

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Pseudomonas* có khả năng kích thích tăng trưởng cây đậu phộng (*Arachis hypogaea* L.) ở điều kiện mặn

Chu Nguyên Thanh, Phạm Văn Nhứt Tiếng, Bùi Văn Lệ, Hoàng Thị Thanh Minh*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Sử dụng vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (Plant growth promoting rhizobacteria-PGPR) được xem như là một giải pháp tiềm năng trong việc hỗ trợ thực vật đối phó với stress mặn. Trong số các PGPR, *Pseudomonas* là chi vi khuẩn sở hữu nhiều cơ chế đa dạng trong việc thúc đẩy tăng trưởng thực vật và cảm ứng tính chống chịu với stress sinh học cũng như phi sinh học. Nghiên cứu này chọn lọc được 3 chủng *Pseudomonas* tiềm năng và đánh giá hiệu quả của chúng trên cây đậu phộng. Cả 3 chủng vi khuẩn được khảo sát đều sở hữu những đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật như sản sinh indole-3-acetic acid (IAA), hòa tan phosphate, cố định đạm. Bên cạnh đó, cả 3 chủng vi khuẩn đều mang gene mã hóa cho 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase là một enzyme có vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ thực vật chống chịu với các điều kiện stress khác nhau. Chủng BT00P03 cho thấy tiềm năng khi cải thiện các thông số tăng trưởng của cây đậu phộng trong điều kiện bình thường và stress mặn. Kết quả nghiên cứu này chứng tỏ chủng vi khuẩn BT00P03 có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật, cho thấy tiềm năng của chúng trong thực hành nông nghiệp bền vững. Nghiên cứu này là tiền đề cho những nghiên cứu mở rộng nhằm tìm hiểu cơ chế tương tác giữa vi khuẩn và thực vật trong điều kiện stress, đồng thời, mở ra hướng đi ứng dụng các chủng vi khuẩn này vào thực hành sản xuất.

Từ khoá: cây đậu phộng, PGPR, *Pseudomonas*, khả năng chống chịu stress mặn

GIỚI THIỆU

Xâm nhiễm mặn là một yếu tố nghiêm trọng làm giảm diện tích đất canh tác nông nghiệp, hạn chế năng suất và chất lượng cây trồng. Trên thế giới có hơn 45 triệu hecta đất đang bị ảnh hưởng bởi nhiễm mặn và mỗi năm diện tích này lại tăng lên 10% - một con số thật đáng lo ngại¹. Ở Việt Nam, tình hình đất nhiễm mặn đang ở mức báo động, do sự dâng cao của mực nước biển và hạn hán kéo dài bởi ảnh hưởng của El Nino. Đặc biệt, tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long sự ngăn dòng của các đập thủy điện thượng nguồn sông Mê Kông làm cho tình hình nhiễm mặn càng trở nên nghiêm trọng hơn. Trong các tỉnh bị ảnh hưởng bởi nhiễm mặn, thì Bến Tre được xem như là một điểm nóng về tình trạng này. Hiện trạng trên đặt ra những thách thức, không chỉ trong việc chọn giống cây trồng chịu mặn, mà còn phải cải tạo hệ sinh thái đất thông qua việc tương tác của rễ thực vật với hệ vi sinh vật trong đất nhiễm mặn².

Vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (Plant growth promoting rhizobacteria- PGPR) là những vi khuẩn cư trú tại vùng rễ thực vật có khả năng hỗ trợ tăng trưởng và kiểm soát các tác nhân gây bệnh

ở thực vật thông qua một loạt các cơ chế khác nhau. Cơ chế kích thích tăng trưởng thực vật của vi khuẩn vùng rễ trong điều kiện mặn liên quan đến việc sinh tổng hợp chất điều hòa tăng trưởng như indole-3-acetic acid (IAA); tăng cường khả năng hấp thụ dinh dưỡng cho cây thông qua quá trình hòa tan phosphate, cố định đạm; giúp cây duy trì cân bằng ion; sinh tổng hợp 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase; cảm ứng sự chống chịu có hệ thống (inducing systemic tolerance-IST)³⁻⁵.

Đậu phộng (*Arachis hypogaea*) – một loài cây có giá trị kinh tế cao trong nông nghiệp, được xem như là loại cây chủ lực ở các nước có nền kinh tế đang phát triển ở châu Phi và châu Á. Đậu phộng là cây khá nhạy cảm với stress mặn, vì vậy sự giảm sản lượng của cây đậu phộng trong điều kiện stress mặn là một vấn đề đáng quan tâm^{5,6}.

Trước đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn vùng rễ và bước đầu khảo sát hiệu quả trên cây mô hình *Arabidopsis*⁴. Trong nghiên cứu này, nhóm tập trung vào nhóm vi khuẩn là *Pseudomonas* tại vùng ngập mặn Bến Tre nhằm đánh giá, chọn lọc một số vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* có

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM

Liên hệ

Hoàng Thị Thanh Minh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM

Email: httminh@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 30-8-2019
- Ngày chấp nhận: 13-11-2019
- Ngày đăng: xx-3-2020

DOI :10.32508/stdjns.v4i1.834



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Trích dẫn bài báo này: Thanh C N, Tiếng P V N, Lệ B V, Minh H T T. **Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Pseudomonas* có khả năng kích thích tăng trưởng cây đậu phộng (*Arachis hypogaea* L.) ở điều kiện mặn.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(1):347-356.

khả năng kích thích tăng trưởng trên đối tượng cây đậu phộng trong điều kiện stress mặn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập vi khuẩn *Pseudomonas*

Vi khuẩn được phân lập từ mẫu đất và rễ cây bắp (*Zea mays*), cây khoai lang (*Ipomoea batatas*), dứa cạn (*Catharanthus roseus*) và đậu phộng (*Arachis hypogaea*) được thu nhận từ vùng đất nhiễm mặn thuộc xã An Thủy, huyện Ba Tri, tỉnh Bến Tre. Quy trình phân lập vi khuẩn có khả năng chịu mặn thực hiện theo quy trình đã báo cáo trước đó bởi nhóm nghiên cứu⁴. Huyền phù thu được từ vùng đất xung quanh rễ (S), dịch rửa siêu âm bề mặt rễ (P) và dịch ly trích rễ sau khi khử trùng bề mặt (E) được trải lên môi trường King B agar bổ sung 10% NaCl. Sau 48h ủ ở $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$, các khuẩn lạc phát huỳnh quang dưới đèn UV bước sóng 366 nm được làm thuần và bảo quản bằng kỹ thuật đông sâu ở -70°C .

Các chủng đã phân lập sau đó được xác nhận lại bằng kỹ thuật PCR nhằm phát hiện đoạn trình tự rDNA 16S chuyên biệt cho chi *Pseudomonas*. Vi khuẩn được tăng sinh trên môi trường Tryptone Soya Broth (TSB) khoảng 18h ở $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$. Sử dụng bộ kit Rapid Bacteria Genomic DNA isolation (Bio Basic Inc.) để ly trích gDNA vi khuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR (25 μL) bao gồm 2,5 μL gDNA vi khuẩn; 2,5 μL dung dịch đệm phản ứng PCR (10X); 200 nM mỗi mỗi và 1 U i-TaqTM DNA polymerase (iNtRON). Trình tự mỗi xuôi (Psmn289: 5' – GGTCTGAGAGGATGATCA GT– 3') và mỗi ngược (Psmn1258: 5' – TTAGCTCCACCTCGCGGC – 3')⁷. Chương trình nhiệt của phản ứng gồm 5 phút ở 95°C ; 30 chu kỳ (30 giây ở 94°C , 30 giây ở 55°C và 1 phút ở 72°C); 10 phút ở 72°C . Sản phẩm PCR (khoảng 960 bp) sau đó được phát hiện bằng điện di trên gel agarose.

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

Khảo sát độ chịu mặn: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường TSB bổ sung NaCl có nồng độ từ 0 đến 24%. Kết quả được ghi nhận sau 1 – 4 ngày nuôi cấy lắc ở 150 vòng/phút, $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Khả năng sinh IAA: Hàm lượng IAA sản sinh bởi vi khuẩn được xác định nhờ phản ứng màu với thuốc thử Salkowski cải tiến⁸. Vi khuẩn được nuôi cấy lắc ở trong môi trường TSB chứa 5% NaCl, có bổ sung 0,1 g/l tryptophan. Sau 5 ngày nuôi cấy lắc ở 150 vòng/phút, $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$, thu 1ml dịch khuẩn, ly tâm loại bỏ sinh khối, bổ sung thuốc thử Salkowski cải tiến với tỷ lệ dịch khuẩn: thuốc thử là 1:2. Ủ hỗn hợp trong

1 giờ, phản ứng dương tính sẽ cho màu từ hồng nhạt đến đỏ, đo độ hấp thụ ở bước sóng 530 nm xác định hàm lượng IAA dựa vào đường chuẩn IAA.

Khả năng cố định đạm: Thu nhận sinh khối vi khuẩn, rửa nhiều lần với đệm phosphate rồi cấy lên môi trường vô đạm (Nitrogen Free Mineral Medium-MNFM), chứa 3% NaCl⁹. Ghi nhận những chủng vi khuẩn có khả năng hình thành khuẩn lạc, đổi màu môi trường sau 5 ngày nuôi cấy.

Khả năng hòa tan Phosphate: Thu nhận sinh khối vi khuẩn, huyền phù trong đệm phosphate và pha loãng tới giá trị $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,1$ (khoảng 10^8 CFU/ml). Hút 2 μL sinh khối vi khuẩn trong nước muối sinh lý cấy thành 3 điểm trên môi trường thạch PKV 3% NaCl, ủ đĩa ở $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$. 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 cấy¹⁰. Chỉ số hòa tan phosphate (SI: solubilization Index) sau 7 ngày được tính theo công thức: $\text{SI} = \frac{\text{Đường kính vòng phân giải}}{\text{Đường kính khuẩn lạc}}$

Kiểm tra sự hiện diện của gene mã hóa ACC deaminase: Phản ứng PCR (25 μL) bao gồm 2,5 μL gDNA vi khuẩn; 2,5 μL dung dịch đệm phản ứng PCR (10X), 200 nM mỗi mỗi và 1 U i-TaqTM DNA polymerase (iNtRON). Trình tự mỗi xuôi (5' – ATG AAC CTG CAA CGA TTC – 3') và mỗi ngược (5' – TCA GCC GTC GGA AGA T – 3')¹¹. Chương trình nhiệt của phản ứng gồm 5 phút ở 95°C ; 35 chu kỳ (15 giây ở 95°C , 15 giây ở 58°C và 75 giây ở 72°C); 5 phút ở 72°C . Sản phẩm PCR (khoảng 750 bp) sau đó được phát hiện bằng điện di trên gel agarose.

Khảo sát kích thích tăng trưởng đậu phộng trong điều kiện mặn của vi khuẩn

Thử nghiệm in vitro

Hạt đậu phộng được khử trùng và cho nảy mầm trên bông gòn được tẩm ướt với môi trường khoáng $\text{MS} \frac{1}{2}$. Cây con 7 ngày tuổi được chuyển sang: môi trường khoáng $\text{MS} \frac{1}{2}$ có hoặc không có bổ sung vi khuẩn; môi trường khoáng $\text{MS} \frac{1}{2}$ chứa 100 mM NaCl có hoặc không có bổ sung vi khuẩn⁶. Mật độ vi khuẩn bổ sung vào môi trường đạt 10^6 CFU/mL. Cây được tăng trưởng trong điều kiện quang kỳ 16 giờ sáng / 8 giờ tối; nhiệt độ phòng sáng dao động từ $23 - 27^\circ\text{C}$. Ghi nhận khối lượng tươi của cây sau 4 tuần tăng trưởng.

Thử nghiệm trong chậu trồng ngoài vườn ươm

Hạt đậu phộng được khử trùng và cho nảy mầm trên bông gòn được tẩm ướt với môi trường khoáng $\text{MS} \frac{1}{2}$ có hoặc không có bổ sung vi khuẩn ở mật độ 10^6 CFU/mL. Sau khi hạt nảy mầm, đậu phộng được

chuyển sang chậu đất: đất không xử lý mặn hoặc đất được trộn với NaCl 75 mM. Cây được tưới nước 2 lần/tuần. Ở các nghiệm thức xử lý khuẩn, huyền phù vi khuẩn được bổ sung vào nước đạt mật độ 10^6 CFU/ml và tưới 2 tuần một lần. Với nghiệm thức xử lý mặn, cách 2 tuần sẽ tưới bổ sung bằng dung dịch NaCl 50 mM⁵. Sau 40 ngày gieo hạt, khối lượng tươi được ghi nhận. Điều kiện nhiệt độ (ngày: 34-38°C; đêm: 29-32°C) và độ ẩm tương đối 48-62 %RH trong vườn ươm được ghi nhận trong suốt quá trình thí nghiệm.

Xử lý thống kê số liệu

Tất cả các số liệu được xử lý thống kê dựa trên phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm SAS Univer-sity Edition.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và nhận diện vi khuẩn

Từ các nguồn mẫu thu nhận, 12 chủng vi khuẩn bao gồm 7 chủng (BT00S01, BT00S02, BT00P03, BT00P04, BT00P05, BT00P06 và BT00P07) từ cây bắp; 2 chủng (BT01S02 và BT01P01) từ cây khoai lang; 1 chủng (BT02E01) từ cây dưa cạm và 2 chủng (BT03S02 và BT03S03) từ cây đậu phộng được phân lập. Phần lớn các chủng phân lập được là từ vùng đất xung quanh rễ (các chủng được ký hiệu bởi chữ “S”) và từ bề mặt rễ (các chủng được ký hiệu bởi chữ “P”). Chỉ có duy nhất 1 chủng BT02E01 (ký hiệu bởi chữ “E”) là nội cộng sinh bên trong rễ. Trong thực tế, *Pseudomonas* là chi vi khuẩn rất phổ biến trong đất và vùng rễ của thực vật, nhưng do sự đa dạng về thành phần loài cùng với hiệu quả chọn lọc tương đối thấp của môi trường King B làm hạn chế khả năng phân lập vi khuẩn mục tiêu, đặc biệt là đối với những mẫu có sự phát triển của nấm mốc trên đĩa thạch.

Để khẳng định các chủng được chọn thuộc chi *Pseudomonas*, phản ứng PCR đã được sử dụng để khuếch đại một đoạn trình tự rDNA 16S chuyên biệt cho *Pseudomonas*^{7,12,13}. Kết quả thí nghiệm cho thấy, chỉ có 7/12 chủng cho kết quả dương tính trên bản điện di (Hình 1). Do số lượng chủng khảo sát không lớn, nên 12 chủng được phân lập (bao gồm cả các chủng âm tính với kết quả PCR) sẽ được tiến hành đánh giá các đặc điểm thúc đẩy tăng trưởng.

Đánh giá khả năng chịu mặn của vi khuẩn

Khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn được đánh giá, từ đó làm tiền đề để khảo sát khả năng kích thích tăng trưởng thực vật trong điều kiện muối cao. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường chứa hàm lượng NaCl tăng dần từ 6% đến 24% (khoảng cách giữa các nồng độ là 2%). Kết quả thí nghiệm

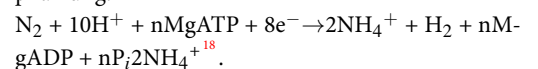
trong Bảng 1 cho thấy các chủng khuẩn được phân lập ở Bến Tre có khả năng tồn tại trong môi trường chứa hàm lượng muối khá cao, đặc biệt là hai chủng BT03P01 và BT02E01 có thể tăng trưởng trong môi trường chứa nồng độ NaCl lên tới 20% và 22%.

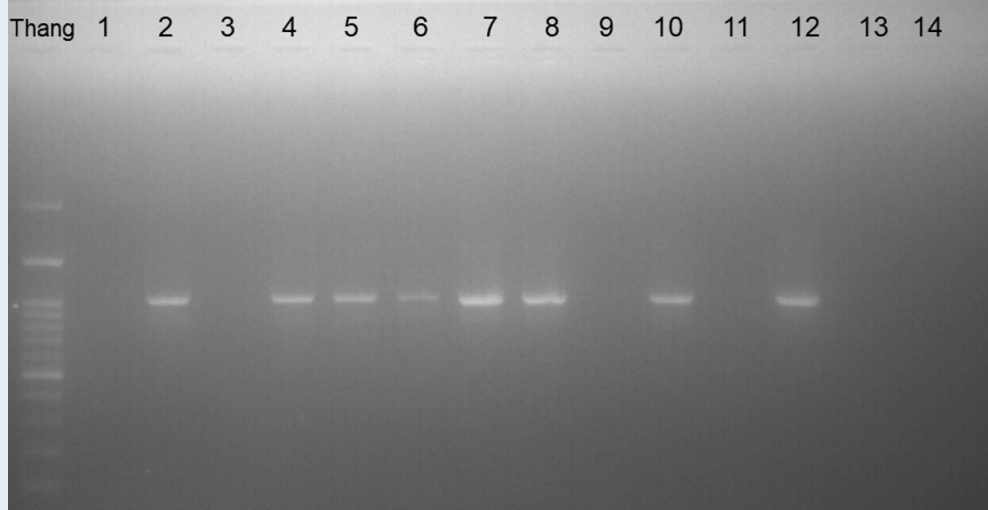
Khả năng sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn

Kết quả thí nghiệm trình bày trong Bảng 1 cho thấy tất cả các chủng khuẩn phân lập được đều có khả năng sản sinh IAA. Tuy nhiên, hàm lượng IAA sinh tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn sau 7 ngày nuôi cấy tương đối thấp trong khoảng 1,168 – 4,423 $\mu\text{g/ml}$ ¹⁴. Nhưng theo Bùi Trang Việt (2016) thì nồng độ IAA chỉ cần đạt từ 0,1 – 1 $\mu\text{g/ml}$ đã có thể tác động lên sự phát triển của cây theo chiều hướng có lợi¹⁵. Nên nếu đồng nuôi cấy các chủng khuẩn với thực vật trong thời gian kéo dài thì các chủng khuẩn này vẫn cung cấp đủ lượng IAA ngoại sinh cho sự phát triển thực vật bằng cách tăng trưởng rễ thông qua kéo dài rễ và làm giảm lượng ethylene. Ba yếu tố chính ảnh hưởng đến sự sản sinh IAA của các chủng vi khuẩn vùng rễ theo Mutluru và Konada (2007) là sự khác nhau giữa các loài và chủng vi khuẩn; thời gian nuôi cấy, giai đoạn phát triển của vi khuẩn và tiền chất tổng hợp IAA¹⁶. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn khác nhau sẽ có sự sản sinh IAA khác nhau. Một số chủng vi khuẩn nổi bật cho sự sản sinh IAA như *Pseudomonas aureantiaca* TSAU22, *Pseudomonas extremorientalis* TSAU6 và *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 đã làm tăng đáng kể sự phát triển của rễ cây lên đến 25% trong điều kiện bình thường và lên đến 52% ở nồng độ NaCl 100 mM so với cây đối chứng¹⁷.

Cố định đạm

Dựa vào kết quả trong Bảng 1 thì đa số các chủng khuẩn được phân lập đều có khả năng tăng trưởng trên môi trường MNFM, trừ chủng khuẩn BT03S02. Môi trường MNFM là một môi trường vô đạm, sự hình thành khuẩn lạc trên môi trường này chứng tỏ các chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng nguồn nitơ không khí cho các quá trình của tế bào. Trong môi trường MNFM có bổ sung bromophenol blue, đây là một chất chỉ thị pH, có màu vàng khi môi trường acid, màu xanh lá ở pH trung tính và chuyển sang màu xanh dương khi môi trường bazơ. Trong thí nghiệm này, môi trường chuyển từ màu xanh lá sang màu xanh dương là do vi khuẩn cố định đạm tạo ra sản phẩm NH_4^+ làm pH môi trường tăng lên. Sự cố định đạm của vi khuẩn được thực hiện theo phương trình phản ứng:





Hình 1: Phản ứng PCR phát hiện trình tự rDNA 16S chuyên biệt cho chi *Pseudomonas*. Từ trái qua: Thang chuẩn DNA (abm 100bp plus); 1-Đối chứng âm; 2-Đối chứng dương (*Pseudomonas protegens* ATCC 17386), 3-BT00S01, 4-BT00S02, 5-BT00P03, 6-BT00P04, 7-BT00P05, 8-BT00P06, 9- BT00P07, 10- BT01S02, 11- BT01P01, 12- BT02E01, 13- BT03S02, 14- BT03S03.

Bảng 1: Kết quả khảo sát một số hoạt tính sinh hóa liên quan đến đặc tính kích thích tăng trưởng của các chủng vi khuẩn được phân lập trong điều kiện stress mặn

Chủng vi khuẩn	Nồng độ NaCl cao nhất (%)	Nồng độ IAA ($\mu\text{g/ml}$)	Chỉ số hòa tan Phosphate	Cố định đạm
BT00S01	6	$4,316 \pm 0,133^a$	+ (*)	+
BT00S02	8	$3,487 \pm 0,206^b$	$1,654 \pm 0,301^{abc}$	+
BT00P03	8	$3,458 \pm 0,114^b$	$1,839 \pm 0,350^{ab}$	+
BT00P04	10	$3,049 \pm 0,292^c$	$1,108 \pm 0,026^e$	+
BT00P05	6	$3,039 \pm 0,151^c$	+ (*)	+
BT00P06	6	$4,423 \pm 0,196^a$	+ (*)	+
BT00P07	6	$3,536 \pm 0,160^b$	+ (*)	+
BT01S02	12	$1,976 \pm 0,203^f$	$1,198 \pm 0,090^{de}$	+
BT01P01	10	$2,610 \pm 0,281^d$	$1,453 \pm 0,057^{cd}$	+
BT02E01	22	$3,495 \pm 0,107^b$	$1,597 \pm 0,084^{bc}$	+
BT03S02	12	$2,428 \pm 0,075^{de}$	$1,882 \pm 0,055^a$	-
BT03S03	12	$1,470 \pm 0,220^g$	$1,623 \pm 0,021^{abc}$	+

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p \leq 0,05$

(*) Dấu + chỉ ra khả năng hòa tan phosphate nhưng ở mức độ thấp, không thể xác định chỉ số SI

Hòa tan phosphate

Trong 12 chủng vi khuẩn phân lập, chỉ có 8 chủng xuất hiện vòng phân giải sau 7 ngày nuôi cấy (Bảng 1). Tuy nhiên sau 7 ngày nuôi cấy, 8 chủng khuẩn chỉ xuất hiện các vòng phân giải khá nhỏ và chỉ số hòa tan dao động từ 1,108 – 1,882. Các cơ chế hòa tan phosphate bởi vi khuẩn rất đa dạng, nhưng theo Sharma và cộng sự (2013) thì có 3 cơ chế chính là sản sinh acid hữu cơ, giải phóng acid vô cơ và tổng hợp các polymer ngoại bào (Extracellular polymeric substances-EPs)¹⁹.

So sánh chọn lựa các chủng vi khuẩn tiềm năng

Dựa vào kết quả về các đặc điểm kích thích tăng trưởng của các chủng khuẩn được phân lập, trong các chủng phân lập từ vùng rễ cây bắp thì BT00S02, BT00P03 và BT00P04 là có đầy đủ các đặc tính như sinh IAA, cố định đạm và hòa tan phosphate. Tuy nhiên, khi xét về kết quả nồng độ IAA và cũng như chỉ số hòa tan phosphate thì 2 chủng BT00S02 và BT00P03 có ưu thế hơn so với chủng BT00P04. Trong 6 chủng vi khuẩn được phân lập từ cây đậu phộng, cây khoai lang và cây dưa cạn, 4 chủng BT01S02, BT01P01, BT02P01 và BT03S03 có đầy đủ 3 khả năng sinh hóa là sinh IAA, cố định đạm và hòa tan phosphate. Có thể thấy, chủng BT03S03 có khả năng hòa tan phosphate cao hơn so với chủng BT02E01 nhưng sự khác nhau không quá lớn, tuy nhiên chủng BT02E01 sinh ra nồng độ IAA cao hơn hẳn so với BT03S03. Vì vậy, 3 chủng BT00S02, BT00P03 và BT02E01 được chọn lọc để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Cả 3 chủng này đều cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi chuyên biệt cho *Pseudomonas*.

Các chủng *Pseudomonas* phân lập từ vùng rễ và các mẫu đất nông nghiệp được đánh giá tương đối an toàn với người và động vật. Mặc dù mỗi loài thực vật có hiệu ứng chọn lọc khác nhau lên độ đa dạng của quần xã vi sinh vật vùng rễ, *P. fluorescens* và *P. putida* vẫn là những loài chiếm ưu thế nhất²⁰. Nhiều chế phẩm thương mại từ 2 loài này đã được ứng dụng rộng rãi. Một số trường hợp *P. putida* gây bệnh cho người đã được ghi nhận, tuy nhiên, số ca này là rất hiếm và hầu hết gặp ở những người suy giảm miễn dịch²¹. Một thành viên khác thuộc chi này là *P. aeruginosa* có tiềm năng rất lớn trong việc thúc đẩy tăng trưởng thực vật và khả năng đối kháng mạnh mẽ với các tác nhân gây bệnh vùng rễ. Không giống như *P. fluorescens* và *P. putida*, một số chủng *P. aeruginosa* là tác nhân gây bệnh cơ hội trên người²¹. Vi khuẩn này phân bố rộng rãi trong nguồn nước, đất và thậm chí là trong một số loại thực phẩm. Tuy nhiên, mức độ rủi ro gây ra bởi vi khuẩn này không lớn và chỉ được xếp vào nhóm nguy

cơ an toàn sinh học cấp II. Hơn nữa, không phải tất cả các chủng thuộc loài này đều có khả năng gây bệnh liên quan đến sự vắng mặt của các gene gây bệnh trong genome. Tóm lại, các chủng PGPR thuộc chi *Pseudomonas* có thể ứng dụng rộng rãi trong thực hành nông nghiệp với mức độ rủi ro thấp và có khả năng kiểm soát.

Sự hiện diện gene mã hóa ACC deaminase

Nhằm xác định sự hiện diện gene mã hóa ACC deaminase trong các chủng tiềm năng, phản ứng PCR nhằm khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu cho gene này ở *Pseudomonas* được thực hiện theo quy trình của Sheehy và cộng sự (1991)²². Ngoài ra, D. Saravanakumar và R. Samiyappan (2006) đã chứng minh được cặp mồi này là một cặp mồi đặc trưng cho *Pseudomonas fluorescens*²³. Kết quả điện di trên Hình 2 cho thấy sản phẩm mục tiêu khoảng 750 bp xuất hiện ở cả 3 chủng được chọn.

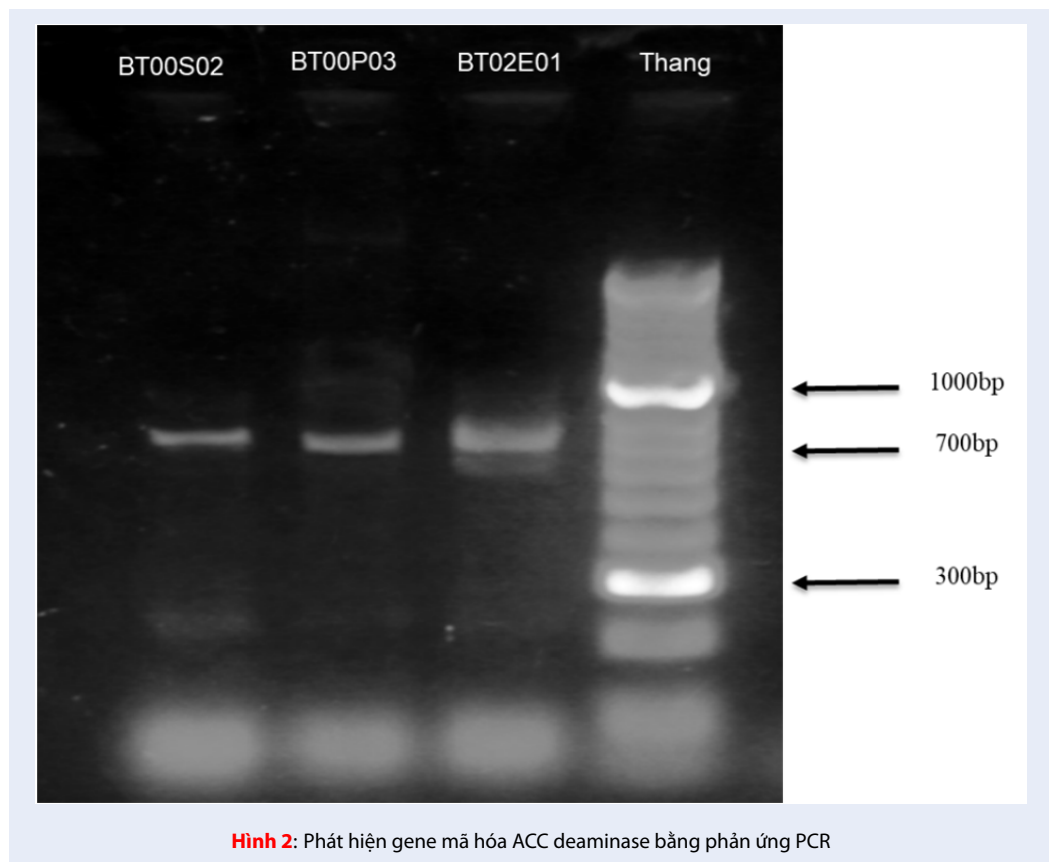
Khảo sát khả năng kích thích tăng trưởng cây đậu phộng

Trong thí nghiệm này, tiềm năng của các chủng vi khuẩn trong việc hỗ trợ thực vật chống chịu với stress mặn sẽ được đánh giá trên mô hình cây nông nghiệp. So với cây bắp, chỉ nhạy cảm với stress mặn ở mức độ trung bình²⁴, thì cây đậu phộng là một loại rất nhạy cảm với stress mặn^{5,6}. Do đó, mặc dù 3 chủng được chọn có nguồn gốc từ rễ cây bắp và cây dưa cạn, nhưng trong thí nghiệm này cây đậu phộng đã được chọn làm mô hình để tiến hành các thử nghiệm đáp ứng với stress.

Thử nghiệm in vitro: Trong điều kiện thường, cây được xử lý với chủng vi khuẩn BT00P03 cho thấy sự kích thích tăng trưởng thể hiện ở sự gia tăng khối lượng tươi toàn cây (tăng 30%), khối lượng thân (tăng 37%) và khối lượng rễ (tăng 13%) so với đối chứng. Trái lại, chủng vi khuẩn BT02E01 lại cho thấy dấu hiệu ức chế lên sự phát triển của cây trong khi cây được xử lý với chủng BT00S02 lại không cho thấy sự khác biệt so cây đối chứng (Hình 3A và Bảng 2). Tuy nhiên, trong điều kiện stress mặn, tất cả các nghiệm thức được xử lý vi khuẩn đều cho thấy có sự gia tăng khối lượng của cây so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nghiệm thức được xử lý với chủng vi khuẩn BT00P03 cho hiệu quả cao nhất (Hình 3B và Bảng 2). Điều này cho thấy vi khuẩn có khả năng làm giảm tác động của stress mặn lên sự tăng trưởng của cây đậu phộng.

Thử nghiệm trong chậu trồng ngoài vườn ươm:

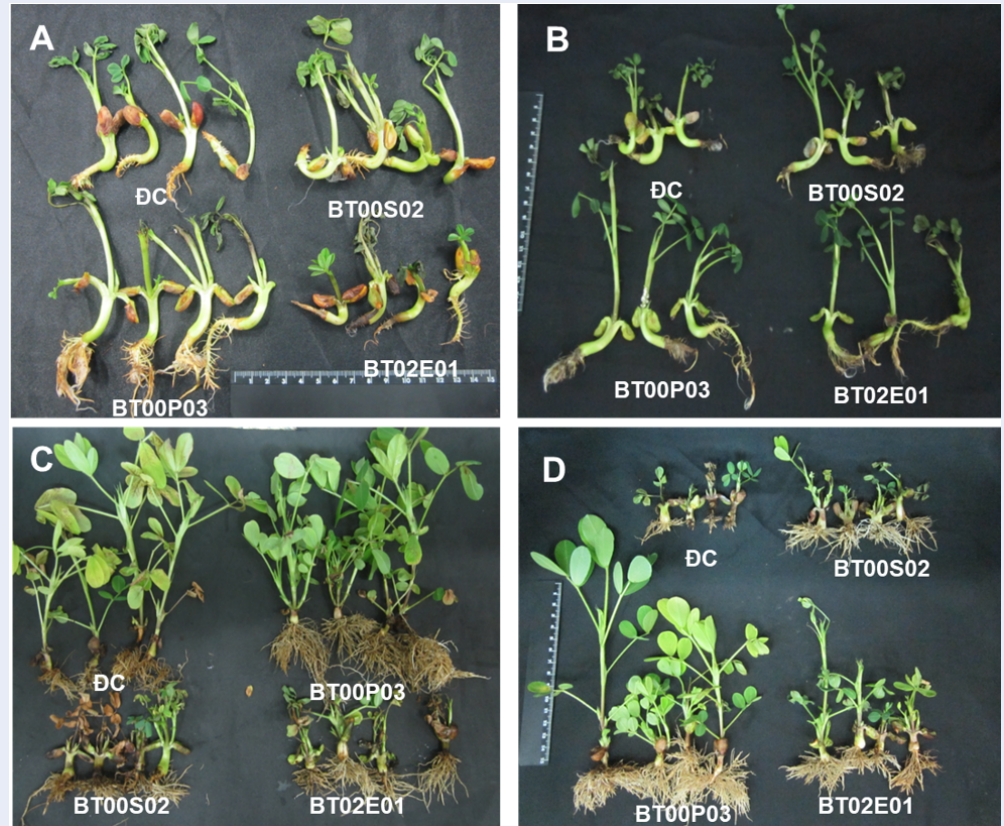
Trong điều kiện thường, các cây được xử lý với chủng BT00P03 có sự gia tăng khối lượng thân và rễ lần lượt



Bảng 2: Tác động của vi khuẩn lên khối lượng tươi cây đậu phộng trồng trên MS $\frac{1}{2}$ và MS $\frac{1}{2}$ bổ sung 100 mM NaCl sau 4 tuần gieo hạt trong điều kiện *in vitro*.

Nghịệm thức	Khối lượng tổng (mg)		Khối lượng thân (mg)		Khối lượng rễ (mg)	
	0 mM NaCl	100 mM NaCl	0 mM NaCl	100 mM NaCl	0 mM NaCl	100 mM NaCl
Đối chứng (ĐC)	2308,3 ^b ±266,0	2046,1 ^b ±300,6	1625,0 ^b ±113,4	1661,4 ^b ±266,7	683,2 ^a ±179,0	384,7 ^b ±97,4
BT00S02	2237,4 ^b ±367,5	2281,3 ^{ab} ±70,3	1799,6 ^b ±214,1	1789,6 ^b ±146,0	437,8 ^b ±157,3	491,7 ^a ±91,4
BT00P03	2991,3 ^a ±183,7	2629,6 ^a ±27,4	2218,6 ^a ±202,6	2011,9 ^a ±97,2	772,7 ^a ±276,7	617,7 ^a ±52,7
BT02E01	1466,0 ^c ±94,7	2463,1 ^{ab} ±344,8	1171,5 ^c ±139,9	1927,9 ^b ±396,9	294,5 ^c ±52,7	535,2 ^a ±55,3

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p \leq 0,05$



Hình 3: Hình thu hoạch cây đậu phộng trong tương tác với các chủng vi khuẩn (Trong đó, A: Điều kiện in vitro không stress; B: Điều kiện in vitro stress mặn; C: Điều kiện tự nhiên không stress; D: Điều kiện tự nhiên stress mặn)

là 54% và 278% so với cây đối chứng. Trái lại, các cây được xử lý với chủng BT00P02 và BT02E01 lại cho thấy sự giảm nhẹ về khối lượng so với cây đối chứng (Hình 3C và Bảng 3). Trong điều kiện stress mặn, tất cả các cây được xử lý với vi khuẩn đều có khối lượng tươi cao hơn so với cây đối chứng (Hình 3D và Bảng 3). Kết quả thí nghiệm cho thấy sự phù hợp giữa điều kiện thử nghiệm *in vitro* và điều kiện thử nghiệm trong vườn ươm. Như vậy, chủng BT00P03 không những có hiệu quả kích thích tăng trưởng cây đậu phộng trong điều kiện thường mà còn có khả năng cải thiện tăng trưởng của cây trong điều kiện stress mặn. Trong khi đó, 2 chủng còn lại chỉ có hiệu quả tích cực trong điều kiện stress mà không cho thấy hiệu quả ứng dụng trong điều kiện thường. Từ những kết quả trên, chủng BT00P03 đã cho thấy là một chủng tiềm năng trong việc sản xuất phân bón vi sinh giúp cải thiện năng suất cây trồng kể cả trong điều kiện thường hay điều kiện stress mặn.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phân lập được 7 chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* từ Bến Tre, có khả năng sống trên điều kiện mặn. Trong đó 3 chủng vi khuẩn BT00S02, BT00P03 và BT02E01 được chọn lọc dựa trên khả năng hòa tan phosphate, cố định đạm và sản sinh IAA. Chủng vi khuẩn BT00P03 có khả năng kích thích tăng trưởng cây đậu phộng cả trong điều kiện bình thường và điều kiện stress mặn, cho thấy tiềm năng của chủng này trong thực hành nông nghiệp bền vững. Tuy nhiên, trước khi đưa vào ứng dụng rộng rãi hoặc thương mại hóa, chủng vi khuẩn BT00P03 cần được tiến hành đánh giá về nguy cơ gây bệnh trên người và động vật, cũng như tác động lên môi trường sinh thái. Việc định danh tới mức độ loài, tầm soát sự hiện diện của các gene gây bệnh trong bộ gene cũng như thử nghiệm trên mô hình động vật sẽ cung cấp những bằng chứng xác thực về mức độ rủi ro gây ra bởi chủng này.

DANH MỤC VIẾT TẮT

ACC: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

Bảng 3: Tác động của vi khuẩn lên khối lượng tươi cây đậu phộng trồng trong đất và đất bổ sung 75 mM NaCl sau 40 ngày gieo hạt

Thí nghiệm	Khối lượng tổng (mg)		Khối lượng thân (mg)		Khối lượng rễ (mg)	
	0 mM NaCl	75 mM NaCl	0 mM NaCl	75 mM NaCl	0 mM NaCl	75 mM NaCl
Đối chứng (ĐC)	2682,5 ^b ± 29,2	1562,6 ^b ± 215,9	2184,9 ^b ± 122,4	1229,9 ^b ± 117,8	555,1 ^b ± 32,5	332,8 ^b ± 98,4
BT00S02	2019,7 ^c ± 64,5	2616,5 ^a ± 523,3	1484,8 ^c ± 22,1	1485,2 ^b ± 213,0	534,9 ^b ± 76,4	891,3 ^a ± 346,5
BT00P03	5468,4 ^a ± 48,3	2666,7 ^a ± 310,5	3368,3 ^a ± 182,4	1880,2 ^a ± 214,4	2100,1 ^a ± 134,6	786,5 ^a ± 101,1
BT02E01	2002,7 ^c ± 61,8	2194,9 ^a ± 134,7	1437,4 ^c ± 158,9	1441,8 ^b ± 142,3	559,4 ^b ± 14,4	606,1 ^a ± 56,1

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p \leq 0,05$

bp: base pair

ĐC: Đối chứng

EPSs: Extracellular polymeric substances

IAA: Indole-3-acetic acid

IST: inducing systemic tolerance

MNFM: Nitrogen Free Mineral Medium

PCR: Polymerase chain reaction

PGPR: Plant growth promoting rhizobacteria

OD: Optical Density

TSB: Tryptone Soya Broth

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả công bố không có sự xung đột về lợi ích.

ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Chu Nguyên Thanh, Phạm Văn Nhứt Tiếng và Hoàng Thị Thanh Minh thiết kế thí nghiệm, tiến hành thí nghiệm, thu thập số liệu, xử lý kết quả, tham gia viết bài. Bùi Văn Lệ cố vấn về thiết kế thí nghiệm.

Chu Nguyên Thanh và Phạm Văn Nhứt Tiếng đóng góp như nhau.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia - TP. Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số C2018-18-19 và TWAS 16-142 RG/BIO/AS_I-FR3240293339.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Das P, Nutan KK, Singla-Pareek SL, Pareek A. Understanding salinity responses and adopting 'omics-based' approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice. *Front Plant Sc.* 2015;6:1–16. Available from: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00712>.
- Shrivastava P, Kumar R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22(2):123–131. PMID: 25737642. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>.
- Chu TN, Tran BTH, Bui VL, Hoang M. Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in

Arabidopsis thaliana. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):1–7. PMID: 30635071. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4046-1>.

- Le PN, Chu TN, Hoang MTT. Đánh giá tính kháng mặn của *Arabidopsis thaliana* cảm ứng bởi vi khuẩn vùng rễ phân lập tại rừng ngập mặn Cần Giờ. 2017;20-:64–74.
- Goswami D, Dhandhukia P, Patel P, Thakker JN. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiol Res.* 2014;169(1):66–75. PMID: 23896166. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.004>.
- Sharma S, Kulkarni J, Jha B. Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Front Microbiol.* 2016;7(OCT):1–11. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01600>.
- Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Giovanni GD. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(7):2545–2553. PMID: 9647828. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2545-2553.1998>.
- Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(2):793–796. PMID: 16534942. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.793-796.1995>.
- Wright SF, Weaver RW. Enumeration and Identification of Nitrogen-Fixing Bacteria from Forage Grass Roots Enumeration and Identification of Nitrogen-Fixing Bacteria from Forage Grass Roots. . 1981;42(1):97–101. PMID: 16345819. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.42.1.97-101.1981>.
- Damodaran T, Sah V, Rai RB, Sharma DK, VK M, Jha SK, et al. 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.* 2013;7(44):5082–5089.
- Saravanakumar D, Samiyappan R. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *J Appl Microbiol.* 2007;102(5):1283–1292. PMID: 17448163. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x>.
- Yadav S, Yadav S, Kaushik R, Saxena AK, Arora DK. Genetic and functional diversity of fluorescent *Pseudomonas* from rhizospheric soils of wheat crop. *J Basic Microbiol.* 2014;54(5):425–437. PMID: 23681594. Available from: <https://doi.org/10.1002/jobm.201200384>.
- Kim J, Mele P, Crowley D. Application of PCR primer sets for detection of *Pseudomonas* sp. functional genes in the plant

- rhizosphere. *J Agric Chem.* 2013;2(1):8–15. Available from: <https://doi.org/10.4236/jacen.2013.21002>.
14. Malik DK, Sindhu SS. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: Effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol Mol Biol Plants.* 2011;17(1):25–32. PMID: 23572992. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0041-7>.
 15. Bui TV. Sinh lý thực vật. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh. 2016;p. 198.
 16. Egamberdieva D. The Role of Phytohormone Producing Bacteria in Alleviating Salt Stress in Crop Plants. *Res Gate.* 2015;p. 20–39.
 17. Egamberdieva D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiol Plant.* 2009;31(4):861–864. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0297-0>.
 18. Rubio LM, Ludden PW. Biosynthesis of the Cofactor of Nitrogenase. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62(3):93–111. PMID: 18429691. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162737>.
 19. Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus.* 2013;2(1):1–14. PMID: 25674415. Available from: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.
 20. Botelho GR, Mendonça-hagler LC. Fluorescent *Pseudomonas* associated with the rhizosphere of crops- An overview. *Brazilian J Microbiol.* 2006;p. 401–416. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400001>.
 21. Fernández M, Porcel M, de la Torre J, Molina-Henares MA, Daddaoua A, Llamas MA, et al. Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. *Front Microbiol.* 2015;6(AUG):1–11. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00871>.
 22. Sheehy RE, Honma M, Yamada M, Sasaki T, Martineau B, Hiatt W. Isolation, Sequence, and Expression in *Escherichia-Coli* of the *Pseudomonas* Sp Strain Acp Gene Encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase. *J Bacterio; ST-ISOLATION, SEQUENCE, AND EXPRESSIO.* 1991;173(17):5260–5265. PMID: 1885510. Available from: <https://doi.org/10.1128/JB.173.17.5260-5265.1991>.
 23. Saravanakumar D, Samiyappan R. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *J Appl Microbiol.* 2007;102(5):1283–1292. PMID: 17448163. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x>.
 24. Zörb C, Schmitt S, Neeb A, Karl S, Linder M, Schubert S. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Sci.* 2004;167(1):91–100. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.004>.

Isolation and screening of *Pseudomonas* isolates enhance salinity tolerance of peanut (*Arachis hypogaea* L.)

Chu Nguyen Thanh, Pham Van Nhut Tieng, Bui Van Le, Hoang Thi Thanh Minh*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

The application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) is one of the most promising alternative approaches to improve plant growth under salt stress. Among PGPR, *Pseudomonas* is a bacterial genus that possesses a variety of mechanisms for plant growth promoting and induction of biotic as well as abiotic stress tolerance. In this study, we screened 3 potential strains and tested growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea*) under saline condition. All 3 isolates (strains) showed *in vitro* plant growth promoting traits such as production of indoleacetic acid (IAA), phosphate solubilization and nitrogen fixation. Moreover, the 3 isolates present gene encoding ACC deaminase, an important enzyme can promote plant growth to ameliorate abiotic stresses. Peanut inoculated with the strain BT00P03 showed the increase in fresh shoot biomass in normal and saline stress conditions. Our results showed that the BT00P03 strain may be used as a biological agent for eco-friendly agricultural practices. This research is the first step to understand the microbe-plant interaction mechanism under stress and to apply these strains to agricultural practices in the future.

Key words: peanut, PGPR, *Pseudomonas*, salt stress tolerance

University of Science, VNU-HCM

Correspondence

Hoang Thi Thanh Minh, University of Science, VNU-HCM

Email: httminh@hcmus.edu.vn

History

- Received: 30-8-2019
- Accepted: 13-11-2019
- Published: 20-3-2020

DOI : 10.32508/stdjns.v4i1.834



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Nguyen Thanh C, Van Nhut Tieng P, Van Le B, Thi Thanh Minh H. **Isolation and screening of *Pseudomonas* isolates enhance salinity tolerance of peanut (*Arachis hypogaea* L.).** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(1):347-356.