

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ NÂNG CAO TÍNH CHỊU MẶN Ở CÂY LÚA CỦA CHỦNG VI KHUẨN *ENTEROBACTER MORI* RS1

Lê Văn Mạnh, Hồ Mạnh Tường, Nguyễn Thị Hồng Hà, Phan Quyền,
Bùi Phương Thảo, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiên Phát

Viện công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực quan trọng của nước ta, đặc biệt ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Trước tình hình xâm nhập mặn nghiêm trọng tại đây, việc tìm chế phẩm vi sinh nhằm cải thiện năng suất, thân thiện với môi trường và sử dụng trong điều kiện hạn mặn là điều kiện cần thiết. Vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật (Plant growth promoting rhizobacteria - PGPR) là những vi sinh vật cư trú tại vùng rễ, có tác động tới sự sinh trưởng và chống chịu mầm bệnh của cây trồng thông qua một số con đường trực tiếp hoặc gián tiếp. Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng và khả năng chống chịu mặn trên cây lúa của chủng *Enterobacter mori* RS1 được phân lập tại Đồng bằng sông Cửu Long. Các thí nghiệm *in vitro* cho thấy chủng RS1 có khả năng cố định N, phân giải P và Ca tại chỉ số phân giải SI lần lượt là 1.39 và 1.35, sản sinh phytohormone IAA ở mức 1.35 $\mu\text{g/mL}$, sản sinh màng sinh học biofilm, chống chịu với mặn ở 8% NaCl (1370mM NaCl) và cải thiện sinh trưởng ở cây lúa. Sự biểu hiện của các gen liên quan đến tính chống chịu mặn trên cây lúa được lây nhiễm với chủng RS1 là cao hơn với cây đối chứng ở 100 mM. Kết quả cho thấy chủng *Enterobacter mori* RS1 là chủng vi sinh vật có khả năng kích thích sinh trưởng và chống chịu mặn cho cây lúa và có thể sử dụng để phát triển các chế phẩm vi sinh phục vụ cho nông nghiệp.

Từ khóa: PGPR, lúa, chịu mặn, Đồng bằng sông Cửu Long.

MỞ ĐẦU

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực chiếm vị trí quan trọng hàng đầu ở Việt Nam và trên thế giới. Hiện nay, hơn 110 nước trên thế giới đang sản xuất lúa gạo, trong đó, Châu Á là vùng sản xuất lúa gạo chủ yếu chiếm 90% về sản lượng cũng như về diện tích. Tuy nhiên, lúa là cây lương thực rất nhạy cảm với mặn, việc tăng độ nhiễm mặn trong đất làm cho cây lúa dễ bị tổn thương, đồng thời ức chế sinh trưởng và phát triển của cây (Collard *et al.*, 2013). Stress mặn có thể được coi là stress phổ biến nhất mà cây trồng phải đối mặt hiện nay, ảnh hưởng đến hơn 20% diện tích đất canh tác, trong đó bao gồm một nửa diện tích tưới tiêu và tỷ lệ này dự kiến sẽ tăng lên trong tương lai. Tác động tiêu cực của stress mặn là làm giảm sự nảy mầm hạt, sự phát triển của cây con và của lá, cũng như giảm diện tích quang hợp đã được ghi nhận ở các nghiên cứu trước. Nguyên nhân chính gây hại cho cây lúa trong môi trường mặn là do sự hấp thụ ion Na^+ quá mức dẫn đến độc tố ion và stress thẩm thấu. Trong hoàn cảnh môi trường đất bị xâm nhập mặn một cách đáng nghiêm trọng, kèm theo đó là vấn đề thiếu nguồn nước ngọt đáng kể thì giải pháp hiện tại là sử dụng chế phẩm vi sinh để cải thiện những vùng đất bị nhiễm mặn đã được đưa ra (Hameed *et al.*, 2008).

PGPR là vi khuẩn nội sinh thực vật cư trú bên trong rễ, thúc đẩy sinh trưởng của cây trồng thông qua một số con đường trực tiếp hoặc gián tiếp nhờ khả năng cố định đạm, hòa tan các chất khó tan và tăng khả năng chống chịu của cây trước các yếu tố stress từ môi trường. Trong những nghiên cứu gần đây, nhiều chủng vi khuẩn thuộc nhóm vi sinh vật PGPR đã được tìm ra và nghiên cứu, điển hình một số loài thuộc các chi như: *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp., *Klebsiella* sp., *Paenibacillus* và *Serratia* (Andrade *et al.*, 2023). Trước đó, 12 chủng vi khuẩn được phân lập từ vùng rễ của cây lúa tại vùng đất nhiễm mặn thuộc vùng đồng bằng sông Cửu Long. Chủng *Enterobacter mori* RS1 được lựa chọn nhằm đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng ở cây lúa trong số chủng vi khuẩn đã phân lập. Chủng vi khuẩn được định danh, khảo sát một số các hoạt tính hóa sinh của chúng, đồng nuôi cấy với thực vật nhằm đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng và tăng khả năng chống chịu mặn trên dòng lúa KD18.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ mẫu rễ cây lúa từ vùng đất nhiễm mặn ở Kiên Giang. Chủng vi khuẩn được lưu giữ dài hạn ở -80°C trong dung dịch glycerol 20%. Hạt giống lúa KD18 đạt chuẩn từ Vinaseed – Công ty cổ phần tập đoàn cây trồng Việt Nam được.

Hóa chất, thiết bị và môi trường sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật trực thuộc Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp

Định danh vi khuẩn

DNA vi khuẩn sẽ được tách chiết theo phương pháp Alkaline lysis buffer thuộc hãng Thermo Fisher Scientific như sau: Cho 20 μ L Alkaline lysis buffer (2,5 ml 10% SDS, 5,0 ml 1N NaOH và 92.5 ml H₂O khử trùng). Bổ sung 2 μ L dung dịch vi khuẩn nuôi qua đêm tại 28°C vào ống đựng dung dịch Alkaline lysis buffer và trộn đều. Đặt ống có chứa dung dịch khuẩn và Alkaline lysis buffer vào máy PCR với chu trình nhiệt 95°C trong vòng 10 phút. Sau đó đặt các ống này trên đá trong vòng 15 phút. Thêm 180 μ L H₂O khử trùng vào mỗi ống và ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 5 phút. Dịch nổi được chuyển sang ống 200 μ L mới và sử dụng như khuôn DNA cho các thí nghiệm tiếp theo.

Chủng vi sinh vật được xác định bằng phản ứng PCR để nhân trình tự gen 16S rRNA với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTA-3'). Các phản ứng PCR được thực hiện với 25 μ L thể tích bao gồm: 12,5 μ L MasterMix (Thermo Fisher Scientific): 1 μ L mỗi loại mồi 27F/1492R (100 pM), 1 μ L DNA khuôn (100 ng), 9,5 μ L H₂O. Phản ứng được tiến hành trên máy PCR hãng BIO RAD T100™ Thermal Cycler với chu trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 giây, bắt cặp ở 55°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây, với bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR (khoảng 1465 bp) được giải trình tự thương mại tại công ty LOBI Vietnam. Trình tự DNA được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI GenBank và được so sánh trong phần mềm MEGA X.

Khảo sát các đặc điểm hóa sinh của chủng RS1 trong điều kiện in vitro

Khảo sát khả năng cố định đạm của vi khuẩn bằng môi trường Ashby là phương pháp phổ biến để xác định vi khuẩn có khả năng cố định đạm tự do. Môi trường Ashby không chứa nguồn đạm cố định mà chỉ cung cấp các thành phần cơ bản cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn, từ đó dựa vào khả năng hình thành khuẩn lạc phát triển trên mặt thạch sau 07 ngày nuôi cấy ở 28°C nhằm đưa ra kết quả về khả năng cố định đạm của vi khuẩn (Tian *et al.*, 2023).

Khả năng phân giải phosphate khó tan (P) được xác định bằng sự xuất hiện của vòng phân giải Ca₃(PO₄)₂ trên môi trường PKO - Pikovskaya's agar sau 07 ngày nuôi cấy ở 28°C. Đồng thời, phân giải canxi (Ca) được quan sát bởi sự xuất hiện của vòng phân giải CaCO₃ trên môi trường CDB's agar sau 07 ngày nuôi cấy ở 28°C (Peper *et al.*, 2024). Chỉ số phân giải P, Ca được xác định theo công thức: SI = D/d. Trong đó: SI là chỉ số phân giải; D là đường kính vòng phân giải (cm); d là đường kính vòng khuẩn (cm).

Khả năng sản sinh phytohormone IAA của vi khuẩn trong môi trường LB + 0,1% tryptophan sau 07 ngày nuôi cấy được định lượng bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski ở bước sóng 520 nm (Gang *et al.*, 2019). Khả năng sản sinh màng sinh học được xác định với thuốc nhuộm crystal violet ở bước sóng 580 nm sau khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường LB sau 07 ngày, ở 28°C, điều kiện tối trên đĩa 96 giếng (Nagant *et al.*, 2010). Đánh giá khả năng chống chịu mặn của vi khuẩn được khảo sát qua thí nghiệm nuôi cấy chủng khuẩn trong môi trường LB chứa các nồng độ NaCl khác nhau sau 07 ngày, ở 28°C.

Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng của RS1 trên cây lúa KD18 trong điều kiện in vitro

Các hạt lúa KD18 khỏe mạnh và đồng đều được đem đi khử trùng trong dung dịch Ethanol 70% trong 01 phút, Javen 60% trong 20 phút, sau đó rửa 05 lần bằng nước cất khử trùng. Chủng khuẩn RS1 được nuôi hoạt hóa trong môi trường LB lỏng ở 28°C trong 4 h. Sau đó, dịch khuẩn được đem đi ly tâm 6000 vòng/phút, thu được cặn khuẩn. Hòa loãng cặn khuẩn cùng nước cất khử trùng nhằm thu được dịch khuẩn có OD = 0,01. Bổ sung 1 mL dung dịch khuẩn thu được vào trong đĩa peptri đã chứa dung dịch NaCl ở các nồng độ khác nhau (0 mM, 100 mM) cùng 50 hạt giống lúa KD18. Sau 07 ngày, đánh giá khối lượng tươi của cây con thu được.

Đánh giá biểu hiện gen

Mẫu rễ của cây trong thí nghiệm đánh giá kích thích sinh trưởng và chống chịu mặn sau 07 ngày xử lý mặn sẽ được thu lại và bảo quản trong -80°C. Sau đó, việc tách chiết RNA được thực hiện bằng Trizol (Chomczynski *et al.*, 1995) với một số thay đổi. Cụ thể, các mẫu rễ được nghiền bằng máy nghiền Mill MM 400 (Retsch, Đức) với bi sắt trong 02 phút. Sau đó, 1 mL Trizol được thêm vào các ống, đảo nhẹ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, 200 mL chloroform/isoamylalcohol (tỉ lệ 24:1, v/v) được thêm vào mỗi ống và ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút. Các ống eppendorf 1,5 mL chứa 600 μ L dịch nổi được thêm isopropanol lạnh theo tỷ lệ 1:1 (v/v). Quá trình kết tủa RNA được thực hiện ở -20°C trong ít nhất 30 phút và kết quả RNA thu được bằng cách ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút. Sản phẩm được rửa hai lần bằng EtOH 70%, làm khô và hòa tan trong 50 μ L H₂O khử trùng. cDNA được tổng hợp bằng bộ Kit tổng hợp cDNA RevertAid First Strand (Thermo Fisher Scientific) với 1 μ g mRNA làm mẫu. Realtime-qPCR định lượng được thực hiện thông qua hệ thống Realtime-qPCR Rotor Gene Q (Qiagen, Hoa Kỳ) với ba lần lặp lại, sử dụng mỗi khuếch đại gồm có: OsAREB1F: TTCAACAGGTGGGCTGAGG; OsAREB1R: GCAGACTCCCTGTTTCATTGAT; OsLEA3-1F: AATGATTTCCCTTTGGTGTC; OsLEA3-1R: CATCAGTACACATCACCCA; OsEREBP1F: CCAATGGATCCTCCGTGTATG; OsEREBP1R: CATCCAGGTGGAAGGCTATC; OsEREBP2F: TCGGAGTGCGTATCATCACCA; OsEREBP2R: AATCTGGCAGCTGCATCTCC; OsActin1 F: CGGTCCGAACAACCTGGTATCGT; OsActin1 R ATCCAACCGGAGGATAGCATG; với gen tham chiếu OsGAPDH: AAGCCAGCATCCTATGCAGATT; OsGAPDHR: CAAAGATGCTTGACCTGTGTGTC. Sau đó, thực hiện theo chu

trình bao gồm: Khởi đầu ở 95°C trong 3 phút, 40 chu kỳ 95°C 10 giây, 60°C 20 giây và tiếp theo là 72°C 20 giây. Các gen được phân tích bằng qRT-PCR đối với cây lúa được mô tả trong báo cáo của Holmberg và đồng tác giả (2013).

Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 03 lần. Sự khác biệt có ý nghĩa của các giá trị trung bình được xác nhận bằng kiểm định Duncan. Kết quả phân tích thống kê được xử lý bằng phần mềm GraphPad.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả đánh giá khả năng phân giải P khó tan

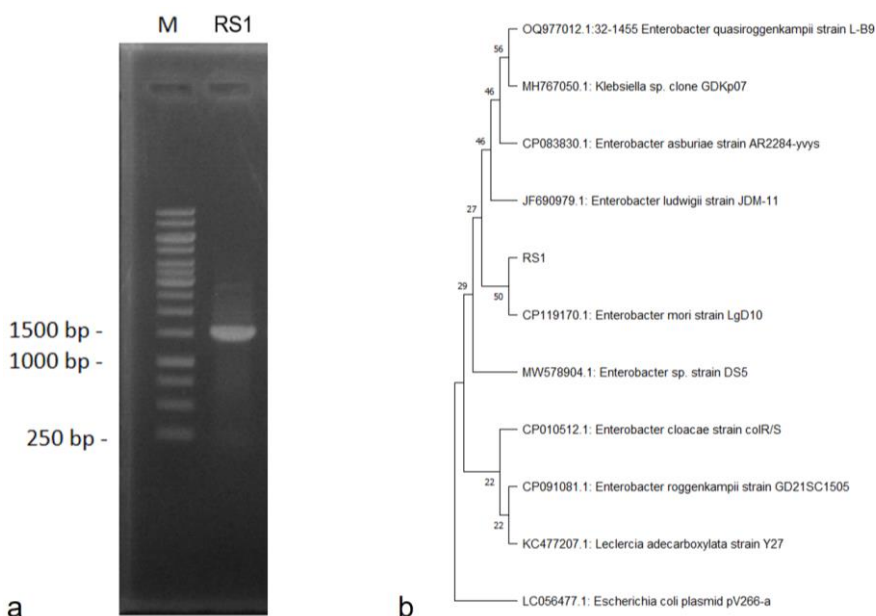
Phosphate là một nguyên tố thiết yếu cho sự sinh trưởng thực vật, vi khuẩn vùng rễ có thể chuyển đổi P từ dạng khó tan thành dạng dễ hấp thụ. Dựa trên khả năng kích thích sinh trưởng của vi sinh vật vùng rễ, khả năng phân giải P là yếu tố cần thiết để lựa chọn chủng khuẩn tiềm năng từ bộ sưu tập chủng đã được phân lập tại vùng đất nhiễm mặn thuộc Đồng bằng sông Cửu Long. Về mặt thực nghiệm có thể nhận biết khả năng hòa tan các dạng P khó tan nhờ sự hình thành vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc trên môi trường thạch PKO. Kết quả trong Bảng 1 cho thấy chỉ số phân giải P bởi chủng RS1 bằng $1,39 \pm 0,02$ là cao nhất. Nhờ khả năng phân giải vượt trội, RS1 là chủng khuẩn tiềm năng được lựa chọn trong nhóm 12 chủng để thực hiện các thí nghiệm đánh giá tiếp theo.

Bảng 1. Kết quả đánh giá tuyển chọn chủng khuẩn có khả năng phân giải P

STT	Ký hiệu chủng	Chỉ số phân giải P (SI)	STT	Ký hiệu chủng	Chỉ số phân giải P (SI)
1	RS1	$1,39 \pm 0,02$	7	RS7	$1,15 \pm 0,01$
2	RS2	$1,12 \pm 0,02$	8	RS8	$1,29 \pm 0,12$
3	RS3	$1,11 \pm 0,03$	9	RS9	$1,15 \pm 0,02$
4	RS4	$1,32 \pm 0,02$	10	RS10	$1,12 \pm 0,02$
5	RS5	$1,25 \pm 0,05$	11	RS11	$1,22 \pm 0,12$
6	RS6	$1,22 \pm 0,10$	12	RS12	$1,14 \pm 0,01$

Kết quả định danh dòng vi khuẩn RS1

Dựa trên hình thái khuẩn lạc, hình thái khuẩn lạc và một số đặc điểm sinh hóa cơ bản của chủng vi khuẩn RS1, có thể xác định chủng vi khuẩn đã phân lập thuộc chi *Enterobacter*. Trình tự 16S rDNA đã được xác định và tìm kiếm trình tự tương đồng trên NCBI cho thấy độ tương đồng đạt 99,37% với chủng *Enterobacter mori* LgD10 (Hình 1).



Hình 1. Kết quả PCR nhân gen 16S rRNA từ chủng RS1 (a) và cây phân loài thể hiện sự tương đồng giữa RS1 và các chủng khuẩn khác (b)

Kết quả đánh giá một số đặc điểm hóa sinh *in vitro*

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*. Nghiên cứu của Tian và đồng tác giả (2023) phân lập được 11 chủng vi khuẩn tiềm năng, trong đó chủng khuẩn *E. mori* có thể sinh trưởng tốt trên môi trường Ashby không chứa N. Kết quả đánh giá cố định N cho thấy chủng vi khuẩn RS1 có thể sinh trưởng trên môi trường Ashby không chứa N (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả đánh giá một số đặc điểm hóa sinh trong điều kiện *in vitro* của chủng RS1

STT	Các đặc điểm hóa sinh trong điều kiện <i>in vitro</i>	Kết quả
1	Khả năng cố định N	+
2	Phân giải Ca (Chỉ số SI)	1,35 ± 0,04
3	Sản sinh IAA (µg/mL)	21,74 ± 0,52
4	Sản sinh màng sinh học Biofilm (OD bao nhiêu)	0,016 ± 0,007
5	Khả năng chống chịu NaCl (%)	8 (1370mM)

Một số kết quả từ các bài báo cáo liên quan tới chủng khuẩn *E. mori* không đề cập nhiều tới khả năng phân giải Ca. Tuy nhiên, trong báo cáo của Phuphaboon và đồng tác giả (2022), một số chủng khuẩn thuộc chi *Enterobacter* hoàn toàn có khả năng phân giải Ca. Kết quả đánh giá khả năng phân giải P cho thấy chủng RS1 có thể phân giải Ca với chỉ số phân giải SI là 1,35 ± 0,04 (Bảng 2).

IAA đóng một vai trò là hormone 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. PGPR có khả năng sản sinh IAA trong điều kiện *in vitro* khi môi trường nuôi cấy được bổ sung 1% tryptophane. Trong thí nghiệm, chủng RS1 sản sinh lượng IAA đạt 21,74 ± 0,52 µg/mL sau 07 ngày nuôi. Khả năng sản sinh IAA của chủng vi khuẩn được khảo sát là giống với một số công bố trước đó. Điển hình, các chủng thuộc chi *Enterobacter* khảo sát bởi Jan và đồng tác giả (2020) có thể sản sinh IAA dao động từ 3,02 đến 23,2 µg/mL (Bảng 2).

Màng sinh học là tập hợp các vi sinh vật được gắn kết với nhau bằng một mạng lưới cấu trúc các chất polyme ngoài tế bào. Màng sinh học được tạo ra từ nhóm chủng vi sinh vật PGPR là yếu tố tăng cường chống chịu mặn cho cây trồng vô cùng hiệu quả. Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng RS1 có khả năng tạo màng sinh học, tuy nhiên không đáng kể, đạt giá trị OD 580nm 0,016 ± 0,007. Kết quả này tương đồng với kết quả từ nghiên cứu của Nyeen và đồng tác giả (2013) cho rằng đây là khả năng chung của các chủng khuẩn thuộc chi *Enterobacter* (Bảng 2).

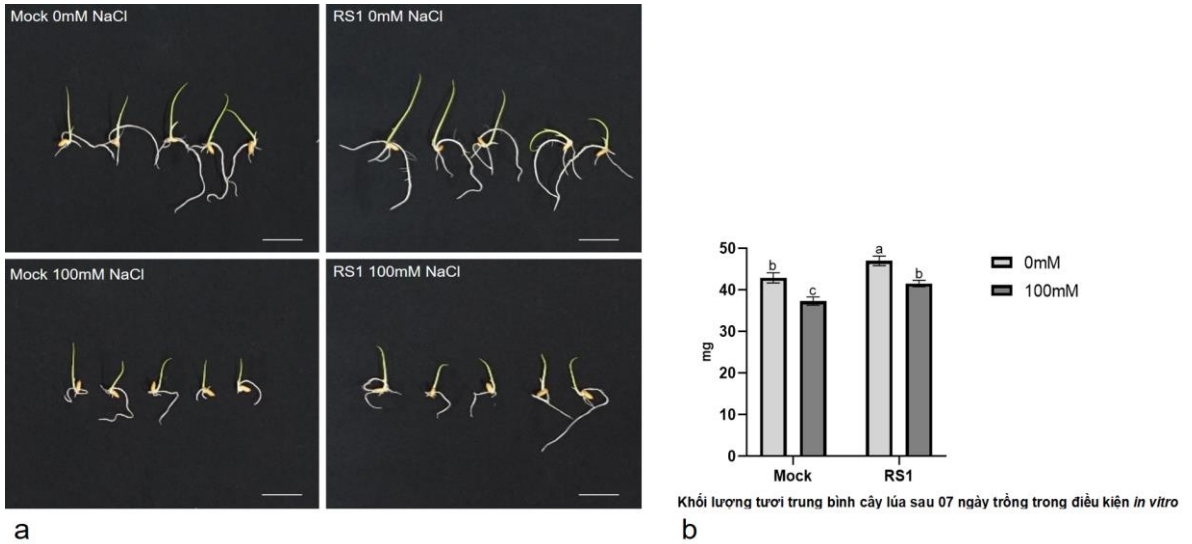
Khả năng chống chịu NaCl của vi khuẩn là khả năng của vi khuẩn sống và phát triển trong môi trường có nồng độ muối cao. Kết quả thí nghiệm nuôi chủng khuẩn tiềm năng trong môi trường LB chứa các nồng độ NaCl cho thấy RS1 bị ức chế sinh trưởng tại điều kiện 8% NaCl (tức 1370mM NaCl) và không thể sống sót tại điều kiện 9% NaCl (Bảng 2). Chi *Enterobacter* không phải là vi khuẩn ưa mặn, chúng có khả năng chịu mặn nhẹ và có thể phát triển trong môi trường có nồng độ muối nhất định lên đến khoảng 5-6%. Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng khuẩn *E. mori* RS1 có khả năng chịu mặn tốt hơn so với các loài khác thuộc chi *Enterobacter*.

Kết quả đánh giá khả năng chống chịu mặn trên cây lúa của chủng RS1 trong điều kiện *in vitro*

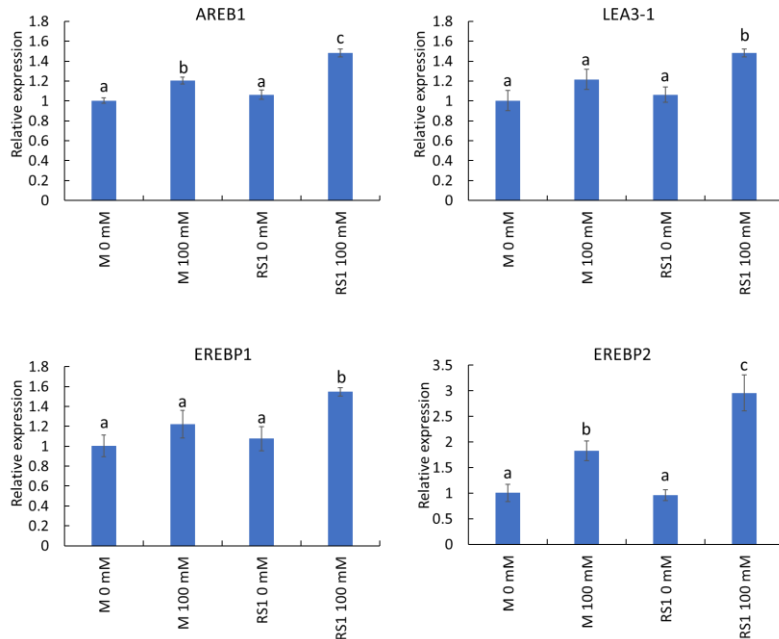
Tiến hành đánh giá khối lượng cây lúa sau 07 ngày nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* cho thấy chủng khuẩn RS1 có thể giúp cây lúa 07 ngày tuổi sinh trưởng tốt hơn so với cây đối chứng trong điều kiện thường và mặn (Hình 2). Ở nồng độ 100 mM NaCl, khối lượng thu được ở cây được lây nhiễm chủng RS1 có khối lượng cao hơn 11,37% so với cây đối chứng. Kết quả nghiên cứu phù hợp với các nghiên cứu trước đây về khả năng nâng cao tính chịu mặn của cây lúa của một số chủng vi khuẩn phân lập. Cụ thể, chủng *Enterobacter* sp. giúp tăng tăng khối lượng cây con trung bình tới 63,15% so với đối đối chứng trong điều kiện mặn 30 mM NaCl (Sagar *et al.*, 2020). Thêm vào đó, nghiên cứu của Hussain và đồng tác giả (2022) cho thấy *E. mori* có khả năng thúc đẩy sự phát triển sinh khối của cây lúa, tăng khối lượng từ 10% đến 30% dưới điều kiện stress mặn so với cây đối chứng. Một nghiên cứu khác của Fadji và đồng tác giả (2023) cho thấy chủng khuẩn *E. mori* AYS9 có thể hỗ trợ cây lúa chống chịu nồng độ NaCl lên tới 200 mM. Bên cạnh đó kết quả thí nghiệm ở điều kiện bình thường (0 mM) cho thấy cây được lây nhiễm chủng RS1 cũng cho khối lượng cao hơn 9,53% so với cây đối chứng (Hình 2). Các kết quả trên thể hiện *E. mori* RS1 là chủng khuẩn tiềm năng có khả năng kích thích sinh trưởng và chống chịu mặn giúp cây lúa ở giai đoạn đầu sinh trưởng.

Kết quả đánh giá biểu hiện một số gen liên quan tính chống chịu mặn trên cây lúa

Kết quả đánh giá sự biểu hiện một số gen liên quan đến chống chịu mặn thuộc con đường abscisic acid-ABA (*AREB1*, *LEA3-1*) và ethylene-ETH (*EREBP1*, 2) được xác định. Theo đó, sự biểu hiện của tất cả các gen trên cây lúa được lây nhiễm với chủng RS1 cao hơn so với cây lúa không được lây nhiễm với chủng RS1 (cây đối chứng) ở điều kiện 100 mM. Ngoài ra, ở điều kiện bình thường (0 mM), sự biểu hiện của các gen này trên cây lúa được lây nhiễm với chủng RS1 và cây đối chứng là như nhau (Hình 3).



Hình 2. Hình thái (a) và khối lượng tươi trung bình (b) cây lúa đối chứng và được lây nhiễm sau 07 ngày trồng trong điều kiện in vitro ở các nồng độ muối khác nhau. Scale 1 cm.



Hình 3. Sự biểu hiện một số gen của cây lúa được lây nhiễm (RS1) và không được lây nhiễm (M) với chủng RS1 sau 07 ngày trồng trong điều kiện in vitro ở các nồng độ muối khác nhau

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng vi khuẩn RS1 thuộc loài *Enterobacter mori*, và có khả năng cố định đạm cũng như phân giải P và Ca. RS1 có khả năng sinh tổng hợp IAA và chịu mặn trên lên tới 8% NaCl. Thêm vào đó, khối lượng tươi thu được ở cây được lây nhiễm chủng RS1 là cao hơn so với cây đối chứng ở cả điều kiện bình thường và có xử lý với mặn. Ngoài ra, các gen liên quan đến khả năng chống chịu mặn trên cây lúa được lây nhiễm chủng RS1 là cao hơn so với cây đối chứng ở cả hai điều kiện 0 và 100 mM. Kết quả trên tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển chế phẩm vi sinh có thể ứng dụng trong nông nghiệp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài với mã số CSTE24-01 do Viện công nghệ sinh học tài trợ và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tian A, Gong Q (2023). Endophytic bacterial communities in wild rice (*Oryza officinalis*) and their plant growth-promoting effects on perennial rice. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1184489.
- Collard B C Y (2013). Developing new flood-tolerant varieties at the International Rice Research Institute (IRRI). *SABRAO Journal of Breeding genetics*, 45(1).
- Chomczynski P, & Mackey K (1995). Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, 19(6), 942-945.
- De Andrade L A (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *Microorganisms*, 11(4): 1088.
- Ayangbenro F A E (2023). Genomic Assessment of *Enterobacter mori* AYS9: A Potential Plant Growth-Promoting Drought-Resistant Rhizobacteria. *Spanish Journal of Soil Science*, 13: 11302.
- Sharma G S (2019). Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-protocol*, 9(9), e3230-e3230.
- Hameed M (2008). Morphological adaptations of some grasses from the salt range, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 40(4): 1571-1578.
- Holmberg R C (2013). Akonni TruTip® and Qiagen® methods for extraction of fetal circulating DNA-evaluation by real-time and digital PCR. *PLoS one*, 8(8), e73068.
- Hussain M B (2022). Rice interactions with plant growth promoting rhizobacteria. In *Modern Techniques of Rice Crop Production* (pp. 231-255). Singapore: Springer Singapore.
- Kathi S (2024). *Enterobacter* spp. Virulence Factors and Biofilm Components: Synthesis, Structure, Function, and Inhibitors. In *ESKAPE Pathogens: Detection, Mechanisms and Treatment Strategies*, 349-365). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Jan-Roblero J (2020). *Kosakonia*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 213-231). Academic Press.
- Nagant, C (2010). Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *Journal of microbiological methods*, 82(3): 243-248.
- Peper A (2024). Functional characterization of core and unique calcite-dissolving bacteria communities from peanut fields. *Phytopathology*, 114(5): 1011-1019.
- Phupaboon S (2022). Application of a modified membrane-trapping technique to determine fish microflora species from Thai silver BARB (*Barbonymus gonionotus*). *J. Sci. Technol*, 207.
- Sagar A (2020). ACC deaminase and antioxidant enzymes producing halophilic *Enterobacter* sp. PR14 promotes the growth of rice and millets under salinity stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26: 1847-1854.
- Teng Z (2019). Isolation and characterization of P solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 339076-339807.
- Yan Y (2022). *Bacillus velezensis* YYC promotes tomato growth and induces resistance against bacterial wilt. *Biological Control*, 172: 104977.

EVALUATION OF THE GROWTH-PROMOTING AND SALT TOLERANCE-ENHANCING ABILITIES OF *ENTEROBACTER MORI* RS1 IN RICE PLANTS

Le Van Manh, Ho Manh Tuong, Nguyen Thi Hong Ha, Phan Quyen, Bui Phuong Thao, Chu Hoang Ha, Do Tien Phat

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is a crucial staple crop in Vietnam, especially in the Mekong Delta region. Addressing the critical challenge of saltwater intrusion, it is essential to discover potential approaches that not only enhance productivity but also promote environmental sustainability. Of which, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are microorganisms residing in the root zone that enhance plant growth and disease resistance through various direct or indirect mechanisms. This study aims to evaluate the growth-promoting and salt tolerance capabilities of *Enterobacter mori* RS1, isolated from the Mekong Delta region, on rice plants. *In vitro* experiments demonstrated that the RS1 strain can fix nitrogen, solubilize phosphorus and calcium with solubilization indices (SI) of 1.39 and 1.35, respectively, and produce the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) at a concentration of 1.35 µg/mL, form biofilms, tolerate salinity at 8% NaCl (1370 mM NaCl), and enhance rice growth. The expression of salt tolerance-related genes of RS1 inoculated rice plants was higher compared to control plants under 100 mM NaCl. These findings highlight *Enterobacter mori* RS1 as a beneficial PGPR for promoting growth and enhancing salt tolerance in rice plants, suggesting its potential for developing microbial products for agricultural applications.

Keywords: PGPR, rice, salt tolerance, Mekong Delta.

* Author for correspondence: Tel: +84-374212304; Email: dtphat@ibt.ac.vn