

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN, ĐỊNH DANH VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM VÀ TỔNG HỢP IAA TỪ RỄ CÂY QUÝT HỒNG (*Citrus reticulata* Blanco) TRỒNG TẠI HUYỆN LAI VUNG, TỈNH ĐỒNG THÁP

Lý Ngọc Thanh Xuân^{3*}, Trần Ngọc Hữu¹, Lưu Thị Yến Nhi²,
Nguyễn Hồng Huế¹, Trần Chí Nhân³, Trần Hoài Ninh⁴,
Nguyễn Quốc Khương^{1*}

TÓM TẮT

Chế phẩm vi sinh có vai trò quan trọng trong cải thiện độ phì nhiêu đất và năng suất cây trồng trong hệ thống nông nghiệp bền vững. Mục tiêu nghiên cứu nhằm tuyển chọn những dòng vi khuẩn nội sinh cố định đạm và tổng hợp IAA trong điều kiện pH thấp. Tổng cộng 18 mẫu rễ quýt hồng được thu tại xã Long Hậu và Tân Thành, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp được sử dụng để phân lập vi khuẩn nội sinh trên môi trường không đạm LGI và NFB. Kết quả cho thấy phân lập được sáu mươi tám dòng vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng, trong đó có mười một dòng vi khuẩn được tuyển chọn có khả năng thích nghi môi trường chua pH 5,0. Tuyển chọn được 2 dòng vi khuẩn cố định đạm cao nhất LH-L-4E (1,89 mg NH₄⁺ L⁻¹) và LH-L-4A (1,77 mg NH₄⁺ L⁻¹) trong điều kiện chua. Ngoài ra, hai dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp IAA cao nhất là TT-L-1A (16,8 mg L⁻¹) và LH-L-4B (16,1 mg L⁻¹). Hai dòng vi khuẩn tuyển chọn được định danh bằng kỹ thuật 16S rDNA là *Klebsiella pneumoniae* LH-L-4E và *Pseudomonas putida* TT-L-1A. Cần đánh giá hiệu quả của các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn trong thay thế phân đạm trên cây quýt hồng ở điều kiện nhà lưới và đồng ruộng.

Từ khóa: Cố định đạm, quýt hồng, tổng hợp IAA, vi khuẩn nội sinh.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Diện tích đất vườn trồng cây có múi ở Đồng Tháp khoảng 6.000 ha (Lê Hoàng Vũ, 2021). Trong đó, quýt hồng Lai Vung chiếm đến 300 ha (Nguyễn Văn Trí, 2021), đây là một đặc sản nổi tiếng với màu sắc đẹp, hương vị thơm ngon và là cây trồng chủ lực của tỉnh. Kết quả điều tra cho thấy để tăng năng suất, nông dân chủ yếu sử dụng phân hóa học cao hơn mức khuyến cáo (Phạm Duy Tiến và ctv., 2019), dẫn đến các đặc tính đất thay đổi. Các đặc tính đất khác nhau dẫn đến sự đa dạng của vi sinh vật trong vùng rễ khác nhau (Cherni *et al.*, 2019). Gần đây, với mục tiêu sản xuất nông nghiệp theo hướng bền vững, các loại chế phẩm sinh học, phân hữu cơ vi sinh có chứa

các vi sinh vật hữu ích được sử dụng phổ biến. Một số dòng đã được ứng dụng trong nông nghiệp giúp cải thiện độ phì nhiêu, cung cấp dinh dưỡng, tăng mật số vi khuẩn, giảm sử dụng phân bón hóa học (Alalaf, 2020; Ahmed và Ahmed, 2020; Cherni *et al.*, 2019; Chawla và Sadawarti, 2020; Abobatta và El-Azazy, 2020). Trên cây có múi, một số dòng vi khuẩn đã được phân lập như *Paenibacillus validus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida*, *Microbacterium oleivorans*, *Serratia plymuthica*, *Klebsiella pneumoniae* và *Enterobacter* spp. có khả năng hòa tan lân, cố định đạm và kích thích sinh trưởng cây trồng (Thokchom *et al.*, 2014; Trivedi *et al.*, 2011). Nghiên cứu cho thấy sử dụng phân hữu cơ kết hợp chế phẩm vi sinh chứa các dòng vi khuẩn *Bacillus megaterium*, *Azospirillum* và *Azotobacter* đã giúp giảm phân hóa học nhưng vẫn cải thiện sinh trưởng, năng suất và chất lượng cam (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Ahmed và Ahmed, 2020). Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA trên cây quýt hồng trồng trên đất chua.

¹ Bộ môn Khoa học cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

² Sinh viên ngành Khoa học cây trồng khóa 44, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

³ Khu Thí nghiệm - Thực hành, Phòng Quản trị - Thiết bị, Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

⁴ Sinh viên ngành Công nghệ sinh học khóa 16, Trường Đại học Cửu Long

*Email: nqkhuong@ctu.edu.vn; lntxuan@agu.edu.vn

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**2.1. Vật liệu**

- Mẫu rễ cây: Thu 18 mẫu rễ quýt hồng, lấy các rễ cấp 2, 3 và 4, mỗi cấp thu 3 rễ, mỗi xã thu 9 mẫu tại Long Hậu và Tân Thành, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp.

Thành phần môi trường phân lập vi khuẩn LGI (g L^{-1}) gồm: 10 Sucrose, 0,6 KH_2PO_4 , 0,2 K_2HPO_4 , 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 CaCl_2 , 0,01 FeCl_3 , 0,002 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mL Bromothymol blue 0,5% trong KOH 0,2 N và 20 agar;

Môi trường NFB (g L^{-1}): 5 acid malic, 5 K_2HPO_4 , 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 CaCl_2 , 0,1 NaCl, 4,5 KOH, 4 ml FeEDTA (1,64%), 2 ml dung dịch nguyên tố vi lượng, 1 ml dung dịch vitamin, 2 ml bromothymol blue 0,5% trong KOH 0,2 N và 20 agar.

Môi trường TYGA (g L^{-1}) gồm: 5 Trypton, 3 Yeast extract, 1 Glucose và 15 Agar.

2.2. Phương pháp**2.2.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng**

Cân 2 g mỗi mẫu rễ đã được rửa sạch bằng nước máy. Mẫu được cắt thành đoạn nhỏ khoảng 1 cm, sau đó cho vào bình tam giác 250 mL, thêm 10 mL cồn 96%, lắc nhẹ trong 10 phút, sau đó mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 5 phút, bổ sung 5 mL calcium hypochloride 2%, lắc nhẹ trong 10 phút. Mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng 4 lần, mỗi lần 5 phút. Hút 200 μL của nước rửa lần thứ 4 trải đều trên các đĩa chứa môi trường TYGA, ủ ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Các đĩa môi trường này không xuất hiện khuẩn lạc là mẫu khử đã đạt yêu cầu. Giã nhuyễn các mẫu bằng cối chày vô trùng. Kế đến, thêm 1,0 mL nước cất vô trùng vào cối, khuấy đều và hút 500 μL dịch trích mẫu cho vào các ống nghiệm chứa môi trường LGI và NFB không đậm, mỗi mẫu lặp lại 3 lần. Các ống nghiệm được đậy kín và ủ ở 30°C khoảng 2-4 ngày. Các mẫu có lớp màng mỏng gần bề mặt môi trường chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Trải lớp môi trường bán đặc có chứa vi khuẩn nội sinh sang môi trường không đậm tương ứng, ủ ở 30°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc khác nhau xuất hiện trên bề mặt môi trường được tiếp tục cấy chuyển 2-3 lần sang các đĩa môi trường tương ứng cho đến khi các khuẩn lạc thuần.

2.2.2. Mô tả đặc điểm khuẩn lạc

Mô tả hình thái khuẩn lạc gồm màu sắc, hình dạng, dạng bìa khuẩn lạc và độ nổi. Mô tả một số đặc

điểm tế bào gồm hình dạng và khả năng chuyển động của khuẩn lạc.

2.2.3. Đánh giá khả năng thích nghi trong điều kiện chua, cố định đạm và tổng hợp IAA của vi khuẩn vùng rễ cây quýt hồng

Tất cả các thí nghiệm của các dòng vi khuẩn đánh giá khả năng chịu được môi trường chua, cố định đạm và tổng hợp IAA được thực hiện với 3 lần lặp lại trên môi trường LGI và NFB trong điều kiện tối. Dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường nào thì đánh giá các chức năng này trên môi trường đó.

Đánh giá khả năng thích nghi trong điều kiện chua:

Trong số 68 dòng vi khuẩn phân lập từ rễ cây quýt hồng được nuôi cấy trong điều kiện môi trường lỏng ở pH 5,0 trong 48 giờ. Trong đó, môi trường lỏng được điều chỉnh pH 5,0 bằng dung dịch HCl 1 M đã qua màng lọc ($0,45 \mu\text{m}$). Các dòng vi khuẩn đạt giá trị $\text{OD}_{660} > 0,75$ được sử dụng để đánh giá các khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA.

Đánh giá khả năng cố định đạm:

Mười một dòng vi khuẩn có khả năng sống trong điều kiện pH 5,0 được nuôi trong môi trường LGI và NFB lỏng không đậm để đánh giá khả năng cố định đạm. Mỗi dòng vi khuẩn đã điều chỉnh OD_{660} là 0,5, hút 1,0 mL dung dịch vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 9 mL môi trường LGI và NFB lỏng không đậm, sau đó lắc với tốc độ 120 vòng/phút ở điều kiện tối, với 3 lần lặp lại cho mỗi dòng vi khuẩn. Mẫu đối chứng là dung dịch môi trường LGI và NFB không có vi khuẩn. Sau 48 giờ ủ, hút 1,0 mL dung dịch vi khuẩn để ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Dung dịch sau ly tâm được định lượng đạm bằng phương pháp hiện màu xanh phenol trên máy quang phổ ở bước sóng 640 nm (Nelson *et al.*, 1983).

Đánh giá khả năng tổng hợp IAA:

Mười một dòng vi khuẩn được tuyển chọn có khả năng chịu được môi trường chua và khả năng cố định đạm được sử dụng để đánh giá khả năng cung cấp IAA trong môi trường LGI và NFB với pH 5,0. Tiền chất tryptophan được bổ sung $100 \mu\text{g/L}$ nhằm hỗ trợ tổng hợp IAA. Sau đó, 1,0 mL dung dịch các dòng vi khuẩn có giá trị OD_{660} 0,5 cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 9,0 mL môi trường LGI và NFB đã có tryptophan và ủ trong 48 giờ, với 3 lần lặp lại đối với mỗi dòng vi khuẩn. Mẫu đối chứng là dung dịch môi trường có tryptophan, nhưng không có bổ sung vi khuẩn. Kế tiếp, 1,0 mL dung dịch khuẩn được hút

để ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng phút⁻¹ trong 15 phút. Hàm lượng IAA được xác định bằng phương pháp so màu Salkowski và được tóm tắt như sau: 0,75 mL dung dịch trích đã được ly tâm trộn với 3,0 mL thuốc thử Salkowski (4,5 g/L FeCl₃ trong 10,8 M H₂SO₄) được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, hàm lượng IAA được xác định trên máy quang phổ ở bước sóng 535 nm (Glickman & Dessaux, 1995).

2.2.4. Phương pháp định danh vi khuẩn nội sinh đã tuyển chọn

Dòng vi khuẩn LH-L-4E và TT-L-1A được nuôi 48 giờ trong môi trường LGI. Sau đó, hút 2 mL khuẩn lạc để ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút nhằm thu tế bào để trích DNA bằng Genomic DNA Prep Kit (BioFACTTM), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và độ thuần được kiểm tra trên 1,0% w/v agarose gel bằng điện di. Sản phẩm DNA được khuếch đại gen mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi P515FPL và P13B như mô tả trong iProofTM High-Fidelity PCR Kit - Bio-Rad (BioRad, Hercules, CA) bởi T100TM thermo cycler (BioRad) cho vi khuẩn nội sinh. So kích thước của sản phẩm PCR với thang DNA chuẩn để xác nhận vị trí các band kích thước 1500 bp đối với vi khuẩn nội sinh. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng TIANquick Midi Purification Kit (Tiangen Biotech Ltd., Beijing,

China) theo hướng dẫn nhà sản xuất. Sau đó kiểm tra lại độ thuần trên 1,0% w/v agarose gel bằng điện di. Sản phẩm PCR đã tinh sạch được giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động tại Macrogen DNA Sequencing Service (Macrogen, Seoul, Korea). Kết quả giải trình tự với sắc phổ được phân tích bằng phần mềm BioEdit, phiên bản 7.0.5.3 (Hall, 1999) và phần mềm ChromasPro version 1.7 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro>). Giải trình tự của các dòng vi khuẩn được so sánh với các trình tự có sẵn trong ngân hàng gen bằng công cụ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) của National Center for Biotechnology Information (NCBI) để xác định mức độ tương đồng.

2.3. Xử lý thống kê

Sử dụng phần mềm SPSS phiên bản 16.0 để so sánh khác biệt trung bình giữa các dòng vi khuẩn bằng kiểm định Duncan.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và đặc tính hình thái, tế bào của vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng

3.1.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng

Bảng 1. Nguồn gốc các dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ quýt hồng trồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp

Địa điểm	Số mẫu rễ	Ký hiệu ^a	Môi trường ^b	Số dòng vi khuẩn được phân lập	Ký hiệu vi khuẩn được phân lập ^d
Long Hậu	9	LH	LGI	19	LH-L-1A, LH-L-1C, LH-L-2B, LH-L-3A, LH-L-4A, LH-L-4B, LH-L-4C, LH-L-4D, LH-L-4E, LH-L-4F, LH-L-4G, LH-L-4H, LH-L-5A, LH-L-6B, LH-L-6D, LH-L-7A, LH-L-8C, LH-L-9A, và LH-L-9C
			NFB	14	LH-N-1D, LH-N-2D, LH-N-3A, LH-N-4C, LH-N-5A, LH-N-5B, LH-N-5D, LH-N-6B, LH-N-7A, LH-N-8A, LH-N-8C, LH-N-9B, LH-N-9C, và LH-N-9D
Tân Thành	9	TT	LGI	17	TT-L-1A, TT-L-1B, TT-L-1C, TT-L-2C, TT-L-3A, TT-L-3B, TT-L-3C, TT-L-4A, TT-L-4B, TT-L-5B, TT-L-5D, TT-L-6A, TT-L-6D, TT-L-7C, TT-L-8B, TT-L-8C, và TT-L-9A
			NFB	18	TT-N-1C, TT-N-1D, TT-N-2A, TT-N-2B, TT-N-3C, TT-N-3D, TT-N-4A, TT-N-4C, TT-N-5A, TT-N-5B, TT-N-5C, TT-N-6A, TT-N-7A, TT-N-7C, TT-N-8A, TT-N-8C, TT-N-9B, và TT-N-9D

Ghi chú: ^aLH: Long Hậu, TT: Tân Thành; ^bMôi trường LGI được ký hiệu là L, môi trường NFB được ký hiệu là N; ^dSố theo sau là số thứ tự của mẫu, và ký tự theo sau để phân biệt các khuẩn lạc khác nhau.

Từ 18 mẫu rễ quýt đường (9 mẫu tại Long Hậu và 9 mẫu tại Tân Thành) phân lập được 68 dòng vi khuẩn nội sinh trên môi trường LGI và NFB. Trong đó, có 33 dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ quýt hồng thu tại xã Long Hậu và 35 dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ quýt hồng thu tại xã Tân Thành, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp (Bảng 1).

3.1.2. Đặc tính hình thái và tế bào của các dòng vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng

Đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây quýt hồng được trình bày ở bảng 2. Đối với màu sắc, các khuẩn lạc có màu vàng nhạt là chủ yếu (52,8%), màu trắng trong, trắng đục (27,8 và 19,4%, theo cùng thứ tự) trên môi trường LGI. Tuy nhiên, trên môi trường NFB xuất hiện

khuẩn lạc có màu trắng trong chiếm ưu thế với tỷ lệ 43,8%, kế tiếp là khuẩn lạc màu trắng đục 37,5% và thấp nhất dòng khuẩn lạc màu vàng nhạt, với tỷ lệ 18,7%. Bên cạnh đó, độ nổi mô chiếm ưu thế, với 58,3% trên môi trường LGI và 59,4 trên môi trường NFB. Tương tự, độ nổi lồi chiếm tỷ lệ thấp hơn, với 41,7% và 40,6%, theo cùng thứ tự. Các khuẩn lạc có biên nguyên với tỷ lệ 75,0% và 37,5%, và mép răng cưa (25,0% và 62,7%) theo thứ tự trên môi trường LGI và NFB. Các dòng khuẩn lạc được phân lập có dạng tròn chiếm ưu thế, tỷ lệ 91,7% trên môi trường LGI và 87,5% trên môi trường NFB. Ngoài ra, hầu hết các khuẩn lạc có đường kính < 1,5 mm, chiếm ưu thế với tỷ lệ 66,7% và 71,9% trên môi trường LGI và NFB, theo thứ tự (Bảng 2).

Bảng 2. Đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường LGI và NFB

Đặc điểm		LGI		NFB		Tổng số dòng	Tỷ lệ (%)
		Số dòng	Tỷ lệ (%)	Số dòng	Tỷ lệ (%)		
Màu sắc	Trắng trong	10	27,8	14	43,8	24	35,3
	Trắng đục	7	19,4	12	37,5	19	27,9
	Vàng nhạt	19	52,8	6	18,7	25	36,8
Độ nổi	Lồi	15	41,7	13	40,6	28	41,2
	Mô	21	58,3	19	59,4	40	58,8
Dạng biên	Nguyên	27	75,0	12	37,5	39	57,4
	Răng cưa	9	25,0	20	62,5	29	42,6
Dạng	Tròn	33	91,7	28	87,5	61	89,7
	Bầu dục	3	8,3	4	12,5	7	10,3
Đường kính (mm)	< 1,5	24	66,7	23	71,9	45	66,2
	> 1,5	29	33,3	9	28,1	21	33,8

Hầu hết khuẩn lạc có hình que (80,6%) và chỉ 19,4% khuẩn lạc được phân lập có dạng hình cầu trên môi trường LGI. Tuy nhiên, hầu hết khuẩn lạc có hình cầu (84,5%) và chỉ 15,5% khuẩn lạc được

phân lập có dạng hình que trên môi trường NFB. Tất cả các khuẩn lạc đều có khả năng chuyển động (Bảng 3).

Bảng 3. Đặc điểm tế bào của các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường LGI và NFB

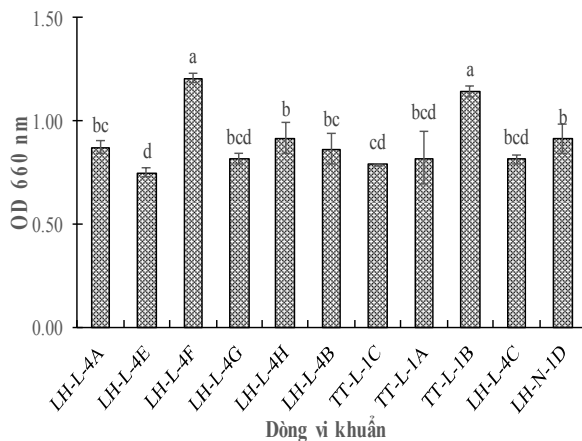
Đặc điểm		LGI		NFB		Tổng số dòng	Tỷ lệ (%)
		Số dòng	Tỷ lệ (%)	Số dòng	Tỷ lệ (%)		
Hình dạng	Hình que	29	80,6	4	15,5	33	48,5
	Hình cầu	7	19,4	28	84,5	35	51,5
Chuyển động	Có	36	100	32	100	68	100
	Không	0	0,0	0	0,0	0	0,0

3.2. Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng có khả năng thích nghi trong điều kiện chua, cố định đạm và tổng hợp IAA

3.2.1. Vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng có khả năng chịu được điều kiện chua

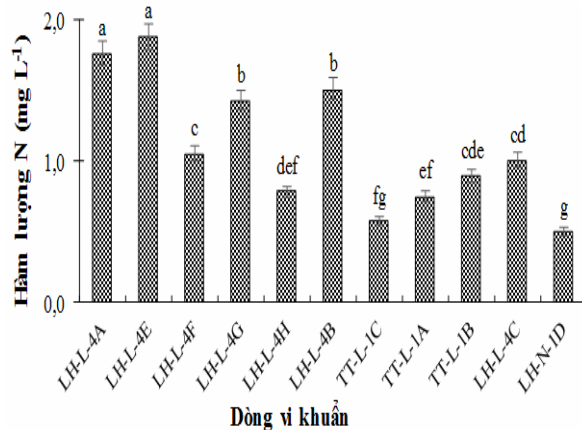
Trong số 68 dòng vi khuẩn được phân lập, có 11 dòng vi khuẩn có giá trị OD₆₆₀ lớn hơn 0,75, cao khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% so với các dòng còn lại. Trong đó, có hai dòng vi khuẩn có khả năng phát triển tốt nhất ở điều kiện pH thấp (pH 5,0) với giá trị OD₆₆₀ lớn hơn 1,00. Cụ thể là dòng vi khuẩn LH-L4F

và TT-L-1B có khả năng phát triển tốt nhất với giá trị OD_{660} 1,14–1,20 (Hình 1). Ngoài ra, có đến 9 dòng vi khuẩn thích nghi kém hơn trong điều kiện chua có giá trị OD_{660} bé hơn 1,0 dao động 0,79-0,91. Tất cả 11 dòng vi khuẩn triển vọng có khả năng phát triển ở điều kiện pH thấp này được sử dụng để đánh giá khả năng cố định đạm.



Hình 1. Khả năng phát triển của các dòng vi khuẩn triển vọng được tuyển chọn từ rễ cây quýt hồng trong điều kiện môi trường chua

3.2.2. Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng có khả năng cố định đạm



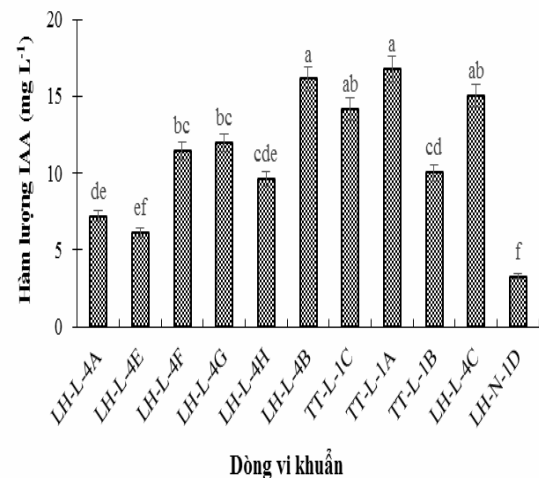
Hình 2. Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn triển vọng được tuyển chọn từ rễ cây quýt hồng

Tất cả 11 dòng vi khuẩn có khả năng sống tốt trong điều kiện pH 5,0, được sử dụng để đánh giá khả năng cố định đạm. Hàm lượng đạm giữa các dòng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%, với hàm lượng đạm 0,50-1,89 mg NH_4^+ L⁻¹. Trong đó, các

dòng vi khuẩn LH-L-4A, LH-L-4E có định đạm tốt nhất, với hàm lượng 1,77-1,89 mg NH_4^+ L⁻¹. Các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm tốt kế tiếp là LH-L-4G và LH-L-4B, với 1,43-1,51 mg NH_4^+ L⁻¹. Đây là hai dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm triển vọng kế tiếp để ứng dụng trong canh tác quýt hồng (Hình 2).

3.2.3. Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng có khả năng tổng hợp IAA

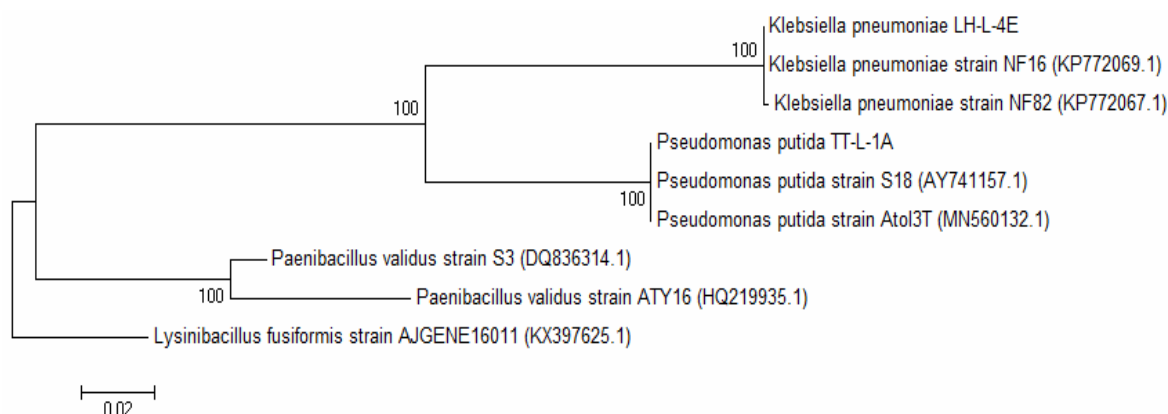
Các dòng vi khuẩn có khả năng chịu được điều kiện pH thấp 5,0 và có khả năng cố định đạm được sử dụng để đánh giá khả năng tổng hợp IAA. Bốn dòng vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng LH-L-4B, TT-L-1C, TT-L-1A, và LH-L-4C tổng hợp hàm lượng IAA cao khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% so với các dòng vi khuẩn còn lại. Các dòng vi khuẩn này tổng hợp được 14,2-16,8 mg IAA L⁻¹ trong khi đó các dòng vi khuẩn LH-L-4A, LH-L-4E, LH-L-4F, LH-L-4G, LH-L-4H, và TT-L-1B có hàm lượng IAA dao động 6,10-12,0 mg IAA L⁻¹ và dòng vi khuẩn tổng hợp IAA thấp nhất là LH-N-1D, chỉ 3,27 mg IAA L⁻¹ (Hình 3).



Hình 3. Khả năng tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn triển vọng được tuyển chọn từ rễ cây quýt hồng

3.3. Định danh vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng có khả năng cố định đạm trong điều kiện chua

Hai dòng vi khuẩn được chọn là LH-L-4E và TT-L-1A có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA được định danh bằng kỹ thuật 16S rDNA, kết quả tương đương là *Klebsiella pneumoniae* LH-L-4E và *Pseudomonas putida* TT-L-1A (Hình 4).



Hình 4. Cây phả hệ về mối quan hệ di truyền của dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA nội sinh trong rễ cây quýt hồng được tuyển chọn

Các vi khuẩn nội dung đã được phân lập, tuyển chọn để sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau trong sản xuất nông nghiệp. Một số dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ cây có múi trong việc phòng trừ sinh học (Araújo *et al.*, 2002). Trivedi *et al.* (2011) đã tuyển chọn được 39 dòng vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt trồng tại Huanglongbing, trong đó có 6 dòng có khả năng định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA là *Paenibacillus validus* ATY16, *Lysinibacillus fusiformis* ANA81, *Bacillus licheniformis* ANA77, *Pseudomonas putida* AKB28, *Microbacterium oleivorans* ANA50, và *Serratia plymuthica* ANA33. Bên cạnh đó, các dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ và đất trồng quýt gồm *Enterobacter hormaechei* RCE-1, *E. asburiae* RCE-2, *E. ludwigii* RCE-5, và *Klebsiella pneumoniae* RCE-7 đã được ứng dụng để góp phần cải thiện chiều cao cây, sinh khối cây và rễ khô vào thời điểm 120 ngày sau khi trồng so với không bổ sung vi khuẩn (Thokchom *et al.*, 2014) và 360 ngày sau khi trồng (Thokchom *et al.*, 2017). Ngoài ra, Thokchom *et al.* (2017) đã xác định các dòng vi khuẩn trên được chủng ở dạng dòng đơn hay hỗn hợp đều có khả năng nội sinh trong mô rễ và đất vùng rễ. Ở Việt Nam, vi khuẩn nội sinh được phân lập từ nhiều loại cây trồng như lúa, bắp và quýt đường (Lý Ngọc Thanh Xuân và ctv., 2016; Nguyễn Quốc Khương và ctv., 2020a, b, c). Do đó, hai dòng vi khuẩn được tuyển chọn LH-L-4E và TT-L-1A có tiềm năng ứng dụng trong cung cấp dinh dưỡng đạm và kích thích sinh trưởng cây có múi, cụ thể trên cây quýt hồng.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 68 dòng vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt hồng trồng tại xã Long Hậu và xã Tân Thành thuộc huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. Trong đó, tuyển chọn được 2 dòng vi khuẩn cố định đạm và 2 dòng vi khuẩn tổng hợp IAA trong điều kiện môi trường chua. Bên cạnh đó, tuyển chọn được hai dòng vi khuẩn cố định đạm nội sinh rễ cây quýt hồng LH-L-4A, và LH-L-4E, có khả năng sinh tổng hợp 1,77 và 1,89 mg NH₄⁺ L⁻¹. Ngoài ra, tuyển chọn được 4 dòng vi khuẩn tổng hợp chất IAA triển vọng LH-L-4B, TT-L-1C, TT-L-1A và LH-L-4C, với hàm lượng 14,2-16,8 mg L⁻¹ trong điều kiện môi trường chua pH 5,0. Vì vậy, hai dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm, đồng thời tổng hợp IAA ở mức độ phù hợp được định danh là *Klebsiella pneumoniae* LH-L-4E và *Pseudomonas putida* TT-L-1A bằng kỹ thuật 16S rDNA.

4.2. Đề nghị

Tiến hành các thử nghiệm hiệu quả của các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn làm cơ sở sản xuất phân bón hay chế phẩm vi sinh thay thế phân đạm hóa học trên cây quýt hồng trồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abobatta, W. F., & El-Azazy, A. M. (2020). Role of organic and biofertilizers in citrus orchards. *Aswan University Journal of Environmental Studies*, 1(1), 13-27.
2. Ahmed, K.F., & F Ahmed, M. (2020). Effect of Irradiated Compost and Bio Fertilizer on Vegetative Growth and Fruit Quality of Valencia

- Orange. *Egyptian Journal of Horticulture*, 47(1), 15-27.
3. Alalaf, A. H. (2020). The role of biofertilization in improving fruit productivity: a review. *Int. J. Agricult. Stat. Sci*, 16(1), 107-112.
4. Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni Jr, W., Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W., & Azevedo, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 4906-4914.
5. Chawla, R., & Sadawarti, R. K., 2020. Effect of bio-fertilizers and organic manures on growth, yield and fruit quality of fruit crops. *Plant Archives*. 20 (2) pp. 3767-3768.
6. Cherni, M., Ferjani, R., Mapelli, F., Boudabous, A., Borin, S., & Ouzari, H. I. (2019). Soil parameters drive the diversity of *Citrus sinensis* rhizosphere microbiota which exhibits a potential in plant drought stress alleviation. *Applied Soil Ecology*, 135, 182-193.
7. Glickmann, E., Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2):793-796.
8. Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
9. Lê Hoàng Vũ, 2021. <https://www.pvcfc.com.vn/dong-hanh-cung-nha-nong/thong-tin-thoi-vu-thi-truong/dong-thap-khac-phuc-dich-benh-cay-co-mui>.
10. Lý Ngọc Thanh Xuân, Trịnh Quang Khương, Lê Văn Dang, Trần Văn Dũng và Ngô Ngọc Hưng (2016). Hiệu quả của vi khuẩn nội sinh *Burkholderia vietnamiensis* lên sinh trưởng và năng suất lúa trồng trên ba vùng đất phèn đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. Số 44. Trang: 1-8.
11. Nelson, D. W. (1983). Determination of ammonium in KCl extracts of soils by the salicylate method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 14(11):1051-1062.
12. Nguyễn Quốc Khương, Lê Vinh Thúc, Nguyễn Thị Thanh Xuân, Đặng Hữu Ân, Trần Chí Nhân và Lý Ngọc Thanh Xuân (2020c). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA từ rễ quýt đường. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Số 13. Trang 18-23.
13. Nguyễn Quốc Khương, Lê Vinh Thúc, Nguyễn Thị Thanh Xuân, Trần Minh Mẫn, Trần Chí Nhân và Lý Ngọc Thanh Xuân (2020a). Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây quýt đường có khả năng hòa tan các dạng lân khó tan trong đất phèn. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Số 2. Trang 10-15.
14. Nguyễn Quốc Khương, Trần Ngọc Hữu, Lê Vinh Thúc, Trần Hoàng Em, Hứa Hữu Đức, Lâm Dư Mẫn, Nguyễn Kim Quyên, Trần Chí Nhân, Lý Ngọc Thanh Xuân (2020b). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh cây bắp lai có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Số 3+4. Trang 13-18.
15. Nguyễn Văn Trí, 2021. <https://baotintuc.vn/dia-phuong/ho-tro-nong-dan-kinh-phi-khoi-phuc-dien-tich-quyt-hong-lai-vung-20210207092521582.htm>
16. Thokchom, E., Kalita, M. C., & Talukdar, N. C. (2014). Isolation, screening, characterization, and selection of superior rhizobacterial strains as bioinoculants for seedling emergence and growth promotion of Mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Canadian journal of microbiology*, 60(2), 85-92.
17. Thokchom, E., Thakuria, D., Kalita, M. C., Sharma, C. K., & Talukdar, N. C. (2017). Root colonization by host-specific rhizobacteria alters indigenous root endophyte and rhizosphere soil bacterial communities and promotes the growth of mandarin orange. *European Journal of Soil Biology*, 79, 48-56.
18. Trivedi, P., Spann, T., & Wang, N. (2011). Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. *Microbial ecology*, 62(2), 324-336.

ISOLATION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF INDOLE-3-ACETIC ACID PRODUCING AND
NITROGEN FIXING ENDOPHYTIC BACTERIA FROM MANDARIN (*CITRUS RETICULATA* BLANCO)
CULTIVATED IN LAI VUNG DISTRICT, DONG THAP PROVINCE

Ly Ngoc Thanh Xuan*, Tran Ngoc Huu, Luu Thi Yen Nhi,
Nguyen Hong Hue, Tran Chi Nhan, Tran Hoai Ninh,
Nguyen Quoc Khuong*

Summary

Biofertilizers containing useful microbes contribute to improving soil fertility and yield in sustainable agricultural system. The objective of this study was to select the nitrogen fixing endophytic bacteria in conditions of acidic medium. Total 18 root samples of mandarin collected in Long Hau and Tan Thanh communes, Lai Vung district, Dong Thap province were used for isolating endophytic bacteria on LGI and NFB free nitrogen media. Results showed that there were 68 strains of bacteria isolated from the roots of chosen mandarin, in which 11 strains possessed the acidic resistant ability at pH 5.0. Two strains possessed highest nitrogen fixing activity, with the ammonium contents $1.89 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ and $1.77 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ in strains LH-L-4E and LH-L-4A, respectively. Moreover, two highest IAA-producing strains TT-L-1A and LH-L-4B released 16.8 and $16.1 \text{ mg IAA L}^{-1}$, respectively. The two selected strains were identified as *Klebsiella pneumoniae* LH-L-4E and *Pseudomonas putida* TT-L-1A by 16S rDNA sequences. The efficacy of a selected strain should be evaluated to replace nitrogenous fertilizer for mandarin in pot and field conditions.

Keywords: Endophytic bacteria, mandarin, nitrogen fixation, synthetic IAA.

Người phản biện: PGS.TS. Phan Quốc Hưng

Ngày nhận bài: 23/7/2021

Ngày thông qua phản biện: 23/8/2021

Ngày duyệt đăng: 30/8/2021