡng trong sản xuất nông nghiệp. Nhiều nghiên cứu cho thấy PGPR là một giải pháp tiềm năng thay thế hóa chất nông nghiệp (phân bón và thuốc bảo vệ thực vật) trong việc kích thích sự tăng trưởng của cây trồng. PGPR kích thích sự phát triển của thực vật liên quan đến sự hình thành cấu trúc của đất, phân hủy chất hữu cơ, tái chế các nguyên tố thiết yếu, hòa tan các chất dinh dưỡng khoáng, sản sinh các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, phân huỷ các chất ô nhiễm hữu cơ, kích thích sự phát triển của rễ, kiểm soát sinh học đất và các mầm bệnh hại cây trồng, kích hoạt các cơ chế kháng stress phi sinh học (kháng hạn, kháng mặn, chống chịu nhiệt độ thấp, chống chịu với các kim loại nặng và các chất ô nhiễm khác ở nồng độ cao). Hơn nữa, ứng dụng PGPR làm giảm việc sử dụng phân hoá học và tiết kiệm về mặt kinh tế, đem lại lợi ích môi trường và giảm chi phí sản xuất [1, 2].

Các PGPR nổi bật gồm thành viên của các chi *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, ... [1-2]. Các vi khuẩn này có thể phân lập từ vùng rễ của các loài thực vật khác nhau, đất hoặc nước. Tuy

Ngày nhận bản thảo: 06-9-2017; Ngày chấp nhận đăng: 20-6-2018; Ngày đăng: 30-8-2018.

Chu Nguyên Thanh, Nguyễn Yến Nhi, Đào Ngọc Điệp, Trần Thị Hoài Bảo, Hoàng Thị Thanh Minh*, Bùi Văn Lê – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

*Email tác giả liên hệ: httminh@hcmus.edu.vn

nhiên, việc sàng lọc và tuyển chọn các chủng có hoạt tính cao và ổn định để ứng dụng vào sản xuất cần nhiều thời gian và công sức. Trước đó, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn từ vùng rễ của 6 loài thực vật tại các tỉnh Nam Bộ [3]. Chúng tôi đã đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng của 2 trong số 18 chủng vi khuẩn đã được phân lập và tuyển chọn. Hai chủng vi khuẩn được định danh, khảo sát một số các hoạt tính sinh học có lợi của chúng, đồng nuôi cấy với thực vật nhằm đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng thực vật, hướng tới việc phát triển chế phẩm vi sinh có hiệu quả cao trong thực hành nông nghiệp.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn: Hai chủng vi khuẩn P112 và P113 được phân lập từ vùng đất quanh rễ cây bắp (*Zea mays* L.) thu ở Tây Ninh sử dụng môi trường King's B. Vi khuẩn được lưu giữ dài hạn ở -70°C trong dung dịch chứa 15% glycerol.

Hạt giống thực vật: Hạt *A. thaliana* dòng Col-0, hạt giống bắp nếp lai MX6 (công ty Cổ Phần Giống Cây Trồng Miền Nam).

Mô tả định danh vi khuẩn

Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào và một số đặc điểm sinh hóa cơ bản, tiến hành định danh sơ bộ theo hướng dẫn của phần mềm ABIS online. Đồng thời, trình tự 16S rDNA của vi khuẩn được xác định và so sánh với cơ sở dữ liệu trên NCBI. DNA vi khuẩn được tách chiết sử dụng QIAamp[®] genomic DNA kit của hãng Qiagen. Trình tự 16S rDNA được khuếch đại bằng cặp mồi 27F và 1492R; thành phần phản ứng bao gồm: Đệm PCR (1X), MgCl_2 (2,5 mM), hỗn hợp dNTP (800 μM), primer (0,5 μM), *Taq* DNA polymerase (1U), DNA vi khuẩn (100ng); chu trình nhiệt: $95^{\circ}\text{C}/10$ phút, 35 chu kỳ ($95^{\circ}\text{C}/30$ giây – $55^{\circ}\text{C}/30$ giây – $72^{\circ}\text{C}/1$ phút), $72^{\circ}\text{C}/5$ phút [4]. Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng QIAquick PCR Purification Kit của Qiagen, sau đó được giải trình tự bởi công ty IDT, trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu của NCBI sử dụng công cụ BLAST.

Khảo sát các đặc điểm có lợi của vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*

Khả năng cố định đạm được xác định bằng phương pháp nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường

malate vô đạm [5], ghi nhận khả năng hình thành khuẩn lạc và làm đổi màu môi trường nuôi cấy.

Khả năng hòa tan lân được quan sát bởi sự xuất hiện của vòng tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ trên môi trường Pikovskaya's agar sau 3 ngày nuôi cấy ở 30°C [6]. Đồng thời, khả năng hòa tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ trong dịch nuôi cấy được định lượng bằng phương pháp Molybdo Vanadate theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 5815).

Khả năng sản sinh phytohormone (IAA và GA_s) được xác định bằng cách nuôi cấy lắc vi khuẩn (150 rpm) trong môi trường Tryptone Soya Broth (TSB). Sau 7 ngày, sự sản sinh IAA trong dịch nuôi cấy được phát hiện và định lượng bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski ở bước sóng 520 nm [7-8]; sự sản sinh GA_s được định lượng bằng phương pháp ly trích trong ethyl acetate và đo độ hấp thụ ở bước sóng 254 nm [9-10].

Khảo sát khả năng kích thích nảy mầm của vi khuẩn lên hạt *A. thaliana* trong điều kiện *in vitro*

Vi khuẩn được tăng sinh qua đêm trên môi trường TSB, tốc độ lắc 100 vòng/phút, 30°C . Ly tâm thu sinh khối và pha loãng huyền phù sao cho giá trị OD_{600} đạt khoảng 0,1 (tương đương với khoảng 10^9 CFU/ml). Hạt *A. thaliana* được khử trùng bằng hỗn hợp sodium hypochlorite 5% (v/v) và triton X-100 0,1% (v/v) trong 5 phút, sau đó rửa lại 5 lần với nước cất khử trùng. Ngâm hạt trong huyền phù vi khuẩn 2 giờ trước khi cấy lên giấy lọc được làm ẩm bằng nước cất vô trùng hoặc môi trường khoáng MS $\frac{1}{4}$. Tỷ lệ nảy mầm được ghi nhận sau 3 ngày.

Thử nghiệm khả năng kích thích tăng trưởng của vi khuẩn trên cây mô hình *A. thaliana* trong điều kiện *in vitro*

Chọn các hạt *A. thaliana* khỏe mạnh và đồng đều, khử trùng rồi gieo trên môi trường MS $\frac{1}{4}$, 1,25% sucrose, 1% agar, pH 5,8 cho tới 4 ngày tuổi. Dùng tấm bông vô trùng cấy vi khuẩn cách đầu mút rễ 2,5cm như đã mô tả trước đó bởi R Ortiz-Castro [11]. Đồng nuôi cấy ở điều kiện 16 giờ sáng/8 giờ tối, nhiệt độ 25°C . Sau 12 ngày, đánh giá sự phát triển của cây dựa trên trọng lượng tươi của rễ và chồi.

Thử nghiệm hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng của vi khuẩn trên giống bắp lai MX6 trong nhà lưới

Hạt giống bắp nếp lai MX6 được cho nảy mầm qua đêm trên bông gòn ẩm và gieo trên bầu đất đến 5 ngày tuổi. Chọn 30 cây con phát triển đồng đều, trong đó 15 cây được trồng vào chậu chứa 5kg đất đã bổ sung vi khuẩn ở nồng độ 10^7 CFU/g đất và 15 cây được trồng vào chậu không bổ sung vi khuẩn (nghiệm thức đối chứng). Đánh giá tác động của vi khuẩn lên sự tăng trưởng và phát triển của cây so với nghiệm thức đối chứng ở các chỉ tiêu: trọng lượng tươi của chồi, trọng lượng khô của rễ, hàm lượng chlorophyll và protein trong lá. Chlorophyll được tách chiết và được xác định hàm lượng bằng phương pháp được mô tả bởi Arnon [12]. Hàm lượng protein tổng số trong lá được xác định bằng phương pháp Bradford [13].

Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sự khác biệt có ý nghĩa của các giá trị trung bình được xác định bằng thử nghiệm t-test. Các phân tích thống kê được xử lý bằng phần mềm GraphPad.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mô tả và định danh

Dựa trên hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào và một số đặc điểm sinh hóa cơ bản của 2 chủng vi khuẩn (Bảng 1), có thể xác định 2 chủng vi khuẩn đã phân lập thuộc chi *Pseudomonas*. Một phần trình tự 16S rDNA (khoảng 1200bp) của 2 chủng vi khuẩn đã được xác định. Kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng trên NCBI cho thấy độ tương đồng trình tự đạt 99% với *Pseudomonas* sp. RHS 07.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái, sinh hóa và độ tương đồng trình tự 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn

	Chủng P112	Chủng P113
Đặc điểm khuẩn lạc	Tròn, lồi, bờ đều, rìa mỏng, màu trắng đục, đường kính 1–3mm	Tròn, lồi, bờ đều, màu vàng đục, đường kính 1–3mm, tiết sắc tố màu vàng xanh và phát sáng ở bước sóng 363nm
Nhuộm Gram	Màu hồng	Màu hồng
Hình dạng tế bào	Que, ngắn, tế bào đơn.	Que, ngắn, tế bào đơn.
Hình thức hô hấp	Hiếu khí tùy ý	Hiếu khí
Khả năng di động	+	-
Khả năng làm tan huyết	-	-
Tăng trưởng ở 4°C	-	-
Tăng trưởng ở 41°C	+	+
Tăng trưởng trên MacConkey	+	+
Khả năng sinh H ₂ S	-	-
Khả năng sinh Indol	-	-
Khả năng khử nitrate	+	+
ADH	+	+
LDC	+	+
ODC	+	+
ONPG	-	-
Hoạt tính Oxidase	+	+
Khả năng phân giải tinh bột	-	-
Khả năng phân giải gelatin	-	-
Khả năng phân giải lecithine	+	+
Hoạt tính Urease	-	-
L–Arabinose	+	+
Citrate	+	+
Glucose	+	+
Myo–Inositol	+	+
Mannose	+	+
Manitol	+	+

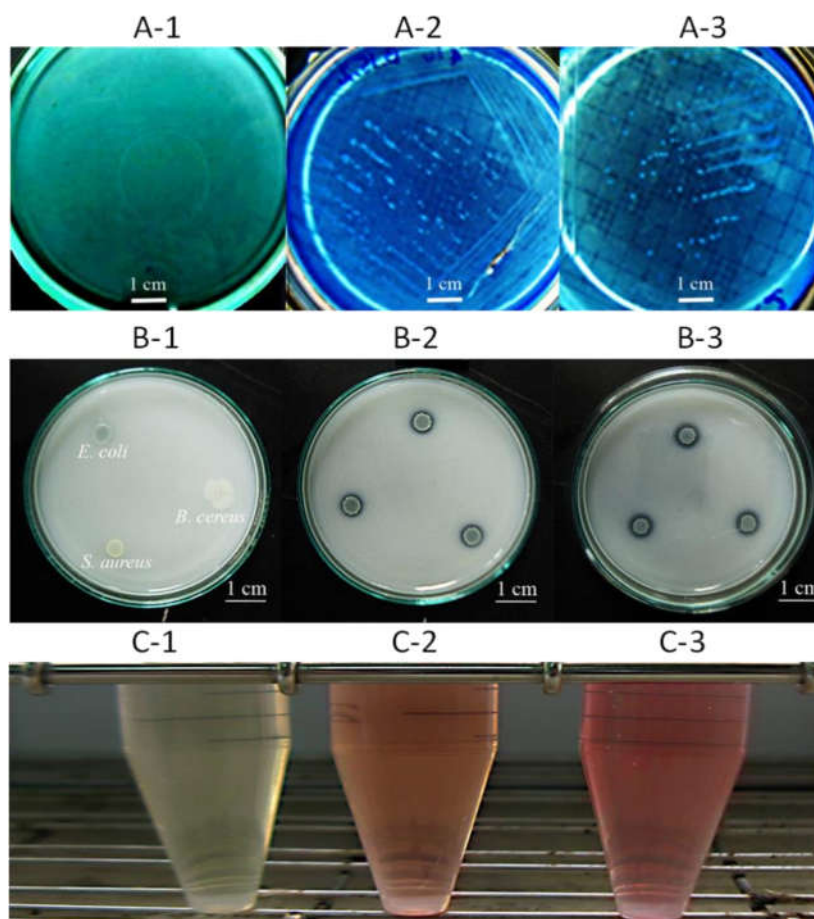
Sucrose	+	+
Xylose	+	+
Loài tương cận trên	<i>Pseudomonas sp. RHS 07</i>	<i>Pseudomonas sp. RHS 07</i>
% tương đồng	99	99
Accession	KM977836.1	KM977836.1

Các đặc điểm có lợi cho cây trồng của hai chủng vi khuẩn

Kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng cố định N, hòa tan lân, sinh tổng hợp IAA của 2 chủng vi khuẩn được thể hiện trong Hình 1.

Kết quả cho thấy cả 2 chủng sử dụng trong thí nghiệm này đều có khả năng tăng trưởng trên môi trường vô đạm. Trong không khí, N chiếm tới 78% nhưng thực vật không thể sử dụng được dạng N này. Nhờ phức hợp enzyme nitrogenase của một số nhóm vi khuẩn, N không khí có thể chuyển đổi thành dạng amoni, cung cấp nguồn N cho vi khuẩn

sinh trưởng, một phần sản phẩm được vi khuẩn tiết ra ngoài môi trường dưới dạng các hợp chất amoni làm thay đổi pH và có thể nhận biết nhờ sự chuyển màu môi trường nuôi cấy. Trong tự nhiên, hoạt động cố định N của các nhóm vi khuẩn là nguồn cung cấp N chủ yếu cho thực vật. Khả năng cố định đạm được tìm thấy ở rất nhiều chi vi khuẩn vùng rễ như *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus* và *Cyanobacter* [1].



Hình 1. Khả năng tăng trưởng trên môi trường vô đạm (A) trong đó A-1: Đối chứng (*E. coli*), A-2: *Pseudomonas sp.* P113, A-3: *Pseudomonas sp.* P112; khả năng hòa tan phosphate (B) với B-1: Đối chứng (*E. coli*; *B. cereus*; *S. aureus*), B-2: *Pseudomonas sp.* P113, B-3: *Pseudomonas sp.* P112 và phản ứng màu với thuốc thử Salkowski (C) của vi khuẩn trong đó C-1: Môi trường không cấy vi khuẩn, C-2: Dịch nuôi cấy *Pseudomonas sp.* P113, C-3: Dịch nuôi cấy *Pseudomonas sp.* P112

Cùng với N, P cũng là một nguyên tố thiết yếu cho sự sinh trưởng của thực vật. Mặc dù một lượng lớn P luôn có trong đất nhưng chúng ở dạng khó hấp thụ bởi thực vật. Rất nhiều vi khuẩn vùng rễ được gọi là những vi khuẩn hòa tan lân có thể chuyển đổi P từ dạng khó tan thành dạng dễ hấp thụ. Cơ chế hòa tan các dạng phosphate khó tan được cho là liên quan đến sự giải phóng proton và các acid hữu cơ trong quá trình biến dưỡng của vi khuẩn. Về mặt thực nghiệm có thể nhận biết khả năng hòa tan các dạng phosphate khó tan nhờ sự hình thành vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc trên môi trường thạch PKV (Hình 1B). Kết quả thí nghiệm cho thấy, sau 5 ngày, hàm lượng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ hòa tan bởi *Pseudomonas* sp. P112 và *Pseudomonas* sp. P113 lần lượt là 107,9 và 88,2 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này tương tự báo cáo của Jayadi và cộng sự (2013) với lượng phosphorus hòa tan cao nhất lên đến 87,59 $\mu\text{g/ml}$ [14]. Trong khi đó, báo cáo của Oteino và cộng sự (2015) cho thấy khả năng hòa tan lân của một số chủng PGPR dao động ở mức từ 85 $\mu\text{g/ml}$ và cao nhất có thể đến 1312 $\mu\text{g/ml}$ [1-2, 15].

Rất nhiều PGPR có khả năng sản sinh IAA trong điều kiện *in vitro* khi môi trường nuôi cấy được bổ sung tryptophane. Trong thí nghiệm này, chủng P112 và P113 sản sinh lượng IAA lần lượt là 171 $\mu\text{g/ml}$ và 70 $\mu\text{g/ml}$ sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường TSB bổ sung 0,1g/L tryptophane. Khả năng sản sinh IAA của 2 chủng vi khuẩn được khảo sát là tương đối cao so với một số công bố trước đó. Chẳng hạn, 10 chủng *Pseudomonas* được khảo sát bởi Kamble và cộng sự (2015) sản sinh IAA trong khoảng từ 21,5 – 81,8 $\mu\text{g/ml}$ [16]. Trước đó, Iqbal và cộng sự (2013) đã sàng lọc được chủng *Pseudomonas* có khả năng sinh IAA lên tới 110 $\mu\text{g/ml}$ sau 3 ngày nuôi cấy [17]. IAA đóng một vai trò quan trọng trong sự tương tác giữa thực vật và vi khuẩn. Hormone này ảnh hưởng đến sự phân chia, kéo dài và biệt hóa tế bào; gia tăng tỉ lệ xylem và sự phát triển bộ rễ; ảnh hưởng đến quang hợp và khả năng kháng với một số điều kiện stress [1-2]. Các gene sinh tổng hợp IAA vi khuẩn có thể định vị trên nhiễm sắc thể vi khuẩn hoặc trên các plasmid và do đó có thể

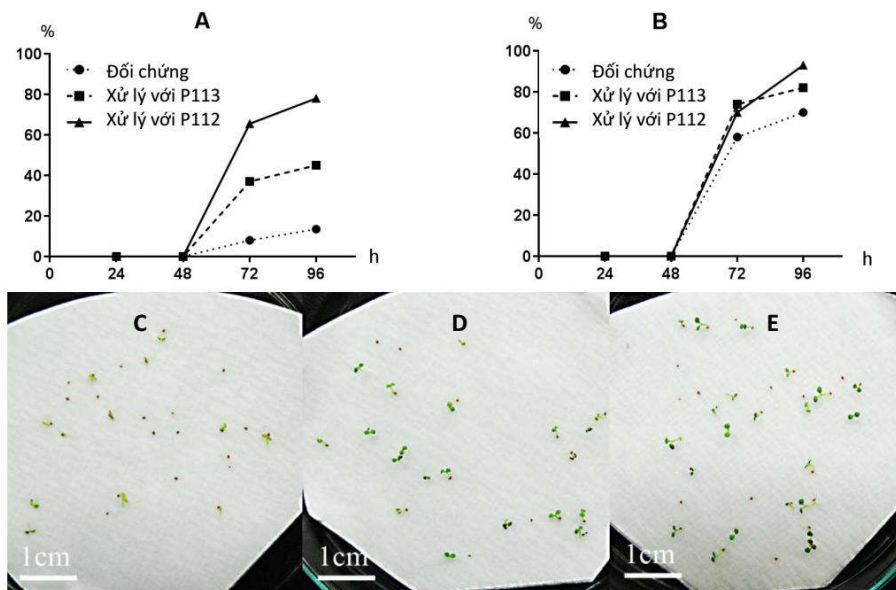
ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp IAA. Khi các gene này định vị trên plasmid, chúng có thể tồn tại với số lượng bản sao lớn dẫn đến gia tăng lượng IAA được tổng hợp [2].

Bên cạnh IAA, nhiều công trình nghiên cứu cũng đã chứng minh khả năng sản sinh GA_s của một số PGPR. Kết quả thí nghiệm cho thấy, 2 chủng P112 và P113 sản sinh lượng GA_s lần lượt là 46,4 $\mu\text{g/ml}$ và 6,23 $\mu\text{g/ml}$. Trước đó, G.P. Kumar và cộng sự (2015) cũng đã phân lập và khảo sát trên 75 chủng *Pseudomonas*, hàm lượng GA_s trong dịch nuôi cấy vào khoảng 14,6–47,3 $\mu\text{g/ml}$ [10].

Như vậy, cả 2 chủng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng cố định đạm, hòa tan phosphate và sản sinh các chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

Xử lý vi khuẩn giúp cải thiện tỉ lệ nảy mầm của hạt *A. thaliana*

Tỉ lệ nảy mầm của hạt *A. thaliana* được quan sát trong khoảng 72 giờ sau khi xử lý với vi khuẩn, nghiệm thức đối chứng được xử lý với nước cất vô trùng. Trên giấy lọc tẩm nước cất, tỉ lệ nảy mầm trung bình của nghiệm thức xử lý với chủng P112 đạt 45% và chủng P113 đạt 78%, cao hơn nhiều lần so với nghiệm thức đối chứng chỉ đạt 13,5%. Trong khi đó, trên giấy lọc tẩm dung dịch khoáng MS ¼ cũng cho thấy khả năng cải thiện tỉ lệ nảy mầm của vi khuẩn nhưng mức độ chênh lệch so với đối chứng không quá lớn. Cụ thể, tỉ lệ nảy mầm lần lượt đạt 82% và 93% khi xử lý với P112 và P113, trong khi đối chứng đạt 70%. Cơ chế kích thích sự nảy mầm được sử dụng bởi vi khuẩn hiện vẫn chưa được làm rõ. Một số báo cáo cho rằng nó liên quan đến khả năng sinh tổng hợp phytohormone của vi khuẩn, điển hình như báo cáo của B. Sasirekha và cộng sự [8]. Bên cạnh đó, cũng có những báo cáo cho thấy hàm lượng phytohormone sinh ra bởi vi khuẩn có thể làm giảm khả năng nảy mầm của thực vật [18]. Trong thực tế, vi khuẩn có thể có ảnh hưởng khác nhau đến sự nảy mầm của các loài thực vật khác nhau. Đồng thời, mật độ vi khuẩn và thời gian xử lý cũng cần phải được tối ưu hóa cho từng loại thực vật trước khi áp dụng.

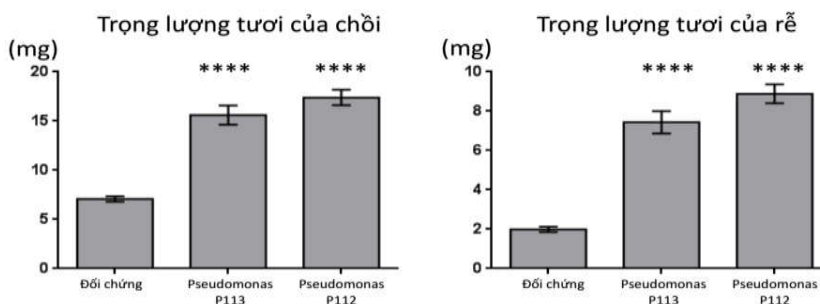


Hình 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn lên tỉ lệ nảy mầm của hạt và sự phát triển ở giai đoạn cây con. Tỉ lệ nảy mầm của hạt trên giấy lọc được làm ẩm bằng nước cất (A) và dung dịch MS ¼ (B). Cây con sau 3 ngày gieo khi được xử lý với nước cất (C), *Pseudomonas* sp. P113 (D) và *Pseudomonas* sp. P112 (E)

Đồng nuôi cấy với vi khuẩn giúp gia tăng trọng lượng rễ và chồi của *A. thaliana*

R Ortiz-Castro đã chỉ ra *A. thaliana* là mô hình hiệu quả và nhanh chóng để đánh giá khả năng thúc đẩy tăng trưởng của các PGPR [11]. Thí nghiệm này sử dụng mô hình đồng nuôi cấy của R Ortiz-Castro, kết quả cho thấy cả 2 chủng vi khuẩn đều có khả năng kích thích sự tăng trưởng rễ và chồi của *A. thaliana* rõ rệt so với đối chứng. Cụ thể, trọng lượng tươi của rễ và chồi ở nghiệm thức xử lý với chủng P112 lần lượt gấp khoảng 4,9 lần và 2,5 lần so với nghiệm thức đối chứng.

Tương tự, ở nghiệm thức xử lý với chủng P113, giá trị trọng lượng tươi của rễ và chồi lần lượt gấp khoảng 4,1 lần và 2,3 lần so với nghiệm thức đối chứng. Khi được xử lý với vi khuẩn, rễ cây có chiều hướng hạn chế kéo dài, thay vào đó là sự tăng cường số lượng rễ bên cũng như phát triển mạnh hệ thống lông rễ (dữ liệu không được thể hiện). Sự thay đổi này làm gia tăng đáng kể diện tích bề mặt rễ, từ đó ảnh hưởng tích cực đến sự hấp thu chất dinh dưỡng và kéo theo sự tăng trưởng mạnh của chồi so với nghiệm thức không xử lý vi khuẩn.

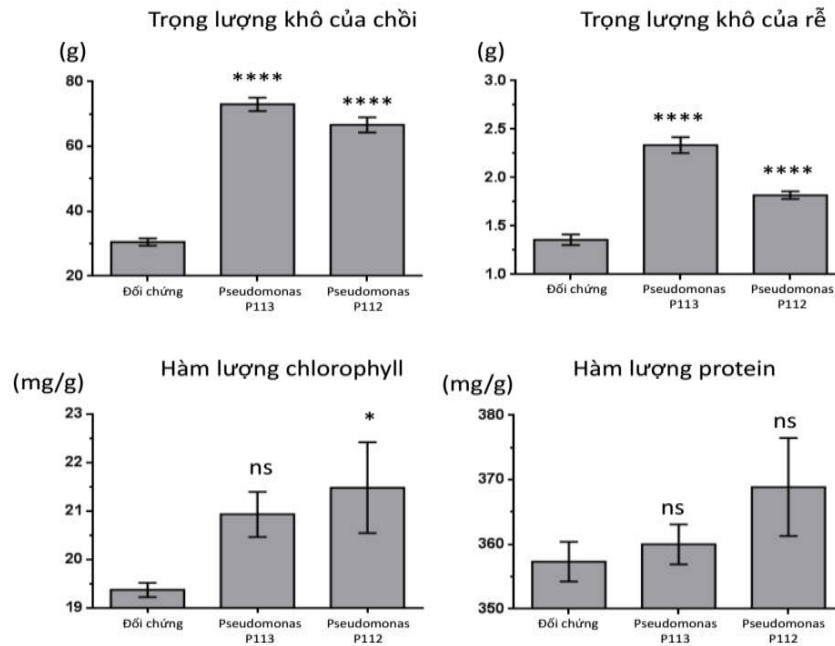


Hình 3. Ảnh hưởng của vi khuẩn lên sự tăng trưởng của *A. thaliana* sau 12 ngày đồng nuôi cấy (****) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (p-value <0,0001). Thanh sai số hiển thị độ lệch chuẩn của trung bình (SEM)

Ảnh hưởng của vi khuẩn lên sự sinh trưởng phát triển của cây bắp trong nhà lưới

Sau khi chứng minh được tiềm năng thúc đẩy tăng trưởng của 2 chủng vi khuẩn qua các thí

nghiệm *in vitro*, chúng tôi tiếp tục đánh giá trên mô hình cây bắp trong điều kiện nhà lưới. Kết quả thu được sau 21 ngày gieo cây thể hiện trên Hình 4.

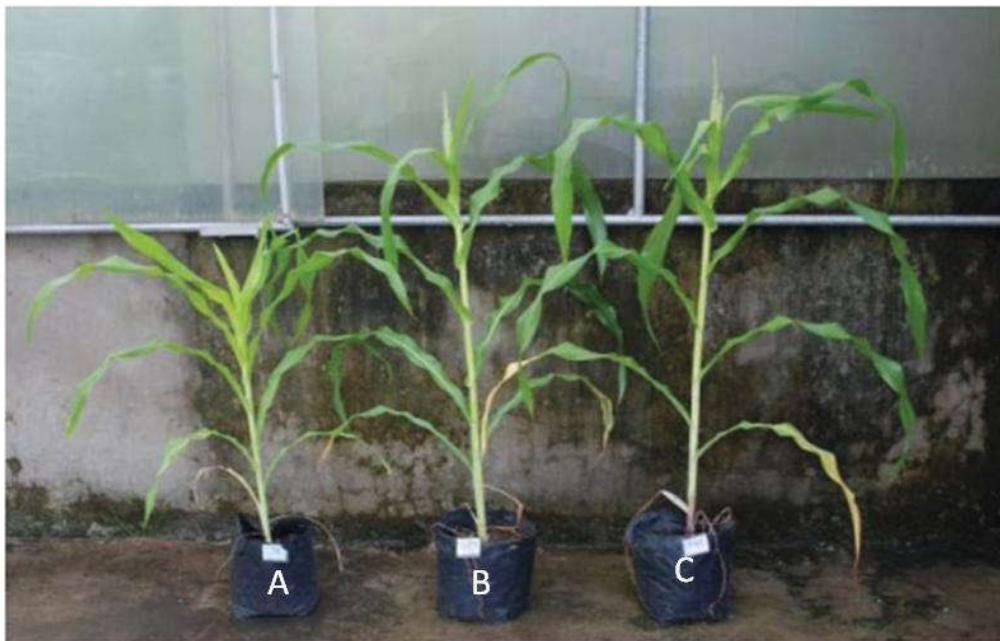


Hình 4. Ảnh hưởng của vi khuẩn lên sự tăng trưởng của cây bắp sau 21 ngày tuổi. (****) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (p-value <0,0001). (*) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (p-value <0,05). (ns) chỉ ra sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (p-value >0,05). Thanh sai số hiển thị độ lệch chuẩn của trung bình (SEM)

Theo đó, trọng lượng khô của rễ ở nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cao hơn 1,4 đến 1,7 lần so với nghiệm thức đối chứng. Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn khi bổ sung vào đất có tác động tích cực đến sự phát triển của bộ rễ nhờ khả năng sinh tổng hợp auxin. Bên cạnh đó, khả năng cố định đạm và hòa tan các hợp chất phosphorus khó tan của vi khuẩn cũng giúp tăng cường hấp thu N và P, là 2 nguyên tố khoáng quan trọng nhất đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Nhờ hấp thu tốt các chất dinh dưỡng từ rễ, các cây được bổ sung vi khuẩn cho thấy khả năng tăng trưởng vượt trội so với nghiệm thức đối chứng. Trọng lượng chồi ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cao hơn từ 2 đến 2,3 lần so với nghiệm thức đối chứng. Hàm lượng protein trong lá giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt đáng kể

trong khi hàm lượng chlorophyll trong nghiệm thức có khuẩn được cải thiện hơn so với đối chứng.

Trong nghiên cứu đã được báo cáo bởi Jarak và cộng sự (2012) [6], các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* được phân lập từ vùng rễ cây bắp cũng cho hiệu quả tác động khác biệt lên sự phát triển của chính cây bắp trồng trong điều kiện nhà lưới. Khối lượng khô của cây tăng 1,22 lần khi bổ sung *Pseudomonas sp.* so với nghiệm thức đối chứng. Hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* và *Pseudomonas aeruginosa* trong nghiên cứu của Adjanohoun và cộng sự (2011) [1] có thể giúp gia tăng khối lượng rễ cây bắp lên đến 59,57% và 23,40% so với nghiệm thức đối chứng trên quy mô đồng ruộng.



Hình 5. Cây bắp 30 ngày tuổi khi không xử lý (A) và có xử lý vi khuẩn (B) *Pseudomonas sp.* P113, (C) *Pseudomonas sp.* P112

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy 2 chủng vi khuẩn khảo sát thuộc chi *Pseudomonas*. Cả 2 chủng vi khuẩn đều thể hiện những đặc điểm có lợi cho sự sinh trưởng của thực vật cả trong điều kiện *in vitro* lẫn điều kiện thực nghiệm trong nhà lưới, cho thấy tiềm năng ứng dụng của chúng trong thực hành nông nghiệp. Kết quả nghiên cứu tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển một chế phẩm có thể ứng dụng trong thực tế. Tuy nhiên, trước đó cần có những đánh giá về độ ổn định và khả năng tồn tại lâu dài của các chủng vi khuẩn này trong những điều kiện khắc nghiệt của tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G. Gupta, S.S. Parihar, N.K. Ahirwar, S.K. Snehi, V. Singh, “Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture”, *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, vol. 07, no. 02, pp. 096–102, 2015.
- [2] M. Ahemad, M. Kibret, “Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective”, *Journal of KingSaud University - Science*, vol. 26, no. 1, pp. 1–20, 2014.
- [3] C.N. Thanh, Đ.N. Điệp, B.L. Anh, T.T. Hiếu, B.V. Lê, “Phân lập và mô tả đặc tính của vi khuẩn vùng rễ có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật”, Kỷ yếu hội nghị khoa học lần IX, Trường Đại học Khoa Tự nhiên, ĐHQG – HCM, 2014.
- [4] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pellettier, D.J. Lane,

- “16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study”, *Journal of Bacteriology*, vol. 173, no. 2, pp. 697–703, 1991.
- [5] Y. Bashan, G. Holguin, R. Lifshitz, “Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria”, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 331–345, 1993.
- [6] C.S. Nautiyal, “An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms”, *FEMS Microbiology Letter*, vol. 170, no. 1, pp. 265–270, 1999.
- [7] A. Wahyud, R. Astuti, “Screening of *Pseudomonas sp.* isolated from rhizosphere of soybean plant as plant growth promoter and biocontrol agent”, *American Journal of Agricultural and Biological Science*, vol. 6, no. 1, pp. 134–141, 2011.
- [8] B. Sasirekha, S. Shivakumar, S.B. Sullia, “Statistical optimization for improved indole-3-acetic acid (iaa) production by *Pseudomonas aeruginosa* and demonstration of enhanced plant growth promotion”, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 12, no. 4, pp. 863–873 (2012).
- [9] Ş. Karakoç, N. Aksöz, “Some optimal cultural parameters for gibberellic acid biosynthesis by *Pseudomonas sp.*”, *Turkish Journal Biology*, vol. 30, no. 2, pp. 81–85, 2006.
- [10] G.P. Kumar, S. Desai, E.L.D. Amalraj, G. Reddy, “Isolation of fluorescent *Pseudomonas spp.* from diverse agro - ecosystems of India and characterization of their PGPR traits”, *Journal of Bacteriology*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, 2016.
- [11] R.O. Castro, J.C. Carcia, J.L. Bucio, “Rapid identification of plant-growth-promoting Rhizobacteria Using an Agar Plate cocultivation system with *Arabidopsis*” In: F.J. de Bruijn, *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., vol. 1, pp. 345–354, 2013.

- [12] D.I. Arnon, "Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*", *Plant Physiology*, vol. 24, no. 1, pp. 41–47, 1948.
- [13] M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding", *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [14] M. Jayadi, "In vitro Selection of Rock Phosphate solubility by microorganism from ultisols in South Sulawesi, Indonesia", *American Journal of Agriculture and Forest*, vol. 1, no. 4, pp. 68–73, 2013.
- [15] N. Oteino, R.D. Lally, S. Kiwanuka, A. Lloyd, D. Ryan, K.J. Germaine, D.N. Dowling, "Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates", *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, pp. 1–9, 2015.
- [16] K.D. Kamble, D.K. Galerao, "Indole acetic acid production from *Pseudomonas* species isolated from rhizosphere of garden plants in Amravati", *International Journal of Advances in pharmacy, biology and chemistry*, vol. 4, no. 1, pp. 23–31, 2015.
- [17] A. Iqbal, S. Hasnain, "Auxin Producing *Pseudomonas* Strains: Biological Candidates to modulate the growth of *Triticum aestivum* beneficially", *American Journal of Plant Sciences*, vol. 4, no. 9, pp. 1693–1700, 2013.
- [18] S. Tabatabaei, P. Ehsanzadeh, H. Etesami, H.A. Alikhani, B.R. Glick, "Indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* isolates inhibit seed germination and α -amylase activity in durum wheat (*Triticum turgidum* L.)", *Spanish Journal of Agricultural Research*, vol. 14, no. 1, pp. 1–10, 2016.

Evaluation of two *Pseudomonas* strains isolated from a maize rhizosphere as a plant growth promoting rhizobacteria

Chu Nguyen Thanh¹, Nguyen Yen Nhi¹, Dao Ngoc Diep¹, Tran Thi Hoai Bao¹,
Hoang Thi Thanh Minh^{1,*}, Bui Van Le¹

¹University of Science, VNUHCM

*Corresponding author: httminh@hcmus.edu.vn

Received: 06-9-2017; Accepted: 20-6-2018; Published: 30-8-2018

Abstract—Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are free-living soil bacteria (rhizosphere bacteria), rhizoplane bacteria or endophytic bacteria that may promote plant growth and suppress plant diseases. The aim of this study is to evaluate effects of 2 rhizobacteria strains belonging to the genus *Pseudomonas* isolated from maize rhizosphere on the plant growth promotion. The *in vitro* tests showed that both of strain could fix nitrogen, solubilize phosphate, produced phytohormones (IAA and

GA_s), and improved the germination and growth of *Arabidopsis thaliana*. Under the greenhouse condition, growth parameters of bacteria inoculated maizes (fresh weight of shoot, dry weight of root, chlorophyll content) were also increased significantly than those of uninoculated ones. Our results reported 2 promising bacteria strain candidates and revealed their potential as a biological agent for eco-friendly agricultural practices.

Keywords—*Arabidopsis thaliana*, maize, nitrogen fixation, phosphate solubilization, phytohormones biosynthesis, PGPR, *Pseudomonas*