

SÀNG LỌC *IN VITRO* VI KHUẨN NỘI SINH RỄ LÚA NƯỚC CÓ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ KHÁNG NẤM ĐẠO ÔN *MAGNAPORTHE ORYZEA*

Nguyễn Văn Phượng^{1,2*}, Mai Thị Phương Nga², Tô Thị Mai Hương²,
Mai Đức Chung³, Chu Hoàng Hà⁴, Lê Trần Bình⁴

¹ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Khoa Khoa học sự sống, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Viện Di truyền Nông nghiệp

⁴ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Vi khuẩn nội sinh thực vật (EB) có rất nhiều ưu điểm tốt như các tính trạng kích thích sinh trưởng (PGP) và khả năng ức chế các tác nhân gây bệnh ở thực vật. Trong nghiên cứu này, bộ sưu tập gồm 77 chủng EB đã được phân lập từ rễ lúa nước, giống Bắc Thơm số 7 (BT7), ở Hải Dương. Khả năng tổng hợp IAA được xác định ở 65/77 chủng, chiếm 84,4%. Trong đó, 3 chủng TP9, TP10 và TP31 có khả năng tổng hợp IAA với hàm lượng cao nhất. Hàm lượng ammonia được tổng hợp từ 74/77 chủng nằm trong khoảng $5,52 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ đến $205,36 \pm 0,95 \mu\text{g/mL}$. Trong đó, chủng TP17 có khả năng tổng hợp ammonia với hàm lượng cao nhất, đạt $205,36 \mu\text{g/mL}$. Có 67/77 chủng EB cho thấy khả năng tổng hợp siderophore, tạo vòng tròn vàng cam quanh khuẩn lạc có đường kính từ 1 đến trên 50 mm. Đặc biệt, tất cả 77 chủng EB đều có khả năng phân giải phosphate vô cơ. Chỉ số phân giải phosphate (PSI) giao động trong khoảng 1,12 - 2,5. Trong số, này có 14 chủng, chiếm 18,18%, có chỉ số PSI > 2. Từ 77 chủng có 72 chủng có khả năng ức chế sự sinh trưởng của nấm *Magnaporthe oryzae*. Tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng (I) nằm trong khoảng từ $0,61 \pm 0,05$ đến $64,75 \pm 1,66$. Trong đó có 24 chủng, chiếm 31,17%, thuộc nhóm các chủng có I $\geq 50\%$ trở lên. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy các chủng vi khuẩn nội sinh rễ lúa BT7 cùng lúc vừa có nhiều tính trạng PGP vừa có khả năng ức chế nấm gây bệnh đạo ôn trong điều kiện *in vitro*. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu xa hơn *in planta* trong điều kiện nhà lưới và ruộng thực nghiệm nhằm tìm ra các chủng thực sự có nhiều ưu điểm hướng tới phát triển thành chế phẩm vi sinh phục vụ trong sản xuất nông nghiệp theo hướng bền vững và thân thiện với môi trường.

Từ khóa: *Magnaporthe oryzae*, Phân giải phosphate, Tổng hợp ammonia, Tổng hợp IAA, Tổng hợp siderophore, Vi khuẩn nội sinh thực vật.

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, Việt Nam vươn lên thành nước thứ hai trên thế giới sau Thái Lan về xuất khẩu lúa gạo. Năng suất và chất lượng trở thành áp lực khiến nông dân sử dụng quá nhiều thuốc bảo vệ thực vật và phân bón hóa học nhằm đảm bảo sản lượng cung cấp trong nước và xuất khẩu. Việc sử dụng phân bón hóa học và thuốc bảo vệ thực vật quá nhiều trong nông nghiệp trực tiếp hay gián tiếp dẫn đến ô nhiễm môi trường và các tác động xấu đối với hệ sinh thái tự nhiên và sức khỏe con người.

Vi khuẩn nội sinh thực vật (Endophytic bacteria - EB) không những không gây hại cho cây mà ngược lại giúp cây sinh trưởng, phát triển tốt, khỏe mạnh nhờ các đặc tính tốt của chúng như: khả năng cố định đạm (Ladha, Reddy, 2003), phân giải phosphate khó tan (Verma *et al.*, 2011), tổng hợp các loại hormone thực vật như IAA (Bal *et al.*, 2013) hay một số chất thứ cấp như siderophore vừa có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật vừa có khả năng ức chế lại các loại vi sinh vật gây bệnh trên cây trồng (Verma *et al.*, 2011; Sayyed *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn nội sinh rễ lúa nước có các tính chất kích thích sinh trưởng thực vật và có khả năng kiểm soát bệnh đạo ôn ở lúa nhằm phát triển thành phân bón vi sinh trong tương lai.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Địa điểm thu mẫu và phân lập vi khuẩn nội sinh rễ lúa

Mẫu rễ lúa được thu tại thửa ruộng ngập nước có diện tích 360 m² (tương đương 1 sào Bắc Bộ) tại thôn Thủ Pháp, xã Đoàn Kết, huyện Thanh Miện, tỉnh Hải Dương (tọa độ 20°47'20,75" : 106°09'42,70"). Đây là thửa ruộng được cấy giống lúa Bắc thơm số 7 (BT7) nằm trong cánh đồng rộng hơn chục hecta có hệ thống thủy lợi chủ động phục vụ tưới tiêu. Việc thu mẫu, xử lý mẫu và khử trùng bề mặt để phân lập EB được thực hiện theo phương pháp mà Bertani và đồng tác giả (2016) đã mô tả, có cải biến và bổ sung cho phù hợp với điều kiện hiện hành. Cụ thể, mẫu rễ lúa được thu tại thời điểm lúa bắt đầu đẻ nhánh. Các điểm thu mẫu nằm trên đường chéo của thửa ruộng, cách nhau 30 m và cách bờ thửa 10 m. Tại mỗi điểm, thu 3 khóm lúa khác nhau bằng cách dùng tay lách nhẹ hàng để thu được toàn bộ hệ rễ của khóm lúa. Cho mỗi khóm lúa vào túi ni-lon kín miệng rồi đặt

trong thùng đá và vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập vi khuẩn. Các mẫu rễ lúa được loại bỏ hoàn toàn đất bùn bằng nước vòi, sau đó ngâm rễ lúa trong cồn 75% trong 2 phút. Tiếp theo, ngâm trong dung dịch 50% nước javel thương phẩm (khoảng 4% NaOCl) trong 2 phút có bổ sung 2 - 3 giọt Tween 20. Sau đó lại ngâm trong cồn 75% trong 1 phút. Cuối cùng rửa bằng nước cất vô trùng 5 - 6 lần. Để chắc chắn quá trình khử trùng đạt hiệu quả cao, loại bỏ hoàn toàn vi sinh vật bám trên bề mặt rễ, một phần nước rửa lần cuối được cấy trải trên môi trường đặc 1/6TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Mỹ) và nuôi trong môi trường lỏng 1/6TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Mỹ). Kiểm tra sự xuất hiện vi sinh vật trên đĩa môi trường và bình nuôi lỏng sau khi nuôi cấy 3 ngày ở 28°C. Ngoài ra, rễ sau khi khử trùng được thấm khô bằng giấy thấm vô trùng và đặt trên đĩa môi trường 1/6TSA. Các đĩa này được nuôi cấy trong điều kiện như trên và kiểm tra sự xuất hiện vi sinh vật sau 3 ngày. Rễ lúa đã khử trùng bề mặt được nghiền bằng chày, cối sứ vô trùng trong 10 mL dung dịch PBS (Phosphate Buffer Solution). Dịch nghiền được pha loãng ra 10 lần, 100 lần rồi cấy trải lên đĩa môi trường 1/6 TSA và nuôi cấy ở điều kiện 28°C đến 3 ngày. Các khuẩn lạc tách biệt nhau và khác nhau về hình thái và màu sắc được cấy vạch sang đĩa môi trường 1/6 TSA mới cho đến khi nhận được các khuẩn lạc thuần và được lưu giữ ở -80°C trong môi trường 1/6 TSA có chứa 18% glycerol.

Phương pháp sàng lọc các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng kích thích sinh trưởng *in vitro*

Các chủng (EB) được khảo sát các tính trạng kích thích sinh trưởng (PGP - Plant Growth Promoting) *in vitro* như khả năng tổng hợp Indole-3-acetic acid (IAA), ammonia, siderophore và khả năng phân giải phosphate khó tan.

Khả năng tổng hợp IAA được định tính theo phương pháp nhuộm màu như Wuryanto và đồng tác giả (2018) đã mô tả, có cải biến và bổ sung. Cụ thể, nhỏ 20 µL dịch khuẩn OD₆₀₀ = 1 vào chính giữa đĩa môi trường 1/6TSA có bổ sung 1,021 g/L L-Tryptophan, sau đó dùng 1 đĩa giấy thấm vô trùng với đường kính 20 mm đặt lên trên giọt dịch khuẩn sao cho dịch khuẩn thấm đều đĩa giấy. Sau 72h nuôi ở 28°C, các đĩa giấy được nhuộm bằng 100 µL dung dịch Salkowski (Glickmann, Dessaux, 1995) và ủ trong tối 30 phút. Sau đó, kiểm tra sự chuyển màu ở đĩa giấy thấm. Tùy theo hàm lượng IAA, các đĩa giấy sẽ có màu từ hồng nhạt đến hồng đậm. Đối chứng dương là chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp.

Khả năng tổng hợp ammonia được khảo sát bằng phương pháp định tính và định lượng như đã được mô tả bởi Malleswari và Bagyanarayana (2013).

Khả năng tổng hợp siderophore của các chủng EB được định tính theo phương pháp sử dụng thuốc thử Chrome Azurol S (CAS) (Schwyn, Neilands, 1987; Alexander, Zuberer, 1991). Dùng que cấy khuẩn vô trùng lấy 1 khuẩn lạc chấm lên đĩa môi trường CAS và nuôi ở 28°C trong 7 ngày. Vi khuẩn có khả năng tổng hợp siderophore sẽ tạo thành màu vàng cam quanh khuẩn lạc. Đường kính vòng tròn màu vàng cam phụ thuộc vào hàm lượng siderophore được tổng hợp.

Khả năng phân giải phosphate khó tan của các chủng EB được khảo sát theo phương pháp định tính trên đĩa môi trường NBRIIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (Nautiyal, 1999). Trên đĩa vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate sẽ xuất hiện vòng tròn phân giải bao quanh khuẩn lạc. Chỉ số phân giải phosphate (Phosphate Solubilization Index - PSI) được tính theo công thức: $PSI = (\text{Đường kính vùng phân giải}) / \text{Đường kính khuẩn lạc}$ (Pandey *et al.*, 2017).

Tất cả các thí nghiệm trên đều được lặp lại ba lần.

Phương pháp sàng lọc các chủng EB có khả năng ức chế nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa

Tất cả các chủng EB được sàng lọc khả năng ức chế sự sinh trưởng của nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa bằng phương pháp nuôi cấy song song trên cùng một đĩa môi trường 1/6TSA. Chủng nấm gây bệnh đạo ôn *Magnaporthe oryzae* 007-6, do phòng thí nghiệm quốc tế LMIRICE2 cung cấp được dùng trong thí nghiệm này. Dùng các đĩa giấy thấm vô trùng đường kính 6 mm đặt xung quanh chủng nấm nhằm mục đích cho các sợi nấm mọc đều trên các đĩa giấy. Sau đó, chuyển mỗi đĩa giấy mang nấm đặt vào chính giữa đĩa môi trường 1/6TSA, đồng thời đặt 4 đĩa giấy thấm vô trùng đường kính 6 mm xung quanh và cách đĩa giấy nấm 2 cm. Nhỏ lên mỗi đĩa giấy thí nghiệm 10 µL dịch khuẩn ở pha log (OD₆₀₀ = 1). Mỗi đĩa thí nghiệm thử với một chủng EB. Đĩa thí nghiệm được nuôi cấy ở 28°C trong 5 ngày, hoặc đến khi nấm ở đĩa đối chứng (không có vi khuẩn) mọc lan ra toàn bộ bề mặt đĩa. Khả năng ức chế sinh trưởng của nấm được tính theo công thức: $I = [(C - T)/C] \times 100$, trong đó I là tỉ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng (% Inhibition), C và T là bán kính của nấm mọc trên đĩa đối chứng và đĩa thí nghiệm tương ứng. Các chủng vi khuẩn có tỉ lệ ức chế trung bình từ 50% trở lên sẽ được chọn để thử nghiệm *in planta* sau này (Dinesh *et al.*, 2015). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp thống kê phân tích số liệu

Các số liệu được phân tích trên phần mềm Microsoft Excel khi áp dụng phương pháp ANOVA.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn nội sinh rễ lúa

Vi khuẩn nội sinh rễ lúa (EB) được phân lập từ rễ của giống lúa BT7 ở giai đoạn đẻ nhánh. Có 77 chủng EB đã được phân lập từ 9 mẫu rễ lúa. Các chủng vi khuẩn này sinh trưởng rất tốt trên môi trường 1/6 TSA sau 24 - 48 giờ nuôi cấy ở 28°C. Khuẩn lạc có dạng hình tròn, bìa nguyên và nhô cao chiếm ưu thế, còn lại là dạng không đều, bìa cưa, lồi. Màu sắc khuẩn lạc tương đối đa dạng, gồm màu vàng nhạt, vàng đậm, trắng đục, trắng

trong và tím nâu (Hình 1; Bảng 1). Đường kính của khuẩn lạc sau 48 h nuôi cấy trên môi trường 1/6TSA chủ yếu dao động từ 1 - 5 mm. Có một số chủng mọc rất nhanh, lan rộng trên bề mặt môi trường. Tất cả 77 chủng EB được ký hiệu là TP và gắn thêm số thứ tự. Các chủng EB được lưu giữ ở -80°C để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

Sàng lọc *in vitro* các chủng EB có khả năng kích thích sinh trưởng

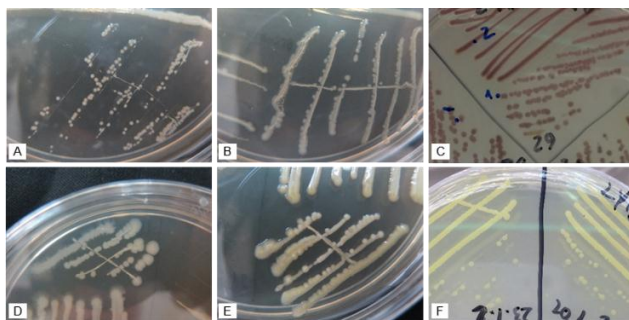
Vi khuẩn nội sinh có khả năng kích thích sinh trưởng ở thực vật thông qua các quá trình chuyển hóa chất dinh dưỡng và muối khoáng. Qua đó chúng chuyển hóa, tạo ra các chất dinh dưỡng có lợi cho thực vật như khả năng tổng hợp IAA, ammonia, siderophore hay khả năng phân giải phosphate khó tan thành dạng tan giúp cho thực vật dễ dàng hấp thụ nguồn dinh dưỡng quan trọng cho sinh trưởng và phát triển (Spaepen *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2011). Kết quả sàng lọc các tính trạng kích thích sinh trưởng được tổng hợp trong Bảng 2.

Hormone thực vật auxin, trong đó có IAA, đóng vai trò then chốt trong sinh trưởng và phát triển của thực vật. IAA ảnh hưởng đến các quá trình phân chia, biệt hóa tế bào, kích thích ra rễ và các quá trình điều hòa sinh trưởng sinh dưỡng của cây (Glick, 2012). Trong nghiên cứu này, khả năng tổng hợp IAA của các chủng EB trên môi trường có bổ sung chất cảm ứng L-Tryptophan được khảo sát đối với 77 chủng EB. Kết quả cho thấy, có 65 chủng EB có khả năng tổng hợp IAA *in vitro*, chiếm 84,4%. Chỉ có 12 chủng là không có khả năng tổng hợp IAA *in vitro*, chiếm 15,6%. Dựa vào mức độ màu biểu hiện, 65 chủng có khả năng tổng hợp IAA *in vitro* được chia làm 3 nhóm với 3 mức độ tổng hợp IAA: thấp, trung bình và cao. Trong đó, nhóm trung bình và cao có 15 chủng, đặc biệt là 3 chủng TP9, TP10 và TP31 có khả năng tổng hợp IAA với hàm lượng cao nhất (Bảng 2). Ở các chủng này, đĩa giấy có màu hồng đậm (Hình 2A). Theo kết quả phân tích trình tự gene 16S RNA, 2 chủng TP9 và TP10 thuộc nhóm vi khuẩn *Bacillus*, còn chủng TP31 thuộc họ *Pseudomonas* (Kết quả chưa được công bố). Kết quả này là tiền đề cho việc định lượng IAA được tổng hợp sau này.

Vi khuẩn EB có khả năng chuyển hóa ni-tơ tự do thành ammonia hoặc các dạng hợp chất khác của ni-tơ, giúp cho cây dễ dàng hấp thụ luôn là một trong những yếu tố quan trọng đối với thực vật (Hayat *et al.*, 2010). Việc tổng hợp ammonia cũng đóng vai trò gián tiếp trong cơ chế kích hoạt khả năng ức chế tác nhân gây bệnh ở thực vật (Borah *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu này, hàm lượng ammonia được tổng hợp bởi 74 chủng EB dao động từ 5,52 ± 0,04 đến 205,36 ± 0,95 µg/mL. Đặc biệt, chủng TP17, thuộc họ *Pseudomonas*, có khả năng tổng hợp được ammonia với hàm lượng cao nhất, đạt 205,36 µg/mL. Ngoài ra, có 5 chủng có thể tổng hợp được trên 100 µg/mL (Bảng 2) (Kết quả giải trình tự chưa được công bố).

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh rễ lúa

Đặc điểm khuẩn lạc	Tính chất	Số lượng	Tỉ lệ (%)
Màu sắc	Vàng nhạt	20	25,97
	Vàng đậm	15	19,48
	Trắng đục	38	49,35
	Trắng trong	2	2,6
	Nâu tím	2	2,6
Hình dạng	Tròn, bìa nguyên, nhô	32	41,56
	Không đều, bìa thưa, lồi	45	58,44



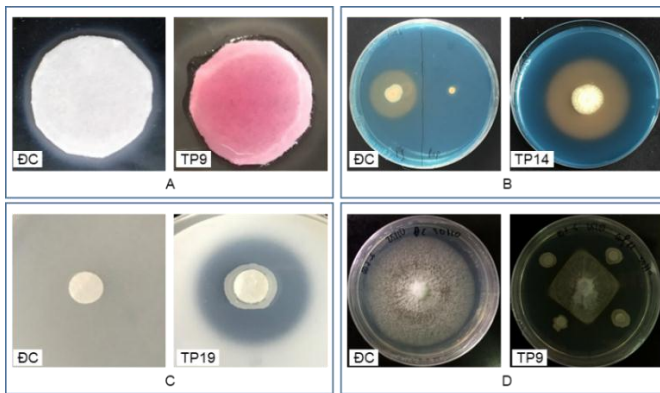
Hình 1. Một số hình ảnh khuẩn lạc phân lập được

A- khuẩn lạc màu trắng đục, bìa nguyên, đường kính 1mm;
 B- khuẩn lạc trắng tròn, nhô, bìa nguyên, đường kính 2mm;
 C- khuẩn lạc có màu nâu, bìa nguyên, đường kính 3mm,
 D- khuẩn lạc màu trắng đục, nhô, bìa thưa, đường kính 5mm;
 E- khuẩn lạc màu trắng đục, nhô cao, nhô, bìa nguyên, đường kính 3mm;
 F- khuẩn lạc màu vàng, tròn, bìa nguyên, đường kính 2mm.

Sắt (Fe) là một trong những nguyên tố thiết yếu đối với sinh vật, trong đó có thực vật. Do đó, khan hiếm sắt trong đất sẽ gây nên sự cạnh tranh gay gắt. Trong điều kiện thiếu sắt, vi sinh vật sẽ tổng hợp siderophore nhằm cạnh tranh hấp thụ sắt về mình (Compant *et al.*, 2005). Trong nghiên cứu này, các chủng EB cũng có khả năng tổng hợp siderophore với hàm lượng tương đối cao. Có 67/77 chủng EB có khả năng tổng hợp siderophore. Đường kính vòng tròn màu cam xung quanh khuẩn lạc dao động từ 1 đến trên 50 mm. Dựa vào chỉ số này, 67 chủng trên có thể được tạm chia thành 3 nhóm theo mức độ tổng hợp siderophore: thấp, trung bình và cao (Bảng 2). Các chủng có khả năng tổng hợp siderophore với hàm lượng thuộc nhóm trung bình và cao sẽ được quan tâm

cho các nghiên cứu sau này. Đặc biệt, 2 chủng TP13 và TP14 (thuộc họ *Pseudomonas*) có khả năng tổng hợp được siderophore với hàm lượng cao nhất sẽ được chú ý nhiều hơn (Hình 2B).

Phosphate là một trong những nguyên tố đa lượng thiết yếu đối với sinh trưởng và phát triển ở thực vật. Tuy nhiên, hàm lượng phosphate hòa tan trong đất thường rất thấp. Vì vậy, vi khuẩn phân giải phosphate có thể đóng vai trò trọng yếu trong cách tác nông nghiệp bằng cách hòa tan các dạng phosphate khó tan có mặt trong đất (Borah *et al.*, 2019). Do đó, việc sàng lọc các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng phân giải phosphate là rất cần thiết. Trong thí nghiệm này tất cả 77 chủng EB đều dương tính với tính trạng trên. Chỉ số phân giải phosphate dao động từ 1,12 đến 2,5 (Bảng 2). Mặc dù chỉ số này thấp hơn so với các công bố trước đây (Pande *et al.*, 2017), nhưng là tính trạng rất đáng quan tâm. Đặc biệt, có 14 chủng (chiếm đối 18,18%) có chỉ số PSI lớn hơn 2 (Bảng 2). Hình 2C cho thấy chủng TP19 (thuộc họ *Bacillus*) có khả năng phân giải phosphate rất tốt, tạo nên vòng tròn phân giải khá lớn xung quanh khuẩn lạc. Các chủng có chỉ số PSI cao trong nghiên cứu này sẽ được tiếp tục thí nghiệm định lượng phân giải phosphate và sẽ được xem xét như là các chủng tiềm năng trong việc tổng hợp chế phẩm vi sinh nhằm giảm thiểu lượng phân lân hóa học hoặc áp dụng cho cây trồng ở vùng đất chứa nhiều phosphate vô cơ khó tan. Theo công bố từ các nghiên cứu trước, khả năng phân giải phosphate có khoảng biến thiên khá rộng phụ thuộc vào từng loại vi khuẩn nội sinh khác nhau trên các cây chủ khác nhau (Borah *et al.*, 2019). Kết quả của nghiên cứu này tương đối tương đồng với kết quả của Van và Cao (2014) khi nghiên cứu vi khuẩn nội sinh rễ lúa ở tỉnh Phú Yên.



Hình 2. Một số hình ảnh thí nghiệm sàng lọc các tính trạng kích thích sinh trưởng

A - Tổng hợp IAA; B - Tổng hợp siderophore; C - Phân giải phosphate vô cơ; D-Ức chế nấm *M. oryzae*. ĐC - Đối chứng. TP9, TP14, TP19 - Tên các chủng vi khuẩn nội sinh tương ứng.

Sàng lọc tính đối kháng của các chủng EB đối với chủng nấm *Magnaporthe oryzae*

Toàn bộ 77 chủng EB được sàng lọc tính đối kháng đối với chủng nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa *Magnaporthe oryzae* 007-6. Chủng nấm này được phân lập bởi nhóm nghiên cứu tại phòng thí nghiệm quốc tế LMIRICE2, là chủng gây ra triệu chứng nặng nhất trong số các chủng được phân lập. Kết quả thí nghiệm cho thấy, có 72/77 chủng thể hiện tính đối kháng đối với chủng nấm trên. Tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng dao động trong khoảng từ $0,61 \pm 0,05$ đến $64,75 \pm 1,66$. Trong đó có 24 chủng, chiếm 31,17%, thuộc nhóm các chủng cho tỷ lệ phần trăm ức chế từ xấp xỉ 50% trở lên (Bảng 2). Trong số này có nhóm các chủng EB được coi là nhóm tiềm năng để tiếp tục các nghiên cứu xa hơn, như là thử tính kháng *in planta* trong điều kiện nhà lưới và ruộng thực nghiệm nhằm chọn ra các chủng ưu tú nhất để áp dụng trong việc kiểm soát bệnh đạo ôn ở lúa (Hình 2D).

Bảng 2. Các tính trạng kích thích sinh trưởng của vi khuẩn nội sinh rễ lúa trong điều kiện *in vitro*

Ký hiệu chủng vi khuẩn	Tổng hợp IAA	Tổng hợp NH ₃ (µg/mL)	Tổng hợp Siderophore	Phân giải Phosphate (PSI)	Tỷ lệ kháng nấm Mo (%)
TP1	+	51,34 ± 0,37	++	1,67	0,65 ± 0,07
TP2	+	83,31 ± 0,48	++	1,45	64,11 ± 1,48
TP3	+	72,86 ± 0,66	+	1,45	64,75 ± 1,66
TP4	+	79,97 ± 1,14	+	1,4	63,47 ± 2,13
TP5	+	102,85 ± 6,27	++	1,56	64,11 ± 6,27
TP6	+	83,63 ± 0,48	++	1,25	50,61 ± 2,48
TP7	+	71,51 ± 0,63	+	1,16	57,32 ± 3,63
TP8	+	85,3 ± 2,06	+	1,34	54,88 ± 2,56
TP9	+++	110,9 ± 1,27	++	1,34	50,00 ± 3,27
TP10	+++	96,48 ± 0,79	+	1,16	1,22 ± 0,08
TP11	+	32,11 ± 1,27	-	1,3	59,15 ± 2,27
TP12	+	-	++	1,3	57,32 ± 3,13
TP13	+	107,77 ± 0,96	+++	1,3	0,61 ± 0,05
TP14	+	16,86 ± 0,48	+++	1,55	1,2 ± 0,08

CÔNG NGHỆ SINH HỌC MÔI TRƯỜNG VÀ NÔNG NGHIỆP

Ký hiệu chủng vi khuẩn	Tổng hợp IAA	Tổng hợp NH₃ (µg/mL)	Tổng hợp Siderophore	Phân giải Phosphate (PSI)	Tỉ lệ kháng nấm Mo (%)
TP15	+	63,25 ± 0,48	++	1,31	2,98 ± 0,07
TP16	+	-	+	1,34	41,08 ± 2,12
TP17	++	205,36 ± 0,95	+	1,28	52,39 ± 3,24
TP18	++	64,92 ± 0,32	++	2,3	14,89 ± 0,32
TP19	+	23,86 ± 0,32	+	2,45	50 ± 3,45
TP20	+	82,48 ± 0,63	++	1,56	54,17 ± 3,12
TP21	+	158,24 ± 0,08	++	1,45	49,41 ± 2,24
TP22	+	41,36 ± 0,07	++	1,4	46,43 ± 2,34
TP23	+	57,38 ± 0,02	++	1,4	41,67 ± 3,21
TP24	++	62,89 ± 0,11	+	2,3	44,65 ± 1,11
TP25	+	6,89 ± 0,04	+	1,43	48,81 ± 3,12
TP26	++	67,43 ± 0,55	+	1,5	4,17 ± 0,55
TP27	+	41,71 ± 0,02	+	1,5	58,34 ± 3,21
TP28	++	64,25 ± 0,05	+	1,5	5,36 ± 0,06
TP30	+	20,55 ± 0,02	-	2,45	-
TP31	+++	39,29 ± 0,08	++	1,45	7,74 ± 0,07
TP32	+	35,03 ± 0,08	++	2	57,15 ± 2,3
TP33	+	58,82 ± 0,02	+	1,82	58,93 ± 3,1
TP34	++	131,59 ± 0,91	+	1,5	2,98 ± 0,91
TP35	-	5,52 ± 0,04	+	1,5	7,74 ± 0,03
TP36	++	82,3 ± 0,13	+	1,75	10,12 ± 0,13
TP37	+	-	-	2	58,34 ± 3,23
TP38	-	38,81 ± 0,06	++	1,12	59,53 ± 3,41
TP39	+	35,37 ± 0,08	+	1,23	54,17 ± 2,92
TP40	++	28,66 ± 0,48	+	2,34	-
TP41	-	26,81 ± 0,07	+	1,46	51,2 ± 3,21
TP42	++	61,59 ± 0,08	+	1,5	-
TP43	-	46,04 ± 0,04	++	2,5	52,98 ± 2,3
TP44	++	95,75 ± 0,48	+	2,25	5,36 ± 0,58
TP45	++	87,61 ± 0,05	-	1,47	2,98 ± 0,15
TP46	+	64,51 ± 0,48	+	1,3	1,2 ± 0,58
TP47	+	61,16 ± 0,32	+	1,3	2,98 ± 0,42
TP48	+	82,03 ± 0,13	+	1,7	3,58 ± 0,13
TP49	+	45,76 ± 0,59	+	1,67	11,31 ± 0,59
TP50	+	46,68 ± 0,09	+	1,6	3,58 ± 0,19
TP51	+	33,47 ± 0,48	-	2,34	2,98 ± 0,48
TP52	+	92,09 ± 0,66	+	1,46	3,58 ± 0,66
TP53	+	54,27 ± 0,95	+	1,5	4,17 ± 0,95
TP54	+	71,37 ± 0,13	+	2,5	4,17 ± 0,13
TP55	+	108,6 ± 0,66	+	2,25	2,98 ± 0,66
TP56	+	64,54 ± 0,11	-	1,47	49,41 ± 2,13
TP57	+	43,08 ± 0,19	+	1,3	6,55 ± 0,18
TP58	+	71,09 ± 0,37	+	1,3	4,77 ± 0,37
TP59	+	67,39 ± 0,04	+	1,7	3,58 ± 0,04
TP60	+	60,45 ± 0,08	+	1,67	5,36 ± 0,07
TP61	+	71,99 ± 0,12	+	2,45	3,58 ± 0,12
TP62	+	63,86 ± 0,11	+	1,45	7,74 ± 0,11
TP63	+	45,17 ± 0,32	+	2	14,89 ± 0,32
TP64	+	64,48 ± 0,11	+	1,82	7,15 ± 0,11
TP65	+	79,13 ± 1,27	+	1,5	50 ± 2,34
TP66	++	41,1 ± 0,55	-	1,5	4,77 ± 0,55
TP67	+	59,91 ± 0,55	+	1,75	3,58 ± 0,55
TP68	+	93,14 ± 0,32	+	2	-
TP69	-	76,63 ± 0,79	+	1,12	4,17 ± 0,79
TP70	-	23,44 ± 0,37	-	1,23	19,65 ± 0,37

HỘI NGHỊ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC 2020

Ký hiệu chủng vi khuẩn	Tổng hợp IAA	Tổng hợp NH ₃ (µg/mL)	Tổng hợp Siderophore	Phân giải Phosphate (PSI)	Tỉ lệ kháng nấm Mo (%)
TP71	-	43,51 ± 0,06	-	2,34	8,93 ± 0,06
TP72	-	41,31 ± 0,37	-	1,46	-
TP73	+	51,82 ± 0,77	+	1,47	2,98 ± 0,77
TP74	-	66,28 ± 0,48	+	1,3	3,58 ± 0,48
TP75	-	68,58 ± 0,48	++	1,3	10,72 ± 0,48
TP76	-	20,1 ± 0,83	++	1,7	8,34 ± 0,84
TP77	-	95,12 ± 0,96	++	1,67	4,77 ± 0,96
TP78	+	61,79 ± 0,32	++	1,46	2,98 ± 0,32

Ghi chú: - = Không tổng hợp; + = Mức độ tổng hợp thấp; ++ = Mức độ tổng hợp trung bình; +++ = Mức độ tổng hợp cao; Các số liệu là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại ± SD.

KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu bước đầu trên các chủng vi khuẩn nội sinh rễ lúa ở vùng ngập nước thuộc đồng bằng sông Hồng. Tuy nhiên, các kết quả của nghiên cứu này cũng đã chứng thực rằng vi khuẩn nội sinh có thể cùng lúc sở hữu nhiều tính trạng kích thích sinh trưởng như tổng hợp IAA, ammonia, siderophore, phân giải phosphate, cũng như khả năng ức chế nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa. Vì vậy, chúng tôi tin tưởng rằng, các chủng EB này sẽ được nghiên cứu sâu rộng hơn nhằm đóng góp thêm vào bộ sưu tập các chủng vi sinh vật có lợi đối với cây trồng ở Việt Nam nói chung và miền Bắc Việt Nam nói riêng. Trên cơ sở đó, hướng tới phát triển thành chế phẩm vi sinh để góp phần hạn chế đáng kể lượng phân bón hóa học và thuốc bảo vệ thực vật theo hướng phát triển sản xuất nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (mã số đề tài: GUST.STS.ĐT2017-SH05). Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Phòng thí nghiệm quốc tế LMIRICE2 đã cung cấp chủng nấm đạo ôn *Magnaporthe oryzae* và chủng vi khuẩn *Pseudomonas sp.* để thực hiện nghiên cứu này. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn các sinh viên Lê Thị Huyền, Bùi Tiến Thái (Học viện Nông nghiệp Việt Nam), Trịnh Đình Duy, Đỗ Đoàn Thu Giang, Trần Lê Nam Khanh, Nguyễn Thùy Linh (Khoa Khoa học sự sống, Trường ĐH KHCN Hà Nội, Viện HLKHCNVN) đã hỗ trợ trong các thí nghiệm thuộc nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexander B, Zuberer DA (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12: 39-45.
- Bal HB, Nayak L, Das S, Adhya TK (2013). Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil* 366: 93-105.
- Bertani I, Abbruscato P, Piffanelli P, Subramoni S, Venturi V (2016). Rice bacterial endophytes: Isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environ Microbiol Rep* 8: 388-398.
- Borah A, Das R, Mazumdar R, Thakur D (2019). Culturable endophytic bacteria of *Camellia* species endowed with plant growth promoting characteristics. *J Appl Microbiol* 127: 825-844.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, Future Prospects. *Appl Environ Microbiol* 71: 4951-4959.
- Dinesh R, Anandaraj M, Kumar A, Bini YB, Subila KP, Aravind R (2015). Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiol Res* 173: 34-43.
- Glick BR (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)*: 963401.
- Glickmann E, Dessaux Y (1995). A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski reagent for Indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61: 793-796.
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Ann Microbiol* 60: 579-598.
- Ladha JK, Reddy PM (2003). Nitrogen fixation in rice systems: State of knowledge and future prospects. *Plant Soil* 252: 151-167.
- Malleswari D, Bagyanarayana G (2013). In vitro screening of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of medicinal and aromatic plants for multiple plant growth promoting activities. *J Microbiol Biotechnol Res* 3: 84-91.
- Nautiyal CS (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265-270.
- Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M, Kaushik S (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J Genet Eng Biotechnol* 15: 379-391.

Sayed RZ, Chincholkar SB, Reddy MS, Gangurde NS, Patel PR (2012). Siderophore Producing PGPR for Crop Nutrition and Phytopathogen Suppression. In: Maheshwari DK (ed) Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 449-471.

Schwyn B, Neillands J (1987). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Anal Biochem* 160: 47-56.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31: 425-448.

Van TPN, Cao ND (2014). Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of Endophytic Bacteria in Rice Plant Cultivated on Soil of Phu Yen Province, Vietnam. *Am J Life Sci* 2: 117-127.

Verma VC, Singh SK, Prakash S (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic Streptomyces from *Azadirachta indica* A. Juss. *J Basic Microbiol* 51: 550-556.

Wuryanto S, Antonius S, Mangunwardoyo W (2018). Production of Indole-3-acetic acid (IAA) by isolate bacteria of TPK5b2: Various of pH medium conditions. *AIP Conf Proc* 2014: 5-10.

IN VITRO SCREENING FOR PLANT GROWTH PROMOTING TRAITS AND ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *MAGNAPORTHE ORYZEA* FROM SUBMERGED RICE ROOT ENDOPHYTIC BACTERIA

Nguyen Van Phuong^{1,2*}, Mai Thi Phuong Nga², To Thi Mai Huong²,
Mai Duc Chung³, Chu Hoang Ha⁴, Le Tran Binh⁴

¹ Graduate University of Science and Technology, VAST

² Department of Life Sciences, University of Science and Technology of Hanoi, VAST

³ Agriculture Genetic Institute Vietnam

⁴ Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Endophytic Bacteria (EB) have been reported to colonize plant tissues and possess different Plant Growth Promoting (PGP) characters and antagonistic activity. In the present study, a collection of 77 EB strains were isolated from submerged rice root of variety Bac Thom 7 in Hai Duong province. All of 77 isolates were screened for PGP characters such as indole-3-acetic acid (IAA), ammonia production, siderophore production, phosphate solubilization, and also were screened *in vitro* for antifungal activity against *Magnaphorthe oryzea*, who causes blast disease on rice. 65 out of 77 isolates (84.4%) were positive for IAA production. Three isolates TP9, TP10 and TP31 showed the highest activity for this trait. 74 isolates are able to produce ammonia in a range of $5.52 \pm 0.04 \div 205.36 \pm 0.95$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Especially, the isolate TP17 showed the highest ammonia production. 67 out of 77 isolates were positive for siderophore production including the isolates TP13 and TP14 that showed the highest capacity. All the EB strains were positive for P solubilization with PSI of 1.12 - 2.5. 14 out of 77 P-solubilizing isolates (18.18%) have PSI over 2. 72 isolates have shown inhibition of *Magnaporthae oryzea*. Per cent of inhibition is in a range of $0.61 \pm 0.05 \div 64.75 \pm 1.66$ including 24 isolates (31.17%) that showed the highest inhibition rate of over 50%. These results indicated that the rice root endophytic bacteria possess contemporarily multiple PGP traits and antifungal activity. These strains should be further characterized in order to confirm the beneficial traits so that they can be utilized as biofertilizer formulation and biocontrol agent for rice production toward sustainability and environmental friendliness.

Keywords: Ammonia production, Endophytic bacteria, IAA production, *Magnaporthae oryzea*, Phosphate solubilization, Siderophore production.

* Author for correspondence: Tel: +84-961448512; Email: nguyen-van.phuong@usth.edu.vn